

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO
FOXP3⁺ EM BIÓPSIAS DO ALOENXERTO RENAL E SUA
ASSOCIAÇÃO COM A FUNÇÃO E SOBREVIDA TARDIAS DO RIM
TRANSPLANTADO**

Claus Dieter Dummer

Orientador: Prof. Dr. Francisco J. Veríssimo Veronese

A apresentação desta tese é requisito do programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre, Brasil,

2011

CIP - Catalogação na Publicação

Dummer, Claus Dieter
EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO FOXP3+ EM BIÓPSIAS DO ALOENXERTO RENAL E
SUA ASSOCIAÇÃO COM A FUNÇÃO E SOBREVIDA TARDIAS DO
RIM TRANSPLANTADO / Claus Dieter Dummer. -- 2012.
118 f.

Orientador: Francisco José Veríssimo Veronese.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. Transplante renal. 2. Rejeição do enxerto. 3.
Células T regulatórias. 4. FOXP3. 5. Células
dendríticas. I. Veronese, Francisco José Veríssimo,
orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, pela oportunidade de aprendizado.

A todos os amigos, colegas e professores do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que de certa forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos colegas e amigos Virna Carpio, Melina Loreto, Gabriel Joelson e Tiago Lopes pelo suporte e apoio nas mais diversas etapas desse trabalho. Todos contribuíram de forma significativa com seus conhecimentos. Fico eternamente grato a vocês!

Agradeço em especial ao meu mestre Prof. Dr. Francisco Veronese, pelo apoio confiança e amizade. Pela sua paciência nesses nove anos de convivência. Obrigado por essa experiência inesquecível!

Ao Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva pela sua disposição e suporte técnico para a captura e análise das imagens digitais.

Agradeço a Adrina Gonzatti e sua equipe pela disposição e ajuda recebida.

A minha esposa Fátima pelo seu amor, companherismo, compreensão e apoio incondicional, não só nessa fase, mas também nos últimos 13 anos de minha vida.

Agradeço aos meus pais Lotário e Araci, essência de minha existência, que sempre me oportunizaram o melhor.

Dedico esse trabalho ao meu mais precioso bem, minha filha Clara Valentina, amor de minha vida!

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	4
Resumo	6
Abstract	8
Capítulo 1. Introdução	10
Capítulo 2. Referencial Teórico	16
2.1. Tolerância imunológica em transplantação de órgãos	17
2.2. Células T reguladoras	18
2.3. Fator de transcrição FOXP3	20
2.4. Caracterização das células T reguladoras naturais e induzidas	22
2.5. Outros potenciais efeitos das Tregs	26
2.6. Tregs e tolerância em transplante de órgãos: modelos experimentais	27
2.7. Identificação das Tregs em estudos clínicos de transplante renal	29
2.8. Células dendríticas e tolerância imunológica	35
2.9. Efeito das drogas imunossupressoras sobre as Tregs FOXP3 ⁺	39
2.9.1. Corticosteróides	40
2.9.2. Inibidores da calcineurina	41
2.9.3. Inibidores da mTOR	42
2.9.4. Derivados do ácido micofenólico	43
2.9.5. Anticorpos bloqueadores do receptor da IL-2	43
2.9.6. Anticorpos depletadores de células T	44
Capítulo 3. Justificativa	45
Capítulo 4. Objetivos	48
Capítulo 5. Referências Bibliográficas	50
Capítulo 6. Artigo “INFLUENCE OF FOXP3 ⁺ EXPRESSION ON RENAL ALLOGRAFT OUTCOMES AND ITS CORRELATION WITH ANTIGEN PRESENTING CELLS IN GRAFT BIOPSIES”	72
Capítulo 7. Considerações Finais	114
Anexos	118

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs -	células apresentadoras do antígeno
ATG -	globulina anti-timocitária
CCR -	receptor de quimiocina
Cdi -	células dendríticas imaturas
CDm -	células dendríticas maduras
CDp -	células dendríticas plasmocitárias
CDs -	células dendríticas
CPH -	complexo principal de histocompatibilidade
CTLA-4 -	<i>cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4</i>
CTLA4-Ig -	cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DNMT -	inibidores da metilação do DNA
DRC -	doença renal crônica
DSA -	anticorpos anti-HLA doador específico
FOXP3 -	fator de transcrição foxp3
GITR -	receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticóide
HDAC -	inibidores da histona desacetilase
IC -	inibidores da calcineurina
IFN- γ -	interferon gama
IL-10 -	interleucina 10
IL-2 -	interleucina 2
IL-2R α -	cadeia alfa do receptor da interleucina 2
IL-35 -	interleucina 35
IL-6 -	interleucina 6
IPEX -	<i>immune dysregulation, polyendocrinopathy enteropathy, X-linked syndrome</i>
iTreg -	células T reguladoras induzidas
MMF -	micofenolato mofetil
NAFT -	fator nuclear ativado de células T
NKT -	células T “ <i>natural killer</i> ”
nTregs -	células T reguladoras naturais
RNA _m	RNA mensageiro

TcR - receptor células T
TGF β - fator de crescimento transformador beta
Tregs - células T reguladoras
T β RII - receptor do fator de crescimento transformador beta II

RESUMO

Introdução: O fator de transcrição FOXP3 está aumentado em pacientes com rejeição aguda do transplante renal, mas a sua influência na função e sobrevida do enxerto ainda não é clara. O objetivo deste estudo foi correlacionar a expressão gênica e protéica de FOXP3 com os desfechos do enxerto renal, e avaliar a sua associação com células apresentadoras do antígeno em biópsias do enxerto renal.

Métodos: Foram avaliados 91 receptores de transplante renal submetidos à biópsia do enxerto por disfunção aguda ou crônica, classificados pela histologia de Banff. O RNAm de FOXP3 foi analisado por PCR em tempo real, e a proteína de FOXP3 e as células dendríticas CD83⁺ (CDs) por imuno-histoquímica. Todas as análises foram feitas em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina. A magnitude de expressão de FOXP3 foi estabelecida por curva ROC. A função e a sobrevida do enxerto em 5 anos pós-transplante foram avaliados, assim como fatores preditores de perda do enxerto.

Resultados: A correlação da expressão intra-enxerto do gene e da proteína de FOXP3 foi positiva e significativa ($r=0.541$, $p<0.001$). Tanto o RNAm quanto a proteína de FOXP3 estavam aumentados em pacientes com rejeição aguda (RA), em comparação com aqueles sem rejeição (SR) ($p=0,039$ e $p<0,001$, respectivamente) ou fibrose intersticial/atrofia tubular (FI/AT) ($p=0,035$ e $p=0,034$, respectivamente). Níveis elevados do RNAm de FOXP3 ($\geq 2,36 \log_{10}$ RNAm) ou da proteína ($\geq 2,5$ células FOXP3⁺/mm²) não se correlacionaram com variáveis demográficas ou do transplante, mas pacientes com FOXP3 RNAm elevado tiveram maiores taxas de filtração glomerular estimada (TFGe) e uma tendência de variação positiva da TFG ao final do seguimento. O número de CDs CD83⁺ tendeu a ser maior nas biópsias com FI/AT em comparação com SR

($p=0,065$), mas não na RA. Pacientes com alta expressão de FOXP3 apresentaram maior número de CDs CD83⁺ na biópsia: 0,86 (0,25-4,0) vs. 0,44 (0-1,12) células/mm², $p=0,032$. A sobrevida cumulativa do enxerto em 5 anos não foi influenciada pela expressão do RNAm de FOXP3 ($p = 0,69$, *log-rank test*). Na análise de regressão Cox, RNAm e proteína de FOXP3 não foram preditores independentes da perda do enxerto, somente maior TFGe foi fator protetor contra perda do enxerto.

Conclusões: Este estudo mostra que a análise molecular de FOXP3 em tecido parafinado do enxerto renal é possível, uma vez que o RNAm e proteína correlacionaram-se positiva e significativamente. Como esperado, houve uma expressão aumentada de FOXP3 em biópsias com RA. Biópsias com alta expressão de FOXP3 tiveram maior densidade de células dendríticas. Nesta coorte, o FOXP3 não foi associado à melhor função ou sobrevida do enxerto renal.

ABSTRACT

Background. The transcription factor FOXP3 is increased in acute rejection in renal transplant recipients, but its influence in graft function and survival is not clear yet. The aim of this study was to correlate FOXP3 gene and protein expression with graft outcomes, and to evaluate its association with antigen presenting cells in kidney graft biopsies.

Methods. We assessed 91 kidney transplant recipients undergoing allograft biopsy for acute or chronic dysfunction, classified by Banff histology. FOXP3 mRNA was analyzed by real-time PCR, and FOXP3 protein and dendritic cells (CD83⁺ DCs) by immunohistochemistry. All analyzes were done in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. The magnitude of FOXP3 expression was established by the receiver operating characteristics (ROC) curve. Graft function and survival at 5 years post transplantation were assessed, as well as independent predictors of graft loss.

Results. Intra-graft FOXP3 gene and protein expression were significantly correlated ($r=0.541$, $p<0.001$). Both FOXP3 mRNA and protein were increased in patients with acute rejection (AR) as compared to those with no rejection (NR) ($p=0.039$ and $p<0.001$, respectively) or interstitial fibrosis/tubular atrophy (IF/TA) ($p=0.035$ and $p=0.034$, respectively). FOXP3-RNA^{high} ($\geq 2.36 \log_{10}$ RNA) or FOXP3-protein^{high} (≥ 2.5 FOXP3⁺ cells/mm²) did not correlate with demographic or transplant variables, but patients with FOXP3-RNA^{high} had higher glomerular filtration rates (GFR) and tended to have a positive delta of GFR at last follow up. CD83⁺ DCs tended to be increased in biopsies with IF/TA as compared to NR ($p=0.065$), but were not associated to AR. Patients with FOXP3-RNA^{high} had more CD83⁺ DCs on biopsy: 0.86 (0.25-4.0) vs. 0.44 (0-1.12) cells/mm², $p=0.032$.

The cumulative 5-year graft survival of these renal allografts was not influenced by FOXP3 mRNA expression (p=0.69, log-rank test). Neither FOXP3 mRNA or protein were predictors of graft survival, only higher eGFR at biopsy was a protective factor against graft loss.

Conclusions: This study gives support for performing FOXP3 molecular analysis in archival tissue of renal graft biopsies, where FOXP3 mRNA and protein had a good correlation. As expected, there was an increased FOXP3 expression in biopsies with AR, and biopsies with FOXP3-RNA^m^{high} associated with greater number of dendritic cells. In this cohort, FOXP3 was not associated with better renal graft outcomes.

Capítulo1 . Introdução

No ano de 1954 Joseph Murray realizou o primeiro transplante de órgão sólido. Desde então, os transplantes de órgãos vêm se consolidando como uma abordagem de sucesso no tratamento da falência permanente de órgãos. No Brasil cerca de 70% dos transplantes de órgãos realizados são de rim (1). No ano de 2010 foram realizados 4630 transplantes renais no Brasil (1).

O transplante renal é hoje o tratamento de escolha para os pacientes com doença renal crônica terminal (DRCT) (1). O transplante de rim bem sucedido melhora a qualidade de vida e reduz a mortalidade na maioria dos pacientes com DRCT, quando comparado à diálise (3-5). Em 1 e 5 anos, a incidência de morte por 1000 pacientes/ano em risco de pacientes com mais de 20 anos, ajustada para sexo, raça e doença primária, é respectivamente 250 e 230 em hemodiálise, 150 e 250 em diálise peritoneal, e 80 e 70 em transplante renal. O transplante renal bem sucedido é a terapia que mais reabilita o paciente renal crônico, estando associado a melhores índices de qualidade de vida e maior sobrevida a curto e longo prazo (6).

Mesmo com o desenvolvimento dos testes de histocompatibilidade e das modernas drogas imunossupressoras, o quadro de rejeição ainda é um dos principais problemas relacionado à perda de enxertos, e um grande desafio. Entender os mecanismos relacionados à rejeição é de fundamental importância para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas imunossupressoras (7,8).

As estratégias de prevenção e tratamento tornaram a rejeição aguda um evento menos frequente nos pacientes transplantados, levando a uma melhora significativa na sobrevida do enxerto após um ano. Em muitos centros de transplante as taxas de sobrevida em um ano de pacientes e enxertos são superiores a 95% e 90% respectivamente. Contudo, a sua utilização não impede o

desenvolvimento da rejeição crônica, fazendo com que a taxa de perda do enxerto em longo prazo continue sendo considerável (1,9,10).

A rejeição é um conjunto de respostas celulares e humorais derivadas da incompatibilidade a antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (CPH) e a outros tipos de antígeno. Em decorrência da rejeição ocorrem alterações estruturais e funcionais do enxerto por efeitos citotóxicos e inflamatórios (11). As células envolvidas na rejeição são os macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, como os linfócitos T citotóxicos (CD8+) e auxiliares (CD4+), e células *natural-killer* (NKT), entre outras (12).

A rejeição aguda mediada por células T é caracterizada pelo acúmulo de células mononucleares no interstício, associada a inflamação dos túbulos e artérias em que estão envolvidas citocinas e quimiocinas, entre elas a interleucina 2 (IL-2), o interferon- γ (ITF- γ) e o fator de necrose tumoral (13,14). Esse processo inflamatório pode gerar ruptura da membrana basal tubular, liberando proteínas tubulares no interstício, tendo como resposta a perda tubular progressiva (15). A rejeição aguda também pode ser mediada por anticorpos (DMA), tendo o rim um infiltrado predominante de neutrófilos polimorfonucleares nos capilares peritubulares (CPT). Um marcador acurado de DMA é a fração do complemento C4d em CPT e também a presença de anticorpos anti-HLA doador específicos (DSA) circulantes (16,17).

A rejeição crônica do enxerto ocorre tardiamente e pode ser mediada por células T, caracterizada por fibrose da camada íntima das artérias e infiltrado de células mononucleares, ou mediada por anticorpos, onde é observado duplo contorno com multilaminação dos capilares glomerulares e peritubulares (18) com depósitos de C4d nos CPT, associado a presença de DSA (19). Esse tipo de

rejeição costuma ser refratário ao uso de drogas imunossupressoras, mas pode responder a plasmaferese e uso de imunoglobulina intravenosa (20). Tanto o manejo da rejeição aguda quanto as tentativas de prevenção de rejeição crônica envolvem toxicidades significativas ao paciente e ao enxerto, contribuindo para a morbi-mortalidade dos receptores de transplante renal.

Considerando o exposto acima, torna-se necessário explorar outras vias de controle da rejeição e a aquisição de tolerância imunológica em que ocorra “aceitação” do enxerto renal com o mínimo de imunossupressão possível. Atualmente esforços têm sido direcionados para um melhor entendimento dos mecanismos das células reguladoras ou supressoras no controle da rejeição e na indução da tolerância. Tolerância imunológica é o estado de não agressão persistente aos próprios tecidos (21). A tolerância pode ser de dois tipos, central e periférica. A tolerância central ocorre nos órgãos linfóides centrais (timo, para linfócitos T e medula óssea para linfócitos B) e a periférica nos órgãos linfóides periféricos (baço e linfonodos) (22). Estudos mostram a existência de uma população de células T selecionadas positivamente com capacidade de se ligar com média e alta afinidade a antígenos próprios. Essa população de células desempenha papel regulador sobre a resposta imune na periferia e são chamadas de células T reguladoras (Tregs) (23). A regulação da atividade efetora de linfócitos na periferia pode ocorrer por deleção, que é a eliminação de células efetoras autorreativas por apoptose e/ou supressão (24). Ainda, a estimulação de linfócitos T na ausência de coestimulação pode levar a um estado não proliferativo chamado de anergia (25). Dentre os diversos tipos, as Tregs mais estudadas são as células T que expressam em sua superfície as moléculas CD4 e CD25, conhecidas como Tregs naturais (26), que são supressoras tanto *in vitro*

como *in vivo* (27). Em transplantação de órgãos, a participação das células T reguladoras na indução de tolerância ainda se restringe a modelos experimentais e alguns estudos clínicos iniciais (28).

O fator de transcrição FOXP3 é considerado um marcador específico das Tregs e a sua deficiência está associada a doenças autoimunes e inflamação. Durante a rejeição aguda do enxerto renal, tem sido demonstrado aumento da expressão do gene de FOXP3, bem como da proporção de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ no infiltrado tubulointersticial (29). Entretanto, ainda não é claro se as Tregs migram para o enxerto onde são retidas apenas para suprimir o processo inflamatório ou se estão diretamente associadas a mecanismos mais complexos de indução de tolerância imunológica. É possível que as Tregs FOXP3⁺ direcionem a resposta imune para um programa de aceitação do enxerto renal, podendo potencialmente influenciar a sobrevida em longo prazo de órgãos e tecidos transplantados (30,31).

Outro aspecto a ser considerado é a influência das drogas imunossupressoras na modulação do número e função das Tregs circulantes e o nível de expressão de FOXP3. A maior parte dos imunossupressores tem como alvo os sinais intracelulares envolvidos na ativação das células T após apresentação do antígeno. Apesar das evidências experimentais e clínicas apontando efeitos benéficos dos inibidores da mTOR (32) e negativos dos inibidores da calcineurina (IC)(33), é difícil separar os efeitos das outras drogas imunossupressoras utilizados concomitantemente no transplante clínico.

É um grande desafio o conhecimento desses mecanismos que podem contribuir no futuro para a determinação de novas estratégias terapêuticas para indução de tolerância de aloenxertos. Este projeto teve como objetivo avaliar a

expressão gênica e proteica de FOXP3 no enxerto renal, evidenciando de forma indireta a participação destas potenciais células Tregs marcadas pelo fator de transcrição FOXP3 em diferentes condições de patologia do aloenxerto – rejeição aguda, dano crônico manifestado por fibrose intersticial e atrofia tubular e outras condições, como necrose tubular aguda e nefrotoxicidade por imunossupressores. A correlação entre presença e magnitude da expressão de FOXP3 e função e sobrevida do enxerto renal em longo prazo também foi determinada.

Capítulo 2. Referencial Teórico

2.1. Tolerância imunológica em transplantação de órgãos

Na última década o controle da rejeição de aloenxertos e a aquisição de tolerância a longo prazo tem sido foco de intensa pesquisa. Tolerância é o estado no qual um órgão ou tecido transplantado entre seres geneticamente distintos não é rejeitado, na ausência de imunossupressão específica, ou seja, com competência imunológica preservada (34).

A tolerância imunológica pode ser classificada como central, que ocorre nos órgãos linfoides centrais, como timo e medula óssea, ou periférica, que ocorre nos órgãos linfoides periféricos, como baço e linfonodos (22).

Na tolerância central os linfócitos que reconhecem os antígenos próprios com alta afinidade entram em um processo chamado de seleção negativa e são eliminados por apoptose. Os linfócitos com afinidade intermediária pelos antígenos próprios são selecionados positivamente e migram para os tecidos linfoides periféricos (35).

A tolerância periférica envolve um contínuo reconhecimento dos antígenos próprios. A atividade efetora dos linfócitos pode ser regulada na periferia através da deleção e/ou supressão. Na deleção as células efetoras autorreativas são eliminadas por apoptose (24). Outra forma de tolerância periférica é a estimulação de linfócitos T na ausência de coestimulação, induzindo um estado não proliferativo conhecido como anergia, onde não há produção de IL-2 pelos linfócitos (25).

Existe uma subpopulação de células T selecionadas positivamente que tem a capacidade de se ligar com média a alta avides a antígenos próprios. Estas células são denominadas como células T reguladoras ou Tregs, tendo um papel regulador e supressor sobre a resposta imunológica (23).

As Tregs, que em modelos experimentais promovem um estado de tolerância periférica antígeno específica por suprimir a ativação e a expansão de células efectoras reativas, tem sido implicadas nestes processos (30,36-38). O paradigma atual no transplante de órgãos refere-se ao balanço entre Tregs aloantígeno reativas e células T efectoras, direcionando para rejeição ou aceitação, respectivamente. A estratégia de desenvolver e manter respostas reguladoras é uma abordagem promissora para a indução de tolerância em transplantes, mas a aplicação terapêutica das Tregs em nível clínico não foi possível até o presente momento (39).

A terapia imunossupressora atualmente empregada no transplante renal é eficaz na prevenção e tratamento das rejeições agudas, e busca-se em longo prazo reduzir a sua intensidade para, por um lado manter o enxerto funcional e por outro lado minimizar o impacto adverso das drogas sobre o paciente e o enxerto, como infecções e nefrotoxicidade. Os mecanismos pelos quais estas drogas modulam as Tregs têm sido investigados em diversos estudos experimentais e clínicos (40). Por exemplo, os IC inibem e reduzem em número as Tregs circulantes, e os inibidores da mTOR como a rapamicina mantem as Tregs em níveis normais e favorecem a sua ação (41-45). Entretanto, ainda não foi estabelecido que subpopulações de Tregs e que mecanismos de expansão são críticos para a indução e manutenção de tolerância do enxerto renal em longo prazo.

2.2. Células T reguladoras

As células T CD4⁺ são produzidas pelo timo como uma subpopulação de células T maduras e expressam constitutivamente CD25, a cadeia alfa do receptor

de interleucina 2 (IL-2R α), compondo o fenótipo das células T reguladoras “naturais” CD4⁺CD25⁺. Essas células representam 5 a 10% das células T CD4⁺ em sangue periférico de humanos e roedores (46,47). O termo células supressoras ou reguladoras foi reintroduzido por Sakaguchi e cols. em 1995 (26), com base em estudos com ratos timectomizados em período neonatal que desenvolveram uma doença autoimune fatal. Posteriormente o efeito supressor das Tregs foi demonstrado em transplante de ilhotas pancreáticas (48) e no controle da doença enxerto versus hospedeiro em transplante de medula óssea (49).

As Tregs são células anérgicas e hiporesponsivas à estimulação do receptor de célula T (TcR), com ação supressiva sobre a proliferação e ativação de linfócitos T CD4⁺ auxiliares e CD8⁺ citotóxicos através de contato célula-célula (50). Esses mecanismos ainda não são completamente conhecidos, mas incluem contato celular direto entre a célula reguladora e a célula efetora, a secreção e sinalização de citocinas, como o fator de crescimento transformador beta (TGF β), interleucina 2 e interleucina 10 (IL-10), que resultam na inibição da transcrição de genes intranucleares responsáveis por funções efetoras (51-53).

A identificação das Tregs tem sido difícil, pois outras subpopulações de células também têm funções regulatórias e marcadores específicos, como as células T $\gamma\delta$, as células CD3⁺CD4⁻CD8⁻, as células NKT e as células CD8⁺CD28⁻, entre outras (40).

Atualmente, o fator de transcrição FOXP3 é considerado o gene “mestre” e marcador específico das Tregs supressoras, e será abordado a seguir.

2.3. Fator de transcrição FOXP3

O fator de transcrição Foxp3 (em camundongos) ou FOXP3 (em humanos) é um marcador específico das células T reguladoras. O FOXP3 pertence a uma grande família de fatores de transcrição funcionais, denominada *forkhead-winged helix* (Figura 1) que corresponde a região de domínio de ligação ao DNA intranuclear (forkhead box = Fox), e expressa-se em células T CD4⁺CD25⁺ supressoras.

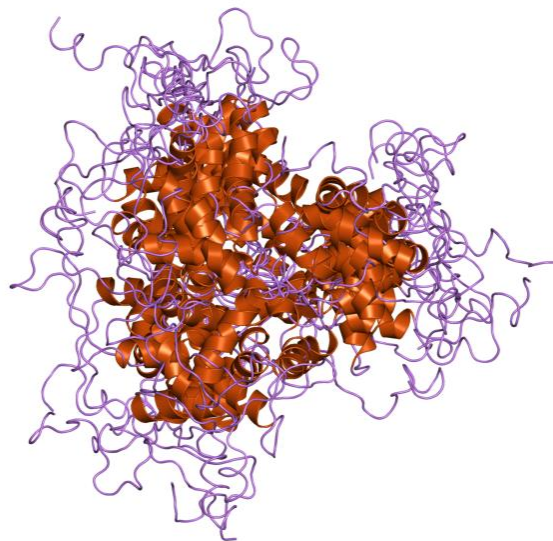


Figura 1. Representação do *Winged-helix transcription factors*, composto por cerca de 110 aminoácidos. O domínio tem quatro hélices e dois filamentos *beta-sheet*. Estas proteínas são classificadas em 17 famílias denominadas FoxA-FoxQ. Adaptado da referência 54.

O gene humano FOXP3 contém 11 exons na codificação (55) e está localizado no braço curto (p) do cromossoma X na posição 11.3 (Figura 2). Precisamente, o gene situa-se no segmento do par de base 49,106,896 ao par de base 49,121,287 (56).

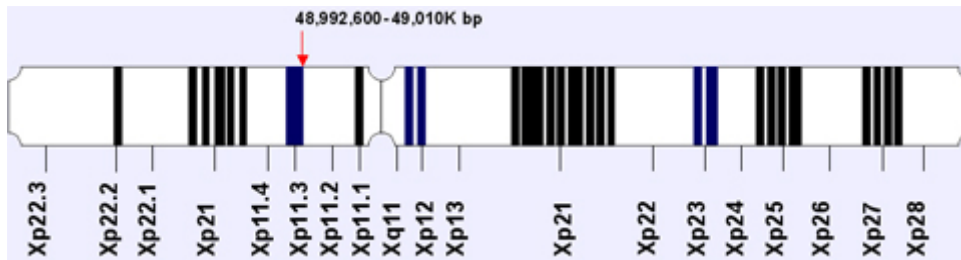


Figura 2. Localização do gene de FOXP3 no cromossomo Xp11.3. Adaptado da referência 57.

Sua expressão é ausente em outros timócitos, células B e células NKT, ou mínima em outras células T como linfócitos CD8⁺ (36-40). Até o momento, pouco se sabe sobre a função do FOXP3 em nível molecular. Alguns estudos sugerem que o FOXP3 liga-se ao DNA intranuclear e nesse sítio exerce a ação de fator de transcrição supressor, talvez por antagonismo funcional ao fator nuclear ativado de células T (NAFT) por competir pelos sítios de ligação ao DNA (37,47).

Estudos em camundongos identificaram mutações no gene *Foxp3*, produzindo animais deficientes em *scurfin* (proteína equivalente ao *Foxp3* no camundongo) que desenvolviam a Síndrome de Imunodeficiência ligada ao X (58). Em 1969 foi descrito que camundongos timectomizados em período neonatal desenvolviam posteriormente doenças auto-imunes (59), e em 1973 observou-se que ratos adultos timectomizados apresentavam tireoidite de causa imunológica (60).

A IPEX (*Immune dysregulation, polyendocrinopathy enteropathy, X-linked syndrome*) foi descrita inicialmente em 1982 em pacientes pediátricos como uma síndrome composta por desregulação imune, poliendocrinopatia e enteropatia (61). Esta síndrome afeta órgãos endócrinos (tireoidite, diabetes melito tipo I), o trato gastrointestinal (doença inflamatória intestinal), a pele (dermatite atópica,

alergia alimentar) e desencadeia doenças linfoproliferativas e infecções fatais (62).

O fator de transcrição FOXP3 parece controlar nas Tregs genes que codificam a expressão de outras moléculas associadas como CD25, *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4* (CTLA-4), receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticóide (GITR), CD134, CD103, CD39 e CD73. Entretanto, outras células como os linfócitos T-CD4⁺ efetores expressam esses mesmos receptores em sua superfície, e por isso eles não podem ser considerados específicos de Tregs (36,37,39,40).

Apesar das Tregs serem definidas pela expressão de FOXP3, elas não constituem uma população uniforme. As Tregs são subdivididas em naturais (nTregs), que se desenvolvem no timo, e adaptativas ou induzidas (iTregs), quando são convertidas a partir de células T efectoras na periferia. Entretanto, as nTregs e as iTregs compartilham fenótipo e função – expressam FOXP3 e suprimem vigorosamente a proliferação das células T efectoras. Adicionalmente, ambas necessitam do RcT para a sua indução (63,64).

2.4. Caracterização das células T reguladoras naturais e induzidas

A geração e a função regulatória das nTregs CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ inicia-se quando uma pequena fração de células T CD4⁺ que expressam constitutivamente CD25 é gerada no timo, através da seleção e estimulação de autoantígenos via RcT, o que lhes confere um “repertório” auto-reativo do RcT e reatividade cruzada a múltiplos aloantígenos (65). A via indireta de reconhecimento antigênico provavelmente é a forma dominante pela qual as Tregs reconhecem

aloantígenos. As nTregs amadurecem no timo antes de serem exportadas para a periferia, e quando migram encontram-se em estado anérgico.

As células nTregs estabelecem um equilíbrio entre imunidade e tolerância, protegendo o hospedeiro contra doenças auto-imunes e lesões associadas. A ação das Tregs resulta em anergia, inibição da proliferação celular, de citocinas pró-inflamatórias e da produção de anticorpos, supressão das células T de memória e provavelmente indução de apoptose em células efetoras (52,64-69). O efeito anti-proliferativo das nTregs sobre as células T efetoras, pelo menos *in vitro*, provavelmente ocorre através de contato direto célula-célula (36,37,51,52). Uma via de supressão dependente de granzima B também foi descrita em modelo *in vitro* mediando a inibição dos linfócitos T citotóxicos (70).

A outra subpopulação de Tregs, denominada Tregs “induzidas”, é constituída por células $CD4^+CD25^+FOXP3^+$, as quais são geradas na periferia e derivadas de células T efetoras. A sua indução requer estimulação pelo TcR, sinalização pela molécula CD28 e ação de citocinas específicas como IL-2 e $TGF\beta$ (51,53,63,67,68,71-73). A transferência *ex vivo* do gene *Foxp3* através de vetores retrovirais (por exemplo, MIGR1) pode converter células T *naive* $CD25^-CD45RO^-CD4^+$ periféricas em células T reguladoras fenotipicamente semelhantes as nTregs (74). Após estimulação do RcT por antígenos específicos, essas células não proliferam, são funcionalmente anérgicas e incapazes de produzir citocinas como IL-2 e IL-10, e expressam em sua superfície moléculas específicas de Tregs como CTLA-4, GITR, CD25 e CD103 (63,74-77).

A via de sinalização das iTregs mediada por $TGF\beta$ parece crítica para sua indução, e também ocorre por contato direto célula-célula. As células T reguladoras expressam $TGF\beta$ e o receptor de $TGF\beta$ II ($T\beta$ RII) em sua superfície, e

a ligação destas moléculas desencadeia o estado de anergia característico das iTregs (53,63,71-73). Chen e cols. (71,73) observaram que as células TCD4⁺CD25⁻ *näive*, após estimulação pelo TcR na presença de células apresentadoras do antígeno (APCs), passam a expressar o receptor T β RII que interage com o TGF β na superfície da célula CD4⁺CD25⁺ desencadeando mecanismos moleculares que irão determinar o efeito supressivo das Tregs.

Sawitzki e cols. (78) investigaram o efeito paradoxal do IFN- γ , citocina que induz resposta Th1 inflamatória, na função das Tregs aloantígeno reativas. Em modelo experimental de enxerto de pele, as células T CD4⁺CD25⁺ aumentaram rápida e transitoriamente a expressão do RNAm do IFN- γ após exposição a aloantígeno específico *in vivo*. O bloqueio do IFN- γ na co-transferência de Tregs reativas, na presença de CD45RB⁺CD4⁺ efectoras, resultou em necrose do enxerto em todos os camundongos receptores, sugerindo que o IFN- γ é importante para a imunoregulação das Tregs.

O efeito supressor das nTregs e iTregs envolve então múltiplos mecanismos, como deprivação de células T efectoras por inibição de seus fatores de indução e sobrevivência, eliminação direta mediada por granzima B, inibição de APCs e macrófagos pela ligação do CTLA-4 a B7 na superfície da APC, e produção de citocinas imunossupressoras como TGF β , IL-10 e IL-35 (36-40). Entretanto, ainda é incerto o quanto estes mecanismos *in vitro* contribuem para a imunossupressão *in vivo* das Tregs.

As Tregs localizam-se não somente em tecido linfoide, mas também dentro do enxerto no receptor, por mecanismos pouco conhecidos. O recrutamento e retenção das células regulatórias ocorrem em sítios de inflamação, onde mantêm um estado anérgico ou de hiporesponsividade a antígenos específicos (51). Em

modelos experimentais, moléculas como o receptor de quimiocina 4 (CCR4) (79) e a integrina $\alpha_E\beta_7$ (CD103) (80,81) estão associados aos mecanismos de atração e retenção de Tregs respectivamente para controle de inflamação em tecidos. Evidências sugerem que as Tregs supressoras podem co-localizar e se expandir junto com a população de células T efetoras, tanto no tecido linfóide periférico como em órgãos onde ocorre reação inflamatória, como na rejeição de enxertos e em infecções (39,40,51,81). Zhang et al (82) descreveram uma migração sequencial das Tregs, dependente de quimiocinas (CCR2, CCR4, CCR5, CCR7) e das selectinas P e E, do sangue para o enxerto e do enxerto para linfonodos de drenagem, onde ocorreria a supressão da resposta imune.

Recentemente foi descrita outra subpopulação de células com ação supressora, denominadas Tr1 (83). São geradas na periferia a partir de células T $CD4^+CD25^-$ naïve e induzidas por IL-10 e células dendríticas imaturas, mas não expressam FOXP3. Sua ação envolve a liberação de citocinas supressoras como IL-10 e $TGF\beta$. Enquanto as Tregs migram inicialmente para linfonodos, as Tr1 migram diretamente para os sítios de inflamação, inibindo células naïve e de memória, APCs e a expressão de moléculas co-estimulatórias (84).

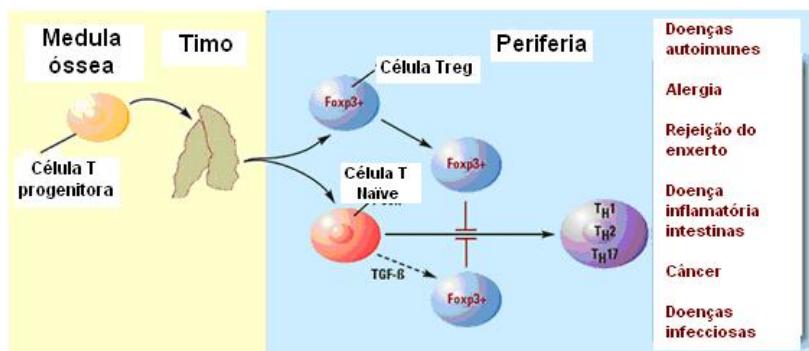


Figura 3. Geração e função das células T regulatórias. As Tregs FOXP3⁺ são produzidas pelo timo, suprimem a ativação e expansão das células T naïve e sua diferenciação para células T efetoras (ex., células T *helper* tipo T_H1, T_H2 e T_H17, e podem se diferenciar a partir de células T naïve na periferia (Adaptado da referência 85).

2.5. Outros potenciais efeitos das Tregs

Além do controle da inflamação em condições como rejeição de enxertos (86) e infecções (81), outros potenciais efeitos terapêuticos e preventivos das células T $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ tem sido explorados. O efeito supressivo das Tregs foi descrito em modelos experimentais de doenças auto-imunes como colites (87), glomerulonefrites (88) e diabetes mellitus (48,89). Os mecanismos comuns de supressão evidenciados nestes estudos são a inibição de citocinas pró-inflamatórias do clone Th1 e redução do infiltrado de células $CD4^+$, $CD8^+$ e macrófagos, atenuando ou mesmo prevenindo o dano à mucosa intestinal, glomérulo e células beta de ilhotas pancreáticas, respectivamente.

Outro uso potencial das Tregs é no transplante de medula óssea como uma nova estratégia para o manejo da doença do enxerto versus hospedeiro. Neste contexto, foi demonstrado que é possível prevenir ou reduzir a incidência desta complicação através da transferência de Tregs supressoras, tanto em estudos pré-clínicos em modelo de camundongo quanto no transplante clínico de medula óssea (90).

Estudos recentes mostraram que o fator de transcrição Helios, membro da família Ikaros, está supra-regulado em Tregs humanas e murinas (91,92). É expresso em todos os timócitos $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ e em quase 70% das células $FOXP3^+$ em tecidos linfóides periféricos. *In vivo*, antígenos específicos induzem as células T $FOXP3^+$ a não expressarem Helios, sugerindo que o mesmo possa ser um potencial marcador específico das Tregs naturais (93). *In vitro*, o *knockout* do Helios através do silenciamento do RNA diminui a função supressora das Tregs em humanos e, talvez, a modulação da função ou dos níveis do Helios possa induzir aumento ou redução da ação das Tregs em diferentes contextos (94).

As drogas epigenéticas constituem uma nova abordagem no controle de diversas doenças imunológicas. Estas drogas podem modificar a expressão gênica sem alterar a seqüência do DNA do genoma, seja no DNA cromossômico ou em proteínas ligadas ao DNA. São divididas em inibidores da metilação do DNA (DNMT) e inibidores da histona desacetilase (HDAC), ambas possuindo a capacidade de gerar Tregs FOXP3⁺ estáveis com função supressora (95).

2.6. Tregs e tolerância em transplante de órgãos: modelos experimentais

A imunoregulação mediada pelas células T FOXP3⁺ é crítica para a aquisição de tolerância a antígenos do aloenxerto. Modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* demonstram que a geração de Tregs na periferia pela transfecção do gene de Foxp3 em células T *naïve* pode levar à indução de tolerância e aceitação de enxertos (76,96). Chai e cols. (96) induziram Tregs Foxp3⁺ por transdução retroviral do gene de Foxp3 em células CD4⁺CD25⁻, e as infundiram em camundongos fêmeas, estabelecendo uma população de células anérgicas à estimulação antigênica por APCs e RcT, mas com função supressiva. Foram então implantados enxertos de pele de camundongos machos singenéticos que sobreviveram indefinidamente, enquanto que nos controles não transfectados com Foxp3, a sobrevida foi de apenas 25 dias.

A exposição *in vivo* de células T CD4⁺CD25⁺ de camundongos *naïve* a aloantígenos, e deficientes em células T efetoras, induziu expansão das nTregs antígeno-específicas *in vivo*, ocorrendo supressão de rejeição e tolerância persistente a enxertos de pele (76). As Tregs mantiveram atividade supressora com expressão persistente de Foxp3, CTLA-4 e GITR; a sua remoção levou a rejeição dos enxertos. Neste estudo, a expansão *in vitro* das iTregs com

aloantígeno na presença de IL-2 inibiu de forma potente a proliferação de linfócitos T em cultura. Em modelo de porco miniatura, a aceitação do enxerto renal ocorreu paralelamente a hiporesponsividade doador-específica, através de mecanismos de anergia, deleção e apoptose prolongada de células T citotóxicas (97).

Esses dados experimentais dão suporte ao uso potencial das Tregs na transplantação clínica, mas diversas perguntas precisam ser ainda respondidas (98). Os dados obtidos em modelos experimentais podem ser transferidos a humanos? Poderiam as células T reguladoras, após manipulação *in vivo* (sensibilização a aloantígenos e expansão clonal) ou *ex vivo* (sensibilização a aloantígenos, expansão clonal e transferência para o receptor) reter a atividade regulatória a longo prazo? As Tregs geradas sobreviveriam e migrariam para o enxerto quando introduzidas no receptor?

Diferenças entre camundongos e humanos são evidentes. Em camundongos, a molécula de Foxp3 parece estar estritamente relacionada com atividade regulatória. Em humanos o FOXP3 não é um marcador exclusivo de Tregs, isto é, nem todas as células que expressam FOXP3 são reguladoras; células efetoras também podem expressar FOXP3, mesmo que em níveis menores que nas Tregs, e de forma transitória (99). Em relação a retenção persistente da atividade inibitória, estudos tem mostrado que as Tregs maduras são células instáveis, podendo perder ou reduzir a expressão de FOXP3 e conseqüentemente perder a função supressora. Nestas condições, podem passar a produzir citocinas pró inflamatórias como IL-17 e IFN- γ e assim ser reprogramadas para a função efetora, desencadeando auto-imunidade e alergia. Esta reversão mostra a grande plasticidade desta linhagem celular (100). Além disso, as Tregs podem ser

reguladas negativamente por citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- α ou por moléculas co-estimulatórias como OX40 (CD134) e Tim-1, perdendo a sua ação supressora (101).

O cenário atual indica que a indução de tolerância do enxerto por Tregs no transplante clínico será difícil de alcançar. Inúmeros obstáculos precisam então ser transpostos para que as Tregs possam exercer sua função supressora intraenxerto a longo prazo. Como exemplo, citam-se a perda da capacidade das Tregs de inibir células T de memória, a resistência adquirida de células T efetoras na presença de inflamação intensa e a inativação das Tregs por células NKF (39).

2.7. Identificação das Tregs em estudos clínicos de transplante renal

Tem sido sugerido que a resposta imune direcionada ao aloenxerto renal envolve dois componentes: o destrutivo, orquestrado pelos linfócitos T CD4 auxiliares e CD8 citotóxicos e moléculas associadas, e um programa de proteção mediado pelas células T reguladoras induzidas pelo fator de transcrição FOXP3. O balanço destas duas forças em oposição influenciaria de forma importante a evolução dos enxertos, mediando rejeição ou aceitação (tolerância) do rim transplantado, respectivamente (102).

O significado da expressão de FOXP3 em biópsias do enxerto renal, no sangue e na urina de receptores de rim permanece incerto. Na Tabela 1 são apresentados estudos clínicos que identificaram e caracterizaram as Tregs no contexto do transplante renal.

Tabela 1. Estudos clínicos que avaliaram Tregs no transplante renal em humanos

<i>Referência</i>	<i>Método</i>	<i>Tecido</i>	<i>Achado principal</i>
Muthukumar et al. (103)	Perfil RNAm	Células de urina	RNAm FOXP3 aumentado na RA e associado a melhor sobrevida do enxerto
Louis et al. (104)	Citometria de fluxo Perfil RNAm	Sangue periférico	Menos CD4 ⁺ CD25 ^{high} e RNAm Foxp3 na rejeição crônica
San Segundo et al. (42)	Citometria de fluxo	Sangue periférico	IC mas não rapamicina diminuem número de Tregs circulantes
Veronese et al. (29)	Imunoperoxidase	Biópsia do enxerto	Aumento de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ em túbulos na RA; sem associação com pior sobrevida do enxerto
Grimbert et al. (105)	Perfil RNAm	Biópsia do enxerto	Aumento da relação Foxp3/Granzima B em BL comparado a RA
Aquino-Dias et al. (106)	Perfil RNAm	Biópsia do enxerto, sangue e periférico e células de urina	Maior acurácia do gene de FOXP3 no sangue e na urina para diagnóstico de RA em relação a outros marcadores
Bluestone et al. (45)	Citometria de fluxo Imunoperoxidase	Sangue periférico Biópsia do enxerto	Maior proporção de células FOXP3 ⁺ nos pacientes com belatacept vs. ciclosporina
Bestard et al. (107)	Imunohistoquímica Imunofluorescência	Biópsia do enxerto com	Maior proporção de Tregs no infiltrado de células T

		RSC	associado a melhor função do enxerto 3 anos pós Tx
Bunnag et al. (31)	Perfil RNAm Imunoperoxidase	Biópsia do enxerto	Expressão do RNAm FOXP3 é tempo dependente no infiltrado celular, independente da causa; sem associação com pior sobrevida do enxerto
Batsford et al. (108)	Imunohistoquímica	Biópsia do enxerto	Fração de Tregs FOXP3+ aumenta transitoriamente na rejeição, sem associação com a função do enxerto em 1 ano de Tx
Kollins et al. (109)	Imunofluorescência	Biópsia do enxerto	Tregs FOXP3+ não melhoram a gravidade da rejeição e não se correlacionam com a função do enxerto até 2 anos de Tx

RA: rejeição aguda; IC: inibidores da calcineurina; BL: *borderline* (suspeita de rejeição); RSC: rejeição subclínica; Tx: transplante renal

Muthukumar et al (103) demonstraram níveis significativamente mais elevados do RNAm de FOXP3 em células da urina de transplantados renais com rejeição aguda, em correlação inversa com a creatinina sérica. O aumento da expressão de FOXP3 foi preditivo da reversão do episódio de rejeição e da perda do enxerto em 6 meses, enquanto que outros marcadores como CD25, CD3e e perforina não foram fatores prognósticos. Corroborando estes dados, Aquino-Dias

et al (106) mostraram em pacientes com disfunção aguda do enxerto que a expressão do gene de FOXP3 em células de urina e do sangue periférico foi o parâmetro diagnóstico mais acurado para rejeição aguda quando comparado a moléculas citolíticas como perforina, granzima B, fas- ligante e inibidor da proteinase da serpina-9.

No estudo de Veronese et al (29) em biópsias do enxerto renal por indicação, a expressão proteica de FOXP3 predominou na rejeição aguda, sendo mínima na rejeição mediada por anticorpos e na nefrotoxicidade por inibidor de calcineurina. Noventa e seis por cento das células positivas para FOXP3 eram linfócitos T CD4⁺ concentradas nos túbulos renais (15,6% vs. 3,2% intersticial, Figura 4), e as demais eram células CD8⁺ FOXP3⁺ ou raramente CD4⁻CD8⁻ FOXP3⁺. Entretanto, dois outros estudos (31,110) mostraram localização predominantemente intersticial das Tregs, um deles em modelo animal de primatas (110). Diferente do esperado, a sobrevida do enxerto em dois anos nos pacientes com rejeição aguda e alta expressão de FOXP3 foi pior do que naqueles com baixa expressão (29), em acordo com outros estudos (31). Em pacientes com rejeição aguda subclínica, Bestard et al (107) observaram associação entre infiltrado com alta densidade de Tregs e melhor função do enxerto renal aos 3 anos pós transplante.

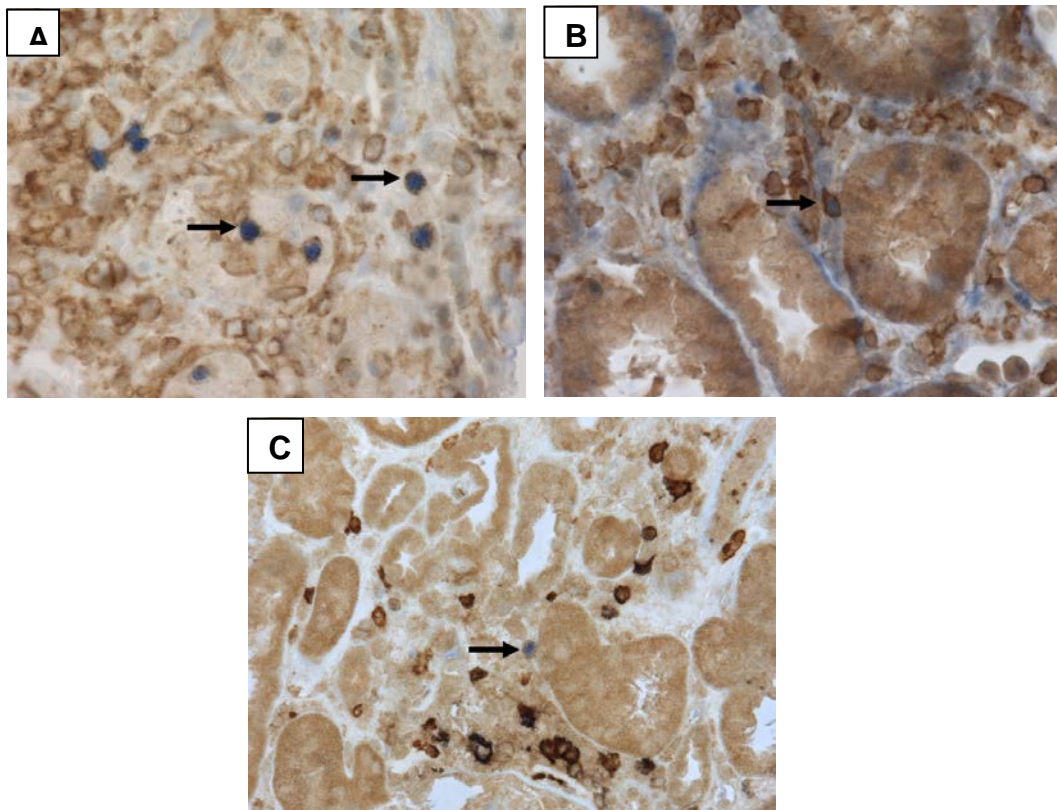


Figura 4. Expressão do FOXP3 em diferentes células durante rejeição aguda. A: coloração intranuclear (azul) para FOXP3 e coloração na superfície de células CD4 (marrom) em várias células T (setas); dupla coloração para CD4/FOXP3, aumento de 400x. B: células T CD8⁺ (superfície marrom) positivas para FOXP3 (núcleo azul), evento pouco freqüente (seta); dupla coloração para CD8/FOXP3, aumento de 400x. C: rara célula FOXP3 *single* positivo (núcleo azul) e ausência de coloração para CD4 ou CD8 (seta); tripla coloração para CD4/CD8/FOXP3, aumento de 400x (29).

Bunnag et al (31) demonstraram uma associação tempo dependente do gene de FOXP3 com rejeição aguda, tanto celular quanto humoral, em período tardio do transplante. Avaliando grupos de genes por microarranjos associados à patogênese da rejeição, o gene do FOXP3 correlacionou-se com transcritos de genes indutores de inflamação, lesão e reparação tecidual; o risco de perda do enxerto foi maior no tercil mais elevado de expressão do RNAm FOXP3. Segundo esses autores, as Tregs FOXP3⁺ não refletiriam aloimunidade *per se* mas seriam geradas pela inflamação aguda e crônica da rejeição, esta sim fator

determinante da pior evolução do enxerto a longo prazo. As Tregs naturais e induzidas fariam parte desta resposta, visando estabilizar áreas de inflamação de forma tempo dependente. Esses dados parecem ratificar os resultados de estudos prévios que associam Tregs FOXP3⁺ com inflamação em diferentes contextos: enxertos renais de primatas (110), biópsias de transplante cardíaco (111), urina (103,106), sangue periférico (106) e biópsias do enxerto de receptores de transplante renal (29,105,108). Louis et al (104) observaram redução de Tregs FOXP3⁺ circulantes em transplantados renais com rejeição crônica, mas níveis normais em enxertos estáveis sem evidência de rejeição ou naqueles que desenvolveram tolerância. Entretanto, a associação de Tregs com tolerância do enxerto renal em estudos clínicos ainda é contraditória, e dois estudos recentes não encontraram correlação entre expressão de células T FOXP3⁺ e função do enxerto em 12 meses de transplante (111), ou maior número de Tregs FOXP3⁺ e menor severidade da rejeição ou melhor função do enxerto renal em 2 anos de transplante (109).

O significado da presença de Tregs durante a rejeição do enxerto ainda não é claro, mas pode representar uma mudança de direção da resposta imune induzida por FOXP3, reduzindo a atividade de linfócitos Th1 CD4⁺ auxiliares e CD8⁺ citotóxicos e promovendo uma reação de “aceitação” do enxerto. A expressão de FOXP3 parece ter maior valor preditivo do que a graduação histológica de Banff, dando suporte a idéia de que a análise do infiltrado tubulo-intersticial e/ou vascular não discrimina que tipo de programa celular está em curso no enxerto – se destrutivo (células efectoras) ou protetor (células reguladoras) (102).

2.8. Células dendríticas e tolerância imunológica

As células dendríticas (CDs) são as principais células apresentadoras de antígeno do sistema imune, tendo importante papel na iniciação da resposta imune e na manutenção da tolerância ao *self*. As CDs constituem menos de 1% de todas as células mononucleares do sangue periférico (112) e são responsáveis pela captura, processamento e apresentação de antígenos para os linfócitos T (Figura 5).

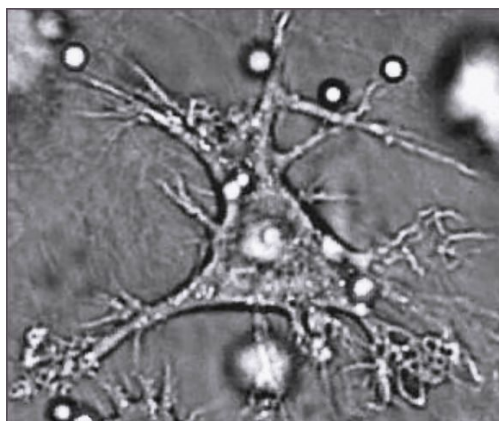


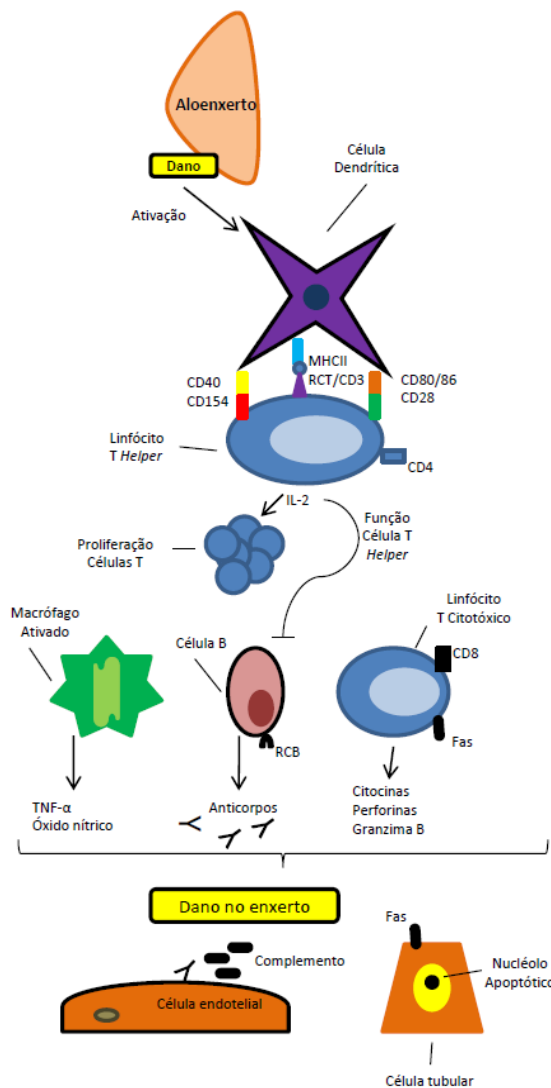
Figura 5. Cultura de células mostrando uma célula dendrítica com suas ramificações e prolongamentos (referência 113).

As células dendríticas podem ser divididas quanto ao seu estado de ativação em imaturas (CDi) e maduras (CDm). As CDi são assim classificadas devido a baixa expressão de moléculas do CPH e de outras moléculas co-estimulatórias como CD80, CD86 e CD40, e também por possuírem alta capacidade fagocitária (114,115).

Com a finalidade de induzir a resposta imune específica mediada por células T, as CDs agem como “sentinelas” do sistema imune, sendo que as CDi permanecem em um estado imaturo em quase todos os tecidos periféricos (116). O contato das CDi com diversos produtos proteicos de agentes infecciosos,

exposição a estímulos inflamatórios ou a antígenos não *self*, como aqueles expressos no rim do doador (117-119), induz a mudanças substanciais na sua biologia, alterando a morfologia (120-123), capacidade migratória (124-127), expressão de moléculas de superfície (128,129) e função fagocitária (130-132) destas células. As CDm, então em seu estado maduro, capturam, processam e apresentam antígenos na fenda do CPH aos linfócitos T naïve através do receptor de células T (primeiro sinal). As CDm passam a expressar moléculas co-estimulatórias como CD40, B7.1 e B7.2, PD-L1 e PD-L2, e HVEM, e também secretam citocinas com IL-1, IL-10, IL-12 e interferon- γ , que interagem com seus ligantes na superfície dos linfócitos (segundo sinal), iniciando a resposta imune que culminará na expansão clonal e diferenciação das células T até a fase efetora de citotoxicidade (perforina, granzima e FasL) e ativação de células B (produção de anticorpos) para destruição do enxerto, caracterizando a rejeição celular aguda do aloenxerto renal, como ilustrado na Figura 6 (133).

As CDm humanas (ativadas) no sangue periférico possuem um marcador de superfície específico, a molécula CD83, que é uma proteína glicosilada Ig-like tipo I de 45 kD (134). Existem evidências de que esta molécula é responsável pela regulação da maturação de células T no timo e ativação de células T periféricas (135). Kruse et al demonstraram recentemente que a inibição da expressão de CD83 na superfície celular da CDm leva a uma redução drástica da sua capacidade estimulatória de células T (136).



1. Injúria da isquemia-reperfusão

- Dano ao enxerto
- Resposta imune inata
- Recrutamento de células inflamatórias
- Início da resposta adaptativa

2. Apresentação do antígeno

- Migração de CD para OLS
- Alo reconhecimento direto/indireto
- Interação do CPH com célula T

3. Ativação células T

- Sinalização do RCT
- Coestimulação
- Produção de citocinas
- Expansão clonal

4. Funções efetoras

- Hipersensibilidade retardada
- Produção de Ac
- Citotoxicidade

5. Rejeição do enxerto

- Infiltração leucocitária
- RA mediada por células T
- RA mediada por Ac
- Dano ao enxerto

Figura 6. Geração da resposta aloimune. CD=célula dendrítica, OLS=órgão linfóide secundário, CPH=complexo principal de histocompatibilidade, RCT=receptor de célula T, Ac=anticorpo, RA=rejeição aguda (Adaptado da referência 133).

Recentemente tem sido investigado o papel das células dendríticas na indução das células T com capacidade supressora e seu papel na geração e manutenção da tolerância periférica, efeito demonstrado em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* em camundongos (137,138).

Estudos recentes demonstram que a expansão de Tregs por CDs pode ocorrer *in vitro* (139) e *in vivo* (140-142), e que após a expansão estas células

mantêm as características funcionais, ou seja, são capazes de suprimir a resposta imune.

Min et al. (143), em um modelo murino de transplante cardíaco, demonstraram que a interação de CDi e Tregs é importante para a manutenção da função do órgão transplantado. As CDs isoladas de receptores tolerantes ao enxerto cardíaco foram capazes de induzir a geração de novas Tregs, e a cocultura dessas células com CDs de camundongos não estimulados foi capaz de gerar CDs com propriedades reguladoras. Estes resultados são consistentes com a noção de que a indução de tolerância está associada a um ciclo regulatório auto-sustentável e bidirecional, onde as CDs tolerogênicas induzem a geração de Tregs a partir de células T naïve e as Tregs promovem a geração de CDs tolerogênicas de progenitores das CDi.

Yamazaki et al. (140) em estudo com camundongos, demonstraram que o desenvolvimento de células T CD4+CD25+ requer o contato das CDs com as células T, sendo parcialmente dependente da produção de pequenas quantidades de IL-2 e co-estimulação por B7 expresso nas CDs. As CDs também podem expandir as células T CD4+CD25+ na ausência de antígeno específico, mas neste contexto necessita da presença de IL-2 exógena. *In vivo*, as CDs tanto em estado imaturo quanto maduro induzem a expansão de células T CD4+CD25+ com transferência passiva dessas células para camundongos. A capacidade de expandir células T CD4+CD25+ confere às CDs um mecanismo adicional para a regulação da autoimunidade e de outras respostas imunes, como na transplantação de órgãos.

Orchando et al. (144) identificaram CD plasmocitárias (CDp) como essenciais para a tolerância de aloenxertos cardíacos. Nos linfonodos as CDp

apresentadoras de aloantígeno induziram a geração de células T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺. A depleção da CDp inibe o desenvolvimento de Tregs periféricas e a indução de tolerância, contudo a transferência de CDp tolerogênicas induzem o desenvolvimento de Tregs, prolongando a sobrevida do enxerto.

Yamazaki et al. (140) sugerem que a expansão de Tregs a partir de um repertório policlonal via CD pode permitir o controle de reações imunes indesejadas antígeno-específicas. Estes autores postulam que as CD alogênicas são mais efetivas que as células esplênicas alogênicas na expansão de Tregs CD4⁺CD25⁺, sendo que estas seguem expressando elevados níveis de FOXP3, mesmo sem a presença de IL-2.

Desta forma, existem evidências de que o delicado balanço entre imunidade e tolerância é mantido através da relação entre CDs e Tregs, sendo que o conhecimento das interações entre estes dois tipos celulares e das condições que favorecem o aumento do número e função das células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, é de grande relevância no contexto da transplantação de órgãos, considerando-se que esta subpopulação de células pode ser utilizada como estratégia terapêutica na indução da tolerância imunológica.

2.9. Efeito das drogas imunossupressoras sobre as Tregs FOXP3⁺

As drogas imunossupressoras utilizadas a curto e longo prazo no transplante de órgãos exercem diferentes efeitos sobre as Tregs. A maioria dos imunossupressores tem como alvo os sinais intracelulares envolvidos na ativação das células T após apresentação do antígeno, e estudos *in vitro* induzindo a expansão das Tregs em cultura tem possibilitado avaliar o efeito individual dessas drogas. Os resultados de estudos clínicos recentes evidenciam efeitos de

estimulação, inibição ou não interferência dos diferentes imunossupressores sobre número e função das Tregs, resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Efeito das drogas imunossupressoras sobre as Tregs

<i>Imunossupressor</i>	<i>Efeitos sobre as Tregs*</i>
Corticosteróides	Estímulo à expressão de FOXP3, preservam atividade supressora e sobrevivência das Tregs
Inibidores da calcineurina	Inibem a expressão de FOXP3 e possivelmente suprimem a função das Tregs
Inibidores da mTOR	Preservam atividade supressora e sobrevivência das Tregs
Micofenolato mofetil	Não afeta o número e função das Tregs circulantes
Bloqueadores de IL-2R**	Efeitos variáveis; os dados ainda controversos
Anitcorpos depletadores de células T***	Possível indução de expansão <i>in vitro</i> sem afetar as Tregs <i>in vivo</i>

*Resultados de estudos *in vitro* e *in vivo* mas as evidências em pacientes ainda são escassas; **Basiliximab, daclizumab; ***Globulina anti-timocitária, alemtuzumab (anti-CD52)

2.9.1. Corticosteróides

Os corticosteróides inibem fatores de transcrição, como NF- κ B e AP-1, que induzem a transcrição dos genes da IL-2, TNF- α e INF- γ . As células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ expressam o receptor do GITR, regulador da função das Tregs que induz tolerância periférica. Em estudo experimental, a dexametasona induziu a expressão do FOXP3 e IL-10 em curto e longo prazo em cultura de células T, preservando a capacidade supressora das Tregs (145). Os

corticosteróides *in vitro* melhoram a função supressiva e a sobrevivência das Tregs, e é possível que exerçam o mesmo efeito *in vivo* (146).

2.9.2. Inibidores da calcineurina

Drogas como ciclosporina e tacrolimus atuam pela inibição da calcineurina, suprimindo a produção de IL-2 e citocinas relacionadas, por inibirem a ativação do NFAT. Existem estudos *in vivo* que mostram um efeito negativo dos IC sobre as Tregs, com redução abrupta e marcada das Tregs em compartimentos periféricos, que pode ser revertido com a administração de IL-2 (33). Sugere-se que os IC possam interferir na função das Tregs justamente por inibir a IL-2, essencial para a sua homeostase.

San Segundo et al (42) avaliaram transplantados renais com função estável tratados com IC ou rapamicina, observando após 12 meses um número significativamente menor de células T $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ no grupo com IC, medido por citometria de fluxo, embora com mesmo nível de expressão de FOXP3. Neste estudo, a adição de Tregs em reação mista de linfócitos, retiradas dos pacientes em uso de rapamicina, inibiu em 35% a proliferação de células T $CD4^+CD25^-$. Baan et al (41), estudando transplantados cardíacos, observaram que tacrolimus e ciclosporina, assim como anticorpo anti-IL-2, inibiram em 80% a transcrição do gene de FOXP3 *in vitro*, o que não ocorreu com a rapamicina. Apesar de inibir a produção de IL-10, a rapamicina poupou o $TGF\beta$ que induziu um fenótipo regulatório em células $CD4^+CD25^-$. Esses dados sugerem que os IC parecem atuar negativamente no processo de indução de tolerância.

2.9.3. Inibidores da mTOR

Atuando pelo bloqueio da mTOR, sirolimus e everolimus impedem a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular, inibindo a via de sinalização da IL-2. Estudo inicial *in vitro* não observou efeito da rapamicina sobre a expressão do FOXP3 ou atividade supressiva das Tregs durante estimulação alogênica em humanos (41). Estudos *in vivo* (32) tem demonstrado que o tratamento com rapamicina tem efeitos favoráveis sobre as Tregs, induzindo expansão *ex vivo* de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ e prevenindo a rejeição de transplante de ilhotas, possivelmente por mecanismo dependente de TGFβ₁. Diferente dos IC, estudos clínicos mostram que a rapamicina favorece a sobrevivência e função das Tregs e, pela supressão das células T efetoras, move o balanço da resposta aloimune em direção ao tipo protetor ao invés de destrutivo (41-44). No estudo de Hendrikx et al (44), transplantados renais estáveis foram convertidos a monoterapia com tacrolimus, rapamicina ou micofenolato mofetil, usando prednisona apenas no primeiro mês. Seis meses após, e somente no grupo rapamicina, houve aumento significativo das Tregs CD4⁺CD25^{bright+}Foxp3⁺ circulantes, fenotipadas como Tregs de memória central ou efetora por citometria de fluxo. Postula-se que estes efeitos da rapamicina resultem da manutenção da produção de IL-2 e de CD25, e pela ausência da sinalização da via da mTOR (43). Dois aspectos, entretanto, devem ser mencionados. A maioria dos pacientes nos estudos citados estava em uso de duas ou mais drogas imunossupressoras, o que dificulta a interpretação desses dados. E também, ainda é controverso se o aumento da proporção de Tregs supressoras observado com o uso de rapamicina contribui para uma resposta imune mais tolerogênica e maior sobrevivência do enxerto renal.

2.9.4. Derivados do ácido micofenólico

O micofenolato mofetil (MMF) e o micofenolato sódico são uma pró-droga do ácido micofenólico, inibidor da inosina monofosfato desidrogenase, que bloqueia a síntese de novo dos nucleotídeos da guanosina, necessária para a proliferação das células T. O MMF diminui a expressão de CD25 de forma dose dependente, mas em um estudo (33), o ácido micofenólico não alterou a expressão de FOXP3 e não afetou a capacidade supressora das Tregs. Apesar deste efeito “neutro” do MMF, o uso concomitante de outros imunossuppressores torna difícil avaliar a ação individual do MMF sobre as Tregs (43).

2.9.5. Anticorpos bloqueadores do receptor da IL-2

Fazem parte desse grupo o anticorpo quimérico basiliximab e o anticorpo humanizado daclizumab, que interferem diretamente com a sinalização por inibir a ligação entre IL-2 e seu receptor (IL-2R) e subsequente fosforilação das cadeias alfa e beta do IL-2R. O efeito dos bloqueadores do IL-2R sobre as Tregs ainda é controverso, com estudos mostrando inibição da indução do RNAm de FOXP3 por daclizumab (41), não interferência de basiliximab na atividade supressora das Tregs *in vitro* (147) e do daclizumab *in vivo* (148), ou mesmo inativação das Tregs supressoras sem reduzir quantitativamente o número de células circulantes (149). Em estudo clínico, Bluestone et al (45) compararam o efeito da indução com basiliximab e manutenção com belatacept (CTLA4-Ig) ou ciclosporina (todos os pacientes com MMF e prednisona) sobre as Tregs circulantes e sobre a expressão proteica de FOXP3⁺/CD3⁺ em biópsias do enxerto renal. Foram incluídos pacientes de um estudo de fase II com até 5 anos de acompanhamento (150). Até 90 dias, ocorreu redução de até 50% no número de Tregs FOXP3⁺

atribuída ao basiliximab, recuperação das Tregs após 3 meses e a longo prazo não houve diferença de efeito do basiliximab/belatacept versus basiliximab/cliclosporina no número ou função efetora das Tregs circulantes. Entretanto, uma proporção significativamente maior de células FOXP3+ em relação ao total de linfócitos CD3 foi detectada nas biópsias de pacientes em uso de belatacept. Não há menção à função ou sobrevida de enxerto nesse estudo.

2.9.6. Anticorpos depletadores de células T

Além de causar imunodepleção, a globulina anti-timocitária (ATG) e o anticorpo anti-CD52 alemtuzumab (Campath) também podem induzir as Tregs. A ATG causou uma rápida e sustentada expansão das Tregs em cultura de linfócitos humanos com alta expressão do FOXP3 (151). Em modelo experimental em ratos, o tratamento com anticorpo anti-linfocitário poupou células T CD25⁺, recuperou precocemente Tregs com fenótipo supressor e promoveu o controle da progressão do ciclo celular T CD4⁺ estimulada por antígeno (152). Esses dados sugerem que os anticorpos anti-linfocitários podem ser úteis em protocolos de expansão das Tregs e indução de tolerância *in vivo*.

Capítulo 3. Justificativa

As células T reguladoras (Tregs) CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ naturais derivadas do timo ou induzidas na periferia a partir de células T naïve produzem anergia e hiporesponsividade a estimulação antigênica em doenças auto-imunes, tumores e rejeição de enxertos. As Tregs podem assim ser exploradas para prevenção e tratamento dessas condições, e particularmente, para a indução de tolerância em transplante de órgãos. Os mecanismos de supressão das Tregs são múltiplos e tem sido intensamente estudados na última década. O fator de transcrição FOXP3 foi identificado como um marcador específico das Tregs e a sua deficiência está associada ao desenvolvimento de doenças auto-imunes, lesão em múltiplos órgãos e talvez evolução funcional desfavorável do rim transplantado. A expressão aumentada do gene de FOXP3 e de sua proteína, vem sendo demonstrada em enxertos com rejeição celular aguda, tanto no tecido renal como no sangue periférico e em células da urina destes pacientes. Entretanto, ainda não é claro se a presença das Tregs ocorre puramente por migração e retenção no enxerto para controle do processo inflamatório, ou se é induzida por mecanismo antígeno-dependente para, além de suprimir células T efectoras, direcionar a resposta imune para aquisição de tolerância. É possível que a indução do gene de FOXP3 direcione a um programa de aquisição de tolerância, podendo potencialmente influenciar a sobrevida em longo prazo de tecidos e órgãos transplantados.

Recentemente tem sido investigado o papel das células dendríticas na indução das células T com capacidade supressora e seu papel na geração e manutenção da tolerância periférica, efeito demonstrado em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* em camundongos

As drogas imunossupressoras modulam o número e função das Tregs circulantes e o nível de expressão de FOXP3 nestas células. Apesar das evidências

experimentais e clínicas apontarem efeitos benéficos dos inibidores da mTOR e negativos dos inibidores da calcineurina, é difícil separar os efeitos das outras drogas imunossupressoras utilizadas concomitantemente na transplantação clínica.

A relevância do significado clínico e imunológico das células T reguladoras e do fator de transcrição FOXP3 no transplante renal tem gerado inúmeros estudos experimentais e clínicos sobre a sua influência da presença das Tregs para controle da rejeição e indução do fenômeno de “aceitação” do aloenxerto. Neste cenário, este estudo teve como objetivo avaliar a expressão gênica e proteica do fator de transcrição FOXP3 em biópsias do enxerto renal e sua associação com o diagnóstico histopatológico, a função e a sobrevida do enxerto, bem como avaliar a associação entre expressão de FOXP3 e de células dendríticas marcadas por CD83 no infiltrado celular do rim transplantado.

Capítulo 4. Objetivos

4.1. Primário

Avaliar a expressão gênica e proteica do fator de transcrição FOXP3 em biópsias por indicação do enxerto em receptores de transplante renal e sua associação com a função e sobrevida do enxerto após transplante.

4.2. Secundários

Quantificar a expressão gênica e protéica do fator de transcrição FOXP3 em receptores de transplante renal com diagnóstico histopatológico de rejeição aguda, fibrose intersticial/atrofia tubular ou alterações não relacionadas à rejeição.

Avaliar a correlação entre expressão do RNAm e da proteína de FOXP3 nas biópsias do enxerto renal.

Avaliar a associação entre células FOXP3⁺ e células apresentadoras do antígeno CD83⁺ no infiltrado celular do enxerto renal.

Avaliar a associação entre expressão gênica e proteica de FOXP3 e parâmetros demográficos, tipo de doador, compatibilidade HLA, tipo de terapia de indução, esquema imunossupressor, proteinúria, função e sobrevida do enxerto a longo prazo.

Capítulo 5. Referências Bibliográficas

1. Registro Brasileiro de Transplantes. Ano XV, número 2, janeiro/junho de 2011. Disponível em <http://www.abto.org.br/abtov02/portugues/populacao/rbt/mensagemRestrita.aspx?idCategoria=2>. Acessado em 14 de setembro de 2011.
2. Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. N Engl J Med 1994; 331:365.
3. Schnuelle P, Lorenz D, Trede M, Van Der Woude FJ. Impact of renal cadaveric transplantation on survival in end-stage renal failure: evidence for reduced mortality risk compared with hemodialysis during long-term follow-up. J Am Soc Nephrol 1998; 9:2135.
4. Port FK, Wolfe RA, Mauger EA, et al. Comparison of survival probabilities for dialysis patients vs cadaveric renal transplant recipients. JAMA 1993; 270:1339.
5. Ojo AO, Port FK, Wolfe RA, et al. Comparative mortality risks of chronic dialysis and cadaveric transplantation in black end-stage renal disease patients. Am J Kidney Dis 1994; 24:59.
6. Annual Report 2009: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Disponível em: http://www.usrds.org/adr_2009.htm. Acessado em 11 de setembro de 2011
7. Bastos MG, Medeiros R, Manfro, RC. Transplante renal. Rev Ass Med Bras 1994; 40: 283- 92.
8. Jordan SC, Quartel AW, Czer LS et al. Posttransplant therapy using high-dose human immunoglobulin (intravenous gammaglobulin) to control

- acute humoral rejection in renal and cardiac allograft recipients and potential mechanism of action. *Transplantation* 1998; 66: 800-5.
9. Cecka JM. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. *Clin Transplant* 1999; 1-21.
 10. Morris PJ. Results of Renal Transplantation. In: Morris PJM, editor. *Kidney Transplantation. Principles and Practice*. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995.
 11. McWhinnie DL, Thompson JF, Taylor HM et al. Morphometric analysis of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labeling in sequential human renal allograft biopsies. *Transplantation* 1986; 42: 352.
 12. Aquino-Dias EC. Marcadores moleculares na rejeição aguda subclínica. Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas: Nefrologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2003.
 13. Colvin, R. B. e Nickeleit, V. Renal Transplant Pathology. In: J. Jennette, J. Olson, M. Schwartz e F. Silva, editors. *Heptinstall's Pathology of the Kidney*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2006. p. 1347-1490.
 14. Hoffmann, S. C., Hale, D. A., Kleiner, D. E., Mannon, R. B., Kampen, R. L., Jacobson, L. M., et al. Functionally significant renal allograft rejection is defined by transcriptional criteria. *Am J Transplant*. 2005;5(3):573-81.
 15. Bonsib, S. M., Abul-Ezz, S. R., Ahmad, I., Young, S. M., Ellis, E. N., Schneider, D.L., et al. Acute rejection-associated tubular basement membrane defects and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int*. 2000;58(5):2206-14.

16. Tinckam, K. J., Djurdjev, O. e Magil, A. B. Glomerular monocytes predict worse outcomes after acute renal allograft rejection independent of C4d status. *Kidney Int.* 2005;68(4):1866-74.
17. Colvin, R. B. e Smith, R. N. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(10):807-17.
18. Cornell, L. D., Smith, R. N. e Colvin, R. B. Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:189-220.
19. Sis, B., Campbell, P. M., Mueller, T., Hunter, C., Cockfield, S. M., Cruz, J., et al. Transplant glomerulopathy, late antibody-mediated rejection and the ABCD tetrad in kidney allograft biopsies for cause. *Am J Transplant.* 2007;7(7):1743-52.
20. Ashton-Chess, J., Brouard, S. e Souillou, J. P. Is clinical tolerance realistic in the next decade? *Transpl Int.* 2006;19(7):539-48.
21. Silva HM. Tolerância operacional no transplante renal humano: repertório de linfócitos B e de alo e autoanticorpos. Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências Programa de: Alergia e Imunopatologia. São Paulo, 2011.
22. Kyewski, B. e Klein, L. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:571-606.
23. Schwartz, R. H. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol.* 2005;6:327.

24. Wells, A. D., Li, X. C., Strom, T. B. e Turka, L. A. The role of peripheral T-cell deletion in transplantation tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001;356(1409):617-23.
25. Knoechel, B., Lohr, J., Zhu, S., Wong, L., Hu, D., Ausubel, L., et al. Functional and molecular comparison of anergic and regulatory T lymphocytes. *J Immunol.* 2006;176(11):6473-83.
26. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. e Toda, M. Immunologic selftolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151-64.
27. Piccirillo, C. A. e Shevach, E. M. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol.* 2001;167(3):1137-40.
28. Dummer CD, Nowotny VC, Gonçalves LFS, Manfro RC, Veronese FJV. FOXP3+ regulatory T cells: from suppression of rejection to induction of renal allograft tolerance. *Transpl Immunol* 2012;26:1-10.
29. Veronese FV, Rotman S, Smith RN, Della Pelle T, Farrell M, Kawai T, et al. Pathological and clinical correlates of FOXP3+ cells in renal allografts during acute rejection. *Am J Transplant* 2007; 7:1-9.
30. Zheng XX, Sanchez-Fueyo, Domenig C, Strom TB. The balance of deletion and regulation in allograft tolerance. *Immunol Rev* 2003; 196: 75-84.
31. Bunnag S, Allanach K, Jhangri GS, Sis B, Einecke G, Mengel M, Mueller TF, Halloran PF. FOXP3 expression in human kidney transplant biopsies

- is associated with rejection and time post transplant but not with favorable outcomes. *Am J Transplant*. 2008 Jul;8(7):1423-33.
32. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Blood* 2005; 105: 4743-8.
 33. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, Buess M, Schulz S, Baker J et al. Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin production. *Blood* 2006; 108: 390-9.
 34. Manfro RC, Gonçalves LF, Saitovitch D. Revisão/Atualização em Transplante Renal: Progressos na Indução de Tolerância em Transplantes Humanos. *J Bras Nefrol*, 1999; 21(3):130-142.
 35. Liu Y J. A unified theory of central tolerance in the thymus. *Trends Immunol*. 2006;27(5):215-21.
 36. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345-52.
 37. Fontenot J, Rudensky A. A well-adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005; 6: 331-7.
 38. Jiang S, Lechler RI. Regulatory T cells in the control of transplantation tolerance and autoimmunity. *Am J Transplant* 2003; 3: 516-24.
 39. Li XC, Turka LA. An update on regulatory T cells in transplant tolerance and rejection. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6: 577-83.
 40. López-Hoyos M, Segundo DS, Fernández-Fresnedo G, Marin MJ, González-Martin V, Arias M. Regulatory T cells in renal transplantation

- and modulation by immunosuppression. *Transplantation* 2009; 88(3 Suppl): S31-S39.
41. Baan CC, van der Mast BJ, Klepper M, Mol WM, Peeters AMA, Korevaar SS, Balk AHMM, Weimar W. Differential effect of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the induction of FOXP3 in human T cells. *Transplantation* 2005; 80(1): 110-7.
 42. Segundo DS, Ruiz JC, Izquierdo M, Fernández-Fresnedo G, Gómez-Alamillo C, Merino R, et al. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation* 2006; 82: 550-7.
 43. Demirkiran A, Hendrikx TK, Baan C, van der Laan LJ. Impact of immunosuppressive drugs on CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells: does in vitro evidence translate to the clinical setting? *Transplantation* 2008; 85: 783-9.
 44. Hendrikx TK, Velthuis JHL, Klepper M, van Gurp E, Geel A, et al. Monotherapy rapamycin allows an increase of CD4⁺CD25^{bright}FoxP3⁺ T cells in renal recipients. *Transplant Int* 2009; 22: 884-91.
 45. Bluestone JA, Liu W, Yabu JM, Laszik ZG, Putnam A, Belingheri M, et al. The effect of costimulatory and interleukin 2 receptor blockade on regulatory T cells in renal transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 2086-96.
 46. Maggi E, Cosmi L, Liotta F, Romagnani P, Romagnani S, Annunziato F. Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev* 2005; 4: 579-86.
 47. Fehévari Z, Sakaguchi S. Development and function of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 203-8.

48. Chen D, Zhang N, Fu S, Schröppel B, Guo Q, Garin A, et al. CD4+CD25+ regulatory T-cells inhibit the islet innate regulatory immune response and promote islet engraftment. *Diabetes* 2006; 55: 1011-21.
49. Wysocki CA, Jiang Q, Panoskaltis-Mortari A, Taylor PA, McKinnon KP, Su L, et al. Critical role for CCR5 in the function of donor CD4+CD25+ regulatory T cells during acute graft-versus-host disease. *Blood* 2005; 106: 3300-7.
50. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4- naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998; 10: 1969-80.
51. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 2005; 6: 338-44.
52. Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Adv Immunol* 2003; 81: 331-71.
53. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4+CD25+ regulatory cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β . *J Exp Med* 2001; 194: 629-44.
54. Disponível em:
<http://www.ebi.ac.uk/pdbesrv/view/entry/2hfh/visualisation.html>. Acesso em: 04 de julho de 2011
55. Hanel S, Velavan TP, Kremsner P, Kun J. Novel and functional regulatory SNPs in the promoter region of FOXP3 gene in a Gabonese population. *Immunogenetics* (2011) 63:409–415.

56. Genetic Home Reference (2011). Genes. Disponível em <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/FOXP3>. Acesso em 1º de julho de 2011.
57. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001 Jan;27(1):20-1).
58. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001; 27: 68-73.
59. Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and reproduction: sex linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 1969; 166: 753-55.
60. Penhale WJ, Farmer A, McKenna RP, Irvine WJ. Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. *Clin Exp Immunol* 1973; 15: 225-36.
61. Powell BR, Buist NR, Stenzel P. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J Pediatr* 1982; 100: 731-7.
62. Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15: 430-5.

63. Zheng SG, Wang JH, Grfay JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and induced CD4⁺CD25⁺ cells educate CD4⁺CD25⁻ cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF β , and IL-10. *J Immunol* 2004; 172: 5213-21.
64. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptative Foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009; 30: 626-35.
65. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity* 2005; 22: 329-41.
66. Sanchez-Fueyo A, Sandner S, Habicht A, Mariat C, Kenny J, Degauque N, et al. Specificity of CD25⁺-CD4⁺ regulatory T function in alloimmunity. *J Immunol* 2006; 176: 329-34.
67. Knoechel B, Lohr J, Kahn E, Bluestone JA, Abbas AK. Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. *J Exp Med* 2005; 202: 1375-86.
68. Vasu C, Prabhakar BS, Hoeltermann MJ. Targeted CTLA-4 engagement induces CD4⁺-CD25⁺CTLA-4 high T regulatory cells with target (allo)antigen specificity. *J Immunol* 2004; 173: 2866-76.
69. Yong Z, Chang L, Mei YX, Yi L. Role and mechanisms of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance. *Transpl Immunol* 2007; 17: 120-29.
70. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Saakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells involves a

- granzyme-B dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 2005; 174: 1783-86.
71. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD25⁻CD4⁺ naïve T cells to CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; 198: 1875-86.
72. Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen H, et al. TGF- β induces Foxp3⁺ T regulatory cells from CD4⁺CD25⁻ precursors. *Am J Transplant* 2004; 4: 1614-27.
73. Shen W, Whal SM. TGF β : the missing link in CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell mediated immunosuppression. *Cyto Growth Factors Rev* 2003; 14: 85-9.
74. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330-6.
75. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057-61.
76. Nishimura E, Sakihama T, Setoguchi R, Tanaka K, Sakaguchi S. Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004; 16:1189-1201.
77. Karim M, Kingsley CI, Bushell AR, Sawitzki BS, Wood KJ. Alloantigen-induced CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells can develop in vivo from CD25⁻CD4⁺ precursors in a thymus-independent process. *J Immunol* 2004; 172: 923-8.

78. Sawitzki B, Kingsley CI, Oliveira V, Karim M, Herber M, Wood KJ. IFN- γ production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo. *J Exp Med* 2005; 201: 1925-35.
79. Lee I, Wang L, Wells AD, Dorf ME, Ozkaynak E, Hancock WW. Recruitment of Foxp3⁺ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. *J Exp Med* 2005; 201: 1037-44.
80. Zelenika D, Adams E, Humm S, Graca L, Thompson S, Cobbold SP, et al. Regulatory T cells overexpress a subset of Th2 gene transcripts. *J Immunol* 2002; 168: 1069-79.
81. Suffia I, Reckling SK, Salay G, Belkaid Y. A role for CD103 in the retention of CD25⁺-CD4⁺ Treg and control of *Leishmania major* infection. *J Immunol* 2005; 174: 5444-55.
82. Zhang N, Schröppel B, Lal G, Jakubzick C, Mao X, Chen D, et al. Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. *Immunity* 2009; 30: 458-69.
83. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10 secreting type 1 regulatory cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006; 212: 28-50.
84. Roncarolo MG, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self-antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 585-98.
85. Bubnoff AV. IAVI Report. Vol. 11 (4), July - Aug. 2007.

86. Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4 and IL-10 dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 2002; 168: 3789-96.
87. Fantini MC, Becker C, Tubbe I, Nikolaev A, Lehr HA, Galle PR, Neurath MF. TGF-beta induced Foxp3+ regulatory T cells suppress Th1-mediated experimental colitis. *Gut* 2005; 55: 671-80.
88. Wolf D, Hochegger K, Wolf AM, Rmpold HF, Gastl G, Tilg H, Mayer G, Gunsilius E, Rosenkranz AR. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:1360-70.
89. Han HS, Jun HS, Utsugi T, et al. A new type of CD4+ suppressor T cells completely prevents spontaneous autoimmune diabetes and recurrent diabetes in syngeneic islet-transplanted NOD mice. *J Autoimmun* 1996; 9:331-339.
90. Coghill JM, Carison MJ, Moran TP, Serody JS. The biology and therapeutic potential of natural regulatory T-cells in the bone marrow transplant setting. *Leuk Lymphoma* 2008; 49: 1860-9.
91. Sugimoto N, Oida T, Hirota K, Nakamura K, Nomura T, Uchiyama T et al. Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int. Immunol* 2006; 18: 1197–209.
92. Getnet D, Maris CH, Hipkiss EL, Grosso JF, Harris TJ, Yen HR et al. Tumor recognition and self-recognition induce distinct transcriptional profiles in antigen-specific CD4 T cells. *J Immunol* 2009; 182: 4675-85.

93. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol* 2010; 184: 3433-41.
94. Getnet D, Grosso JF, Goldberg MV, Harris TJ, Yen HR, Bruno TC et al. A role for the transcription factor Helios in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Mol Immunol* 2010; 47: 1595-600.
95. Lal G, Bromberg JS. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood* 2009; 114: 3727-35.
96. Chai JG, Xue S, Coe D, Addey C, Bartok I, Scott D, et al. Regulatory T cells, derived from naïve CD4⁺CD25⁻ cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation* 2005; 79: 1310-16.
97. Shimizu A, Yamada K, Meehan SM, Sachs DH, Colvin RB. Acceptance reaction: intragraft events associated with tolerance to renal allografts in miniature swine. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 2371-80.
98. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(3): 199-210.
99. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* 2007; 19: 345-54.
100. Radhakrishnan S, Cabrera R, Schenk EL, Nava-Parada P, Bell MP, Van Keulen VP, et al. Reprogrammed FoxP3⁺ T regulatory cells become IL-17⁺ antigen-specific autoimmune effectors in vitro and in vivo. *J Immunol* 2008; 181: 3137-47.

101. Li XC, Rothstein DM, Sayegh MH. Costimulatory pathways in transplantation: challenges and new development. *Immunol Rev* 2009; 229: 271-93.
102. Zheng XX, Sanchez-Fueyo A, Sho M, Domenig C, Sayegh MH, Strom TB. Favorably tipping the balance between cytopathic and regulatory T cells to create transplantation tolerance. *Immunity* 2003; 19:503-14.
103. Muthukumar T, Dadharia D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal allograft recipients. *N Engl J Med* 2005; 353: 2342-51.
104. Louis S, Braudeau C, Giral M, Dupont A, Moizant F, Robillard N, et al. Contrasting CD25^{hi}CD4⁺ T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* 2006; 81: 398-407.
105. Grimbert P, Mansour H, Desvaux D, Roudot-Thoraval F, Audard V, Dahan K, et al. The regulatory/cytotoxic graft infiltrating cells differentiate renal allograft borderline change from acute rejection. *Transplantation* 2007; 83: 341-46.
106. 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: 877-84.
107. Bestard O, Cruzado JM, Rama I, Torras J, Gomà M, Serón D, et al. Presence of Foxp3⁺ regulatory T cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 2020-6.

108. Batsford S, Dickenmann M, Dümmüller U, Hopfer H, Gudat F, Mihatsch M. Is monitoring of FOXP3 Treg cells in renal transplants during acute cellular rejection episodes useful? *Clin Nephrol* 2011; 75: 101-6.
109. Kollins D, Stoelcker B, Hoffman U, Bergler T, Reinhold S, Banas MC, et al. FOXP3+ regulatory T-cells in renal allografts: correlation with long-term graft function and acute rejection. *Clin Nephrol* 2011; 75: 91-100.
110. Haanstra KG, Wubben JA, Koreavaar SS, Kondova I, Baan CC, Jonker M. Expression patterns of regulatory T-cell markers in accepted and rejected nonhuman primate kidney allografts. *Am J Transplant* 2007; 7:2236-46.
111. Dijke IE, Velthuis JHL, Caliskan K, Korevaar SS, Maat AP, Zondervan PE, et al. Intragraft FOXP3 mRNA expression reflects antidonor immune reactivity in cardiac allograft patients. *Transplantation* 2007; 83: 1477-84.
112. Koga T, Duan H, Kazunori U, Furue M. In situ Localization of CD83-Positive Dendritic Cells in Psoriatic Lesions. *Dermatology* 2002;204:100–103.
113. <http://pathogens.plosjournals.org/perlserv/?request=get-document&doi=10.1371/journal.ppat.0030013>. Acesso em: 10 de julho de 2011.
114. Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jul;7(7):543-55.
115. Costa TB. Avaliação Funcional de Células T Reguladoras Geradas in vitro na Modulação da Resposta Imune. São Paulo. Dissertação

[Mestrado em Ciências] – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

116. Prechtel AT, Steinkasserer A. CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Arch Dermatol Res.* 2007 May;299(2):59-69.
117. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 1999;285(5428):736–739.
118. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 1999;285(5428):732–736.
119. Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med* 1999;189(5):821–829.
120. Al-Alwan MM, Liwski RS, Haeryfar SM, Baldrige WH, Hoskin DW, Rowden G, West KA. Cutting edge: dendritic cell actin cytoskeletal polarization during immunological synapse formation is highly antigen-dependent. *J Immunol* 2003;171(9):4479–4483.
121. Burns S, Thrasher AJ. Dendritic cells: the bare bones of immunity. *Curr Biol* 2004;14(22):R965–R967.

122. Dustin ML, Cooper JA. The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol* 2000;1(1):23–29.
123. Shutt DC, Daniels KJ, Carolan EJ, Hill AC, Soll DR. Changes in the motility, morphology, and F-actin architecture of human dendritic cells in an in vitro model of dendritic cell development. *Cell Motil Cytoskeleton* 2000;46(3):200–221.
124. Flores-Romo L. In vivo maturation and migration of dendritic cells. *Immunology* 2001;102(3):255–262.
125. Gunn MD. Chemokine mediated control of dendritic cell migration and function. *Semin Immunol* 2003;15(5):271–276.
126. Randolph GJ. Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Semin Immunol* 2001;13(5):267–274
127. Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Angeli V. Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: recent advances. *Springer Semin Immunopathol* 2005;26(3):273–287.
128. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 1998;28(9):2760–2769.
129. Sozzani S, Allavena P, D’Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R, Mantovani A. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 1998;161(3):1083–1086.

130. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392(6673):245–252.
131. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998;393(6684):474–478.
132. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:271–296.
133. Womer K, Rabb H. Immunologic Principles in Kidney Transplantation. In: Floege J, Johnson RJ, Feehally J. *Comprehensive Clinical Nephrology*. 4th ed. St. Louis: Saunders; 2010. p. 1119.
134. Bluestone, J. A., and A. K. Abbas. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.*2003; 3: 253–257.
135. Reinwald S, Wiethe C, Westendorf AM, Breloer M, Probst-Kepper M, Fleischer B,Steinkasserer A, Buer J, Hansen W. CD83 expression in CD4+ T cells modulates inflammation and autoimmunity. *J Immunol.* 2008 May 1;180(9):5890-7.
136. Kruse M, Rosorius O, Kratzer F, Stelz G, Kuhnt C, Schuler G, Hauber J, Steinkasserer A. Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity. *J Virol* 2000;74(15):7127–7136.
137. Steinbrink K, Wölfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL 10-treated dendritic cells. *J Immunol.* 1997 Nov 15;159(10):4772-80.

138. Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer JP, Cottrez F, Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity*. 2003 May;18(5):605-17.
139. Luo X, Tarbell KV, Yang H, Pothoven K, Bailey SL, Ding R, Steinman RM, Suthanthiran M. Dendritic cells with TGF-beta1 differentiate naive CD4+CD25- T cells into islet-protective Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 20;104(8):2821-6.
140. Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, Steinman RM. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med*. 2003 Jul 21;198(2):235-47.
141. Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, Toy P, Steinman RM. CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med*. 2004 Jun 7;199(11):1467-77.
142. Tarbell KV, Petit L, Zuo X, Toy P, Luo X, Mqadmi A, Yang H, Suthanthiran M, Mojsov S, Steinman RM. Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4+ CD25+ CD62L+ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. *J Exp Med*. 2007 Jan 22;204(1):191-201.
143. Min WP, Zhou D, Ichim TE, Strejan GH, Xia X, Yang J, Huang X, Garcia B, White D, Dutartre P, Jevnikar AM, Zhong R. Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in transplant tolerance. *J Immunol*. 2003 Feb 1;170(3):1304-12.

144. Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, Angeli V, Li Y, Boros P, Ding Y, Jessberger R, Trinchieri G, Lira SA, Randolph GJ, Bromberg JS. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 2006;7(6):652-62.
145. Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Wooley NJ, Hense G, Rickert B, et al. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 173: 2227-33.
146. Chen X, Oppenheim JJ, Winkler-Pickett RT, Ortaldo JR, Howard OM. Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3⁺CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells in vivo and enhances their capacity to suppress EAE. *Eur J Immunol* 2006; 36: 2139-49.
147. Game DS, Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI. Everolimus and basiliximab permit suppression by human CD4⁺CD25⁺ cells in vitro. *Am J Transplant* 2005; 5: 454-64.
148. Hendrikx TK, Klepper M, Ijzermans J, Weimar W, Bann CC. Clinical rejection and persistent immune regulation in kidney transplant patients. *Transpl Immunol* 2009; 21: 129-35.
149. Kohm AP, McMahon JS, Pdojil JR, Begolka WS, DeGutes M, Kasproicz DJ, et al. Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in inactivation, not depletion, of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *J Immunol* 2006; 176: 3301-5.
150. Vincenti F, Larsen C, Durrbach A, Wekerle T, Nashan B, Blancho G, et al. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med* 2005; 353: 770-81.

151. Lopez M, Clarkson MR, Albin M, Sayegh MH, Najafian M. A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory cells. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2844-53.
152. Vanasek TL, Nandiwada SL, Jenkis MK, Mueller DL. CD25+Foxp3+ regulatory cells facilitate CD4+ T cell clonal anergy induction during the recovery from lymphopenia. *J Immunol* 2006; 176: 5880-9.

Capítulo 6. Artigo em Inglês

ANALYZIS OF FOXP3GENE AND PROTEIN EXPRESSIONS IN RENAL ALLOGRAFT BIOPSIES AND THEIR ASSOCIATION WITH GRAFT OUTCOMES

Claus Dieter Dummer¹, Virna Nowotny Carpio¹, Melina da Silva Loreto², Gabriel Joelsons¹, Dirce Maria Carraro³, Eloísa Ribeiro Olivieri³, Roberto Ceratti Manfro^{1,2}, Luiz Felipe Santos Gonçalves^{1,2}, Francisco Veríssimo Veronese^{1,2}

¹Post-Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Division of Nephrology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

³Laboratory of Macromolecules, Hospital AC Camargo, São Paulo, SP, Brazil

Correspondence to: Francisco Veríssimo Veronese MD, PhD. Division of Nephrology, room 2030, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, 90035-003. Brazil. Fax: 55 51 3359-8121. e-mail address: fveronese@hcpa.ufrgs.br

Key words: renal transplantation, graft rejection, regulatory T cells, FOXP3, dendritic cells

Short title: FOXP3⁺ expression in renal allograft rejection

Abstract word count: 359

Text word count:5556

Number of tables: 4

Number of figures: 4

ABSTRACT

Background. The transcription factor FOXP3 is increased in acute rejection in renal transplant recipients, but its influence in graft function and survival is not clear yet, as well as its relation to dendritic cells (DCs). The aim of this study was to correlate FOXP3 gene and protein expression with graft outcomes, and to evaluate its association with antigen presenting cells in kidney graft biopsies.

Methods. We assessed 91 kidney transplant recipients undergoing allograft biopsy for acute or chronic dysfunction, classified by Banff histology. FOXP3 mRNA was analyzed by real-time PCR, and FOXP3 protein and DCsCD83⁺ by immunohistochemistry. All analyzes were done in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. The magnitude of FOXP3 expression was established by the receiver operating characteristics (ROC) curve. Graft function and survival at 5 years post transplantation were assessed, as well as independent predictors of graft loss.

Results. Intra-graft FOXP3 gene and protein expression were significantly correlated ($r=0.541$, $p<0.001$). Both FOXP3 mRNA and protein were increased in patients with acute rejection (AR) as compared to those with no rejection (NR) ($p=0.039$ and $p<0.001$, respectively) or interstitial fibrosis/tubular atrophy (IF/TA) ($p=0.035$ and $p=0.034$, respectively). FOXP3-RNA^{high} ($\geq 2.36 \log_{10}$ RNA^m) or FOXP3-protein^{high} (≥ 2.5 FOXP3⁺ cells/mm²) did not correlate with demographic or transplant variables, but patients with FOXP3-RNA^{high} had higher glomerular filtration rates (GFR) and tended to have a positive delta of GFR at last follow up. CD83⁺ DCs tended to be increased in biopsies with IF/TA as compared to NR ($p=0.065$), but were not associated to AR. Patients with FOXP3-RNA^{high} had more CD83⁺ DCs on biopsy: 0.86 (0.25-4.0) vs. 0.44 (0-1.12) cells/mm², $p=0.032$.

The cumulative 5-year graft survival of these renal allografts was not influenced by FOXP3 mRNA expression (p=0.69, log-rank test). Neither FOXP3 mRNA nor protein was predictors of graft survival, only higher eGFR at biopsy was a protective factor against graft loss.

Conclusions: This study gives support for performing FOXP3 molecular analysis in archival tissue of renal graft biopsies, where FOXP3 mRNA and protein had a good correlation. As expected, there was an increased FOXP3 expression in biopsies with AR, and biopsies with FOXP3-RNA^m^{high} associated with greater number of dendritic cells. In this cohort, FOXP3 was not associated with better renal graft outcomes.

The avoidance of allograft rejection and the development of long-term tolerance in transplantation have been a focus of research. Regulatory T cells (Tregs) and FOXP3 transcription factor promote a state of antigen-specific peripheral tolerance by suppressing activation and expansion of T effector cells under specific conditions, as demonstrated in experimental models (1–5). Attempts to transfer a state of tolerance from animal models to humans have been disappointing. Initial clinical studies showed that combined marrow and kidney HLA-incompatible transplants acquired mixed chimerism, and remained with stable graft function after discontinuation of all immunosuppressive drugs, up to five years of transplant (6).

The transcription factor FOXP3 is the most specific marker of regulatory T cells, and is expressed in CD4⁺CD25⁺ suppressor cells but not in other thymocytes, B cells and NK cells, and is minimal in other T cells as CD8⁺ lymphocytes (2,3,5,7). Clinical studies have identified an increased expression of the FOXP3 gene and/or its protein in renal graft biopsies with acute rejection, and also in urine and blood compartments (8-12). However, the impact of Tregs FOXP3⁺ on graft outcomes seems conflicting in these reports. On one hand, these cells could direct a FOXP3-induced immune response towards suppression of T effector cells, promoting renal graft acceptance with improved function and both short- (8) and long-term survival (11). On the other hand, FOXP3⁺ Tregs would not indicate alloimmunity *per se* but rather act as regulatory cells generated in the inflammatory response of rejection, where Tregs would be involved in time-dependent stabilization of inflammation (13). Currently, the role of Tregs FOXP3⁺ during renal allograft rejection and their impact on graft outcomes remains unclear.

Antigenic stimulation is required for the suppressive action of Tregs, and antigen-presenting cells (APCs) such as dendritic cells (DCs) are involved in this process (14). Mature DCs induce the proliferation of Tregs under experimental conditions and have been used *in vitro* to expand antigen-specific Tregs that suppress graft-versus-host disease (15). Donor-specific antigen-reactive Tregs may develop in transplant recipients as their immune system is continuously exposed to graft alloantigens, allowing sustained expression of FOXP3 and Tregs generation, selection and expansion to control graft rejection and induce and maintain tolerance (14,16).

Immunosuppressive drugs are believed to modulate the number and function of circulating Tregs and FOXP3 expression (17). Experimental and clinical evidence have shown favorable effects of mTOR inhibitors and negative effects of calcineurin inhibitors (CIs) (18), but the concomitant use of other agents in clinical transplantation makes it difficult to understanding their individual effects.

The current study aimed to evaluate gene and protein expression of FOXP3⁺ cells in indication biopsies of renal allografts and to correlate them with antigen presenting cells and graft outcomes. We hypothesized that dendritic cells are present along with FOXP3 in interstitial infiltrates during acute rejection and in the late post-transplant period.

RESULTS

From the 96 renal transplant recipients included in the study, five who had normal graft biopsies served as calibrators to normalize FOXP3 mRNA expression, and were not included in the analysis. Ninety-one were included, of

which 53 (58.2%) were males and 82 (86.3%) were caucasians. Their mean age was 44.1 ± 12.8 years. Ninety-six percent of the patients were receiving CIs (cyclosporine or tacrolimus), 89% mycophenolate mofetil (MMF) or mycophenolate sodium, 6% rapamycin, and 2.2% azathioprine. Sixty (65.9%) patients underwent induction therapy, of which 56% with anti-CD25, 2.2% with antithymocyte globulin (ATG) and 7.7% with OKT3 monoclonal antibody.

The patients were classified according to Banff 2007 Working Classification as no rejection (NR) (23 cases; 25.3%), acute rejection (AR) (39 cases; 42.9%), and IF/TA (29 cases; 31.9%). No rejection included biopsies with acute tubular necrosis (n=12), calcineurin inhibitor toxicity (n=5) or borderline changes (n=4). AR included acute cellular rejection (n=35, with 2 cases with mixed rejection) and pure humoral rejection (n=3). As anti-HLA donor antibodies were not measured, a presumptive diagnosis of humoral rejection was defined by C4d-positive and specific morphological features.

There was no significant difference between the groups regarding demographic variables or transplant characteristics, except for time interval between transplant and graft biopsy that, as expected, was higher in the interstitial fibrosis/tubular atrophy (FI/AT) group. Baseline estimated glomerular filtration rate (eGFR) was similar in the three groups.

There were no differences between these three groups in pre-transplant panel reactive antibodies, HLA mismatches and graft function at the time of renal biopsy. Table 1 shows the main demographic and clinical characteristics and transplant-related factors according to the histopathologic classification.

Correlation between FOXP3 mRNA and protein expression and Banff histopathology

FOXP3 protein (cells/m²) and mRNA values were not normally distributed. FOXP3 mRNA required logarithmic transformation (log₁₀) in order to reduce asymmetry.

FOXP3 mRNA levels in renal tissue are shown in Table 2. FOXP3 gene expression was significantly increased in patients with AR as compared to those with no rejection (NR) (p=0.039) or IF/TA (p=0.035). FOXP3 protein expression in biopsies was also significantly increased in patients with AR as compared to those with NR (p<0.001) and those with IF/TA (p=0.034) (Table 2).

FOXP3⁺ cells predominated in aggregates in the interstitial infiltrate, and less frequently in tubules. Few double positive CD8⁺FOXP3⁺ cells were distributed in the interstitium, and FOXP3⁺ cells in glomeruli were rare. Few double CD8⁺FOXP3⁺ cells/mm² were detected in graft biopsies. Average numbers of these cells were 1.03±1.62 cells/mm² (AR), 0.0±0.0 (NR, p=0.002 vs. AR), and 0.20±0.49 (IF/TA, p=0.009 vs. AR).

Correlation between CD83+ dendritic cell expression and Banff histopathology

CD83+ dendritic cell expression was similar in the three histological Banff categories (p=0.523), as shown in Table 2. However, there was a trend towards a higher density of dendritic cells in biopsies with IF/TA compared to those without rejection (p=0.065), but it did not differ from acute rejection (p=0.630).

Immunostaining of FOXP3 and CD83 positive dendritic cells are illustrated in Figure 1.

Correlation between FOXP3 expression and demographic and clinical variables

The magnitude of FOXP3 expression was established by receiver operating characteristics (ROC) curve. The cutoff for the diagnosis of acute rejection was calculated as the largest area under the curve (AUC), and highest sensitivity and specificity. The AUC of FOXP3 cells/mm² was 0.731, and a cutoff of 2.50 cells/mm² (≥ 2.50 : FOXP3-protein^{high}) was established with 83% sensitivity and 72% specificity; for FOXP3 log₁₀RNAm the AUC was 0.702 and the cutoff was 2.36 log₁₀ mRNA (≥ 2.36 : FOXP3-mRNA^{high}), with 85% sensitivity and 74% specificity. Using these cutoff points, the proportion of patients with AR that showed high FOXP3 in biopsy was significantly greater than those who presented IF/TA, both for log₁₀ mRNA (64% vs. 37%, p=0.026) and protein expression (57% vs. 30%, p=0.029).

A comparison of patients with FOXP^{high} and FOXP^{low} expression in biopsy showed no difference in recipient age, recipient gender or ethnicity, donor type, HLA A, B and Dr mismatches, % panel reactive antibodies (PRA) class I and class II, and time interval between transplant and last eGFR. The urine protein-to-creatinine ratio (data found for fifty patients) at 2 years post-transplant was higher in patients with FOXP^{low} expression (0.86±1.14 vs. 0.23±0.22, p=0.027). In this comparison, however, more patients in the FOXP^{low} groups had IF/TA (70 vs. 30% for mRNA and 64 vs. 36% for protein, p<0.05 for both), which could explain the higher level of proteinuria. This difference in proteinuria was no longer seen at the last follow-up in five years (0.70±1.47 vs. 0.63±1.11, p=0.856).

As for post-transplant time, median of FOXP3 (both mRNA and protein) was similar in early (<6 months) and late (≥ 6 months) graft biopsies. FOXP3 mRNA expression was then measured at three time intervals after transplant: ≤ 6

months, 7-12 months and >12 months when the number of patients was more equally distributed. Taking all biopsies together, FOXP3 mRNA decreased not significantly from the first month to one year post transplant. Stratifying for each Banff category, in patients without rejection and those with acute rejection it was found a slight increase of FOXP3 mRNA from one to twelve months, and the levels decreased thereafter. In IF/TA, there was a slight decrease up to twelve months remaining in the same levels thereafter. However, quantitative differences among these time intervals were not statistically significant, which is probably related to the small sample size in each time interval.

Type of induction therapy was not associated with a specific level of FOXP3 mRNA or protein at biopsy. Analysis of FOXP3 expression comparing patients on rapamycin or CIs (cyclosporine or tacrolimus) showed higher FOXP3 in the former group (2.60 ± 1.59 vs. 2.04 ± 1.29 \log_{10} mRNA, $p=0.37$ and $3.24(0-25.9)$ vs. $1.27(0-3.9)$ cells/mm², $p=0.43$), but these differences were not statistically significant. However, a reliable analysis is impaired due to the small sample size of patients on rapamycin ($n=6$).

Correlation between FOXP3 mRNA and protein, and between FOXP3 and dendritic cells in renal tissue

The Spearman's rank coefficient showed a significant positive correlation between FOXP3 gene and protein expression in renal graft biopsies ($r=0.541$, $p<0.001$), indicating gene transcription and protein translation in parallel.

Patients of the FOXP3^{high} group had a higher number of dendritic cells in biopsy: 0.86 ($0.25-4.0$) vs. 0.44 ($0-1.12$) cells/mm², $p=0.032$. As shown before, CD83⁺ dendritic cells were present in higher numbers in biopsies with IF/TA

when comparing to NR, but it did not differ from AR (Table 2). Taking only the biopsies with acute rejection, no correlation was found between FOXP3 mRNA and CD83⁺ cells ($r=0.166$, $p=0.313$) or FOXP3 protein and CD83 ($r=0.136$, $p=0.408$). But if only biopsies with IF/TA were analyzed, there was a trend to a positive correlation between FOXP3 protein and dendritic cells ($r=0.350$, $p=0.06$), but not for FOXP3 mRNA and dendritic cells ($r=0.166$, $p=0.313$).

Correlation between FOXP3 mRNA and protein expression and 5-year graft function and survival

The level of eGFR at five years post transplantation was similar in patients with FOXP3^{high} and FOXP3^{low} groups. Only at two years eGFR tended to be higher in the high FOXP3 comparing to the low FOXP3 group: 40.6(29.3-58.0) vs. 33.5(19.3-44.7) mL/min/1.73 m² ($p=0.06$). However, at last follow up there was no difference between the two groups: 27.4(11.1-51.6) vs. 20.0(10.8-34.1) mL/min/1.73 m² ($p=0.266$). However, the EEG analysis in patients with acute rejection showed a trend to a better evolution of eGFR in the group FOXP3 mRNA^{high} as compared to FOXP3 mRNA^{low} (Wald Chi-Square: 2,865; $p=0.090$) that was independent of the time point eGFR was measured (Moment-FOXP3 mRNA: Wald Chi-Square: 1.998; $p=0.736$) as presented in Figure 2. No difference was found between FOXP3^{high} and FOXP3^{low} protein expression (Wald Chi-Square: 0.143, $p=0.706$).

In a secondary analysis, we considered as good graft function at five years post transplantation an estimated glomerular filtration rate [eGFR] higher than 30 mL/min/1.73 m². Patients on this range of eGFR had a higher FOXP3 mRNA (2.60 [1.56 to 3.50] vs. 1.93 [0.54 to 2.86] log₁₀ RNAm, $p=0.023$) and protein

expression (3.6 [0 to 9.96] vs. 0.71 [0 to 3.16] cells/mm², p=0.035) as compared to patients with less than 30 mL/min/1.73 m² (Figure 3). Moreover, patients with a positive delta of eGFR over time showed a significantly higher FOXP3 protein expression in graft biopsy (1.958 [0.087 to 7.815] cells/mm²) as compared to those that had a negative change in eGFR (0.519 [0.0 to 2.512] cells/mm², p=0.015). Analyzing FOXP3^{high} and FOXP3^{low} groups (Table 3), there was a trend towards a positive delta of eGFR in patients with high FOXP3 mRNA expression (p=0.08), suggesting an improvement in renal function. However, adjusting the delta of eGFR by total time of observation for each patient, this difference disappeared between FOXP3^{high} and FOXP3^{low} groups.

The cumulative 5-year graft survival of renal grafts was not influenced by FOXP3 mRNA expression, which was 61% and 65.5% for patients in the FOXP3^{high} and FOXP3^{low} group, respectively (p=0.69, log-rank test) as shown in Figure 4. Multivariate Cox regression was performed to assess independent factors associated to graft survival (Table 4). Donor type, HLA mismatch and FOXP3 expression in biopsy were not associated with graft loss in almost five years of follow up. Higher eGFR at renal biopsy was associated with a protective effect against graft loss (HR=0.94, 95% CI 0.90–0.98, p=0.014), and there was a trend to higher risk of graft loss in patients with IF/TA as Banff histology (HR=3.10, 95% CI 0.86–11.2, p=0.082).

DISCUSSION

The transcription factor FOXP3 is the most specific marker of regulatory T cells (Tregs) and is expressed in CD4⁺CD25⁺ suppressor cells. *In vitro* and *in vivo* experimental models have demonstrated that production of Tregs in the periphery

by Foxp3 transfection in naïve T cells can lead to tolerance induction and graft acceptance (19,20). Many clinical studies have identified an increased expression of the FOXP3 gene and/or its protein in kidney grafts with acute rejection using different techniques, such as RT-PCR, flow cytometry, immunohistochemistry, or immunofluorescence (8-13,21,22). However, the clinical significance of the presence and magnitude of FOXP3 expression remains not completely understood.

In this study we investigated FOXP3 mRNA and protein expression in paraffin tissue of kidney graft biopsies for cause. The fact that biopsies were done for graft dysfunction may be selected a high risk population, perhaps not representative of other transplant settings (ie, protocol biopsies in clinically stable patients), which could be a limitation of our study. Both gene and protein expression were significantly higher in patients with acute rejection, confirming what have been described by other investigators in different settings and compartments (8-13,21,22). Tissue FOXP3 gene had an optimal amplification in RT-PCR and correlated positively and significantly with protein expression, suggesting that it is possible to detect gene transcription and translation of protein synthesis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Nevertheless, some issues arise when reverse transcription quantitative PCR is performed in archival tissues, as compared to fresh frozen sections. In formalin-fixed sections it can occur extensive RNA degradation, rupture, and cross links related to the time of core fixation and processing, sometimes not reflecting accurately tissue amounts of mRNA(23-25). Other factors potentially affecting the PCR reaction in paraffin tissue are type of tissue and its processing, genes with low level of expression, extracting method of RNA, and cDNA concentration used as template in PCR

(23-25). However, fixation times ideally between one and three hours can produce reliable quantitative RT-PCR data, as shown by Castiglione et al examining colonic mucosa (26). To overcome the problem of RNA degradation, use of proteinase K digestion and RNA purification protocols have been successful to amplify specific target genes with real time PCR, as demonstrated in archival renal cell carcinomas (27) and in kidney biopsies with tubulointerstitial nephritis (28). Proper normalization can also compensate for the effects of RNA degradation at least for moderately to highly expressed genes whose expression varies significantly between samples (29). In our study, fixation time was not superior to three hours, digestion of proteins was done with a lysis buffer containing proteinase K for RNA extraction and cDNA synthesis, and total RNA isolation was performed using a purification protocol. FOXP3 mRNA samples showed optimal amplification curves and were normalized by a calibrator (graft biopsies diagnosed as histologically normal), to calculate the relative quantification of FOXP3 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) for each case.

Correlations of FOXP3 mRNA and protein expression with demographical and transplant variables were not significant. Regarding immunosuppression, recent clinical studies have evidenced that different immunosuppressive agents can promote stimulation, inhibition or even non-interference on the number and function of FOXP3⁺ Tregs (18,30-33). We could not find a difference in the intragraft expression of FOXP3 comparing basiliximab to ATG and OKT3 for induction therapy, as well as between calcineurin inhibitors and sirolimus-based regimens. However, very few patients were on sirolimus, as this drug is not a first line immunosuppressive therapy in our unit, and instead is used in conversion schemes for intolerance and/or toxicity of other immunosuppressants. Thus, few

patients on sirolimus could be evaluated precluding an accurate analysis. Notwithstanding, other clinical studies did not show either an association between type of immunosuppression and FOXP3⁺ Tregs in kidney graft recipients (13,34).

This study was not designed to determine the variability of intra-graft FOXP3 expression over time, because each patient had only one biopsy for cause and not serial protocol biopsies. In our limited survey analyzing biopsies in three sequential time points, it seems that FOXP3 is higher in the first six months, remains relatively stable up to one year, then begins to decline thereafter. This early increase probably correlates with acute cellular rejection and intense intra-graft inflammation, as shown previously by other authors (8,9,35). A decrease of FOXP3 after one year post transplantation could be related to the occurrence of chronic rejection, which correlated with fewer CD4⁺CD25^{high} Tregs and FOXP3 mRNA in peripheral blood in two studies (21,36), i.e., immune regulatory mechanisms failed to protect the graft against T effector cell injury. In contrary, other authors found higher levels of FOXP3⁺ Tregs late post transplantation, postulating that more Tregs are needed over time to control persistent inflammation to avoid chronic graft injury and provide graft acceptance and better outcomes (37). Alternatively, this phenomenon could not indicate alloimmunity but simply reflect the process of natural stabilization of inflamed sites operated by T regulatory cells, not associated with better graft survival, as suggested by Bunnag et al (13). These authors reported increased FOXP3 expression in late kidney allograft biopsies as compared to early biopsies, which was correlated with inflammation, injury and repair assessed by microarrays of pathogenesis-based transcript sets.

Data on the influence of FOXP3 in graft outcomes are still controversial. In the present study, FOXP3^{high} expression correlated with greater eGFRs and positive delta of eGFR between transplant and last evaluation, but no difference in absolute eGFR level or a better graft survival rate was found at last follow up. In multivariate Cox Regression, FOXP3 was not associated with a risk reduction of graft loss, as was a higher eGFR at the time of biopsy. Muthukumar et al (8) found significantly higher levels of FOXP3 mRNA in urine cells of renal transplant recipients with acute rejection, inversely correlated to serum creatinine. Increased expression of FOXP3 was predictive of graft loss at 6 months. While evaluating patients with subclinical acute rejection, Bestard et al (11) found that presence or absence of an infiltrate rich in FOXP3⁺ Tregs discriminated harmless from injurious infiltrates by predicting a better graft function two and three years post-transplant. Corroborating this data, Zuber et al (37) extended these observations reporting that patients with inflamed fibrosis but a high FOXP3/CD3 ratio within the graft had a significantly better graft survival three years after transplant. In renal transplant recipients with chronic rejection, Louis et al (21) described reduced number of circulating FOXP3⁺ Tregs in patients with chronic rejection, but normal levels in stable grafts without evidence of rejection or in those with tolerance. However, other studies did not demonstrate an association between FOXP3 and favorable graft function or survival outcomes, even restricting the analysis to patients with acute rejection. Unexpectedly, graft survival in patients with acute rejection who presented high expression of FOXP3 was even worse than for those with low FOXP3 expression, that could be related to severe interstitial inflammation (9,13). Recent studies could not demonstrate either a protective effect of FOXP3⁺ Tregs in graft function one year (35) or two

years (12) after transplant, or a reduction in the severity of allograft rejection (12). In a recent systematic review evaluating if CD4⁺FOXP3⁺ Tregs can associate with transplant outcomes in solid organ transplantation, Shan et al (38) included twenty-two cohort or case control publications. In kidney transplantation, serum creatinine level in FOXP3^{high} group was significantly lower at 1-year as compared to FOXP3^{low}, while graft survival did not differ between the two groups. FOXP3⁺ Tregs in graft or urine, and not in peripheral blood, associated better with transplant outcomes. However, these conclusions may be biased due to the low quality and heterogeneity of the available studies. In summary, although FOXP3 molecule seems to have greater predictive value of graft outcome than Banff grading (1), both cannot yet distinguish clearly the type of cellular program that is operating within the graft, i.e., tissue-*destructive* by effector T cells or tissue-*protective* by FOXP3⁺Tregs. At the moment, the effect of FOXP3⁺ Tregs on graft outcomes at least in the long term remains uncertain.

There is a paucity of clinical studies examining if CD83 dendritic cells correlate with FOXP3⁺ cells morphologically. We hypothesized that antigen presenting cells are present along with FOXP3 in interstitial infiltrates, as both molecules are involved in the process of generation and maintenance of immunological tolerance. Experimental studies in islet transplantation demonstrated that induced expansion of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Tregs by DCs in the presence of TGF-β₁ can inhibit autoimmunity in non-lymphopenic mice (39). In another study (40), these investigators showed that rapamcyn-conditioned donor DCs effectively induced CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Tregs (iTregs) in cell culture, which exerted donor-specific suppression *in vitro* and prolonged allogeneic islet graft survival *in vivo*. In this study, iTregs induced endogenous naïve T cells to

convert into CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T cells. Allogeneic DCs in the presence of interleukin-2 in cell culture were much more effective than bulk spleen cells in expanding Tregs, and also sustained the expression of transcription factor Foxp3 in CD4⁺CD25⁺ T cells. These DC-expanded Tregs were potent suppressors of a mixed leukocyte reaction by CD25⁻ CD4⁺ T cells, evidencing that Tregs can be expanded from a polyclonal repertoire by DCs (15).

Studies in humans are lacking to explore if these experimental conditions could be translated to the clinical setting. In gastric cancer, the density of CD83⁺ DCs and Foxp3⁺Tregs was inversely correlated with tumor progression and was prognostic of its evolution (41). In kidney transplantation, Haanstra et al (34) showed in non-human primates with graft rejection that CD83⁺ DCs predominated in nodular infiltrates along with higher number of FOXP3⁺ cells, as compared to non-rejected grafts. In accordance to these data, we found higher density of CD83⁺ DCs in biopsies with high expression of FOXP3. A recent study in human kidney grafts reported that an increased influx of myeloid dendritic cells during acute rejection was associated with interstitial fibrosis and tubular atrophy, predicting loss of graft function after the first year of transplant (42).

A higher number of CD83⁺ DCs was also found in IF/TA, a finding difficult to interpret as absolute levels of FOXP3 mRNA and protein in IF/TA were lower than in acutely rejecting grafts. We would expect such low levels in these biopsies and not the opposite (10). Perhaps one limitation of our study to detect DCs accurately in kidney biopsies was the less sensitive peroxidase technique in paraffin-embedded tissue; Zuidwijk et al (42) demonstrated high density of mature dendritic cells in clusters during acute rejection by immunohistochemistry in cryo sections, because frozen tissue gives better antigen

preservation. Nevertheless, presence of chronic damage could be better explained by other factors not related to failure of FOXP3⁺ cell function, but to chronic calcineurin inhibitor toxicity, donor-related factors, severity of rejection, low compliance, and polyoma virus infection among others.

In conclusion, there was an increased FOXP3 expression in biopsies with acute rejection as expected, and biopsies presenting a high level of FOXP3 associated with greater density of dendritic cells but predominantly in IF/TA, a finding to be further explored. FOXP3 was not associated with better graft outcomes over almost five years of follow up, but greater amounts of both FOXP3 mRNA and protein were found in patients with higher eGFRs. To exclude an effect of FOXP3 on kidney graft function and survival, a study with a larger sample and a longer follow up is still necessary.

Methods

Design

This is a cross-sectional study with collection of historical data.

Patients

Three hundred and thirty-eight renal transplants were performed at the Transplant Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), southern Brazil, from August 2002 to December 2007. From these, 106 transplant recipients submitted to indication graft biopsies and with sufficient archival tissue to the tests were included. Only the first biopsy of each patient was included. The study

protocol was approved by the HCPA Research Ethics Committee (protocol number 00000921).

Clinical and biopsy data

Clinical data were collected retrospectively from renal transplant and pathology databases. Immunosuppression consisted of tacrolimus or cyclosporine, MMF or mycophenolate sodium and prednisone. Six patients received rapamycin. Acute cellular rejection was treated with glucocorticoids, thymoglobulin or muromonab-CD3 (OKT3), and acute humoral rejection with plasmapheresis and intravenous immunoglobulin. Graft failure was defined as return to dialysis therapy.

The following variables were evaluated: age, gender, type of donor, pre-transplant PRA against HLA class I and II and HLA mismatches in loci A, B, and DR. Renal graft function was determined by eGFR using the CKD-EPI equation (43) at biopsy and at months 2, 6, 12, 24, 36 and last follow-up. The rate of improvement or decline in eGFR was estimated by the delta of eGFR (last measured eGFR – eGFR at biopsy). Delta of eGFR was adjusted for total follow up time of each patient. Delayed graft function, time between transplant and graft biopsy (days), and time between transplant and the last follow-up (months) were recorded. A random urine sample was collected to evaluate proteinuria as total urine protein-to-creatinine ratio. A renal pathologist who was blinded to clinical data evaluated histopathological findings of biopsies according to the Banff 2007 update (44).

RNA extraction and cDNA synthesis for real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) of paraffin-embedded tissue sections

Four 5- μ m sections of paraffin-embedded renal tissue were kept at -80°C and deparaffinized using xylene and 100% ethanol. Digestion of proteins and membranes was carried out for 3 hours at 55°C in a lysis buffer containing EDTA (0.025 M), sodium sulfate (0.5%), Tris-HCl (0.01 mM, pH 8.0), NaCl (0.1 M) and proteinase k (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Total RNA isolation was performed using the RNeasy Mini Kit purification protocol (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Total RNA was quantified in the NanoDropTM ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham MA, USA) and treated with DNase-I (Ambion, Grand Island, NY, USA) according to manufacturer's instructions. Only RNA samples with an OD 260/280 ratio >1.8 were further processed. To test the efficacy of DNase treatment, a PCR was performed with initiator oligonucleotides derived from a β -actin gene intronic region (*forward:* GTGTTGTGGGTGTAGGTAC and *reverse:* CATGTCACACTGGGGAAG). The reaction was performed in 40 cycles at 56°C . After treatment, total RNA was quantified again and cDNA synthesis was performed using 1 μg of total RNA, 0.25 μg of oligo dT18 and 3 μg of random oligo dN6 to a final volume of 10 μL , incubated at 65°C for 5 minutes and kept on ice. Ten microliters of a solution containing 1X buffer of enzyme *SuperScript III*, DTT 0.2M, dNTP20 mM, *RNasin* 40U (Promega, Madison, WI, USA) and *SuperScript III* 200U (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) was prepared to a final volume of 20 μL . The solution was incubated at 25°C for 2 minutes and at 42°C for 2 hours. To test for efficacy, a RT-PCR was performed using a housekeeping gene and cDNA as template. The reaction was performed with a paired

temperature of initiators at 60°C (*forward*: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGA-3' and *reverse*: 5'-GGGTCATTGATGGCAAC-3') for 40 cycles. Gel electrophoresis on 8% acrylamide stained with AgNO₃ was performed. Only samples with amplification for GAPDH in RT-PCR were examined by real-time PCR.

Quantitative real-time PCR for FOXP3

The 5' nuclease assay was performed using the ABI 7000 Sequence Detection System and TaqMan Universal PCR Master Mix containing AmpliTaq Gold® DNA polymerase, Amperase UNG, passive reference (ROX), buffer and dNTPs (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The design and synthesis of the primer and fluorogenic probe for FOXP3 (ID: Hs 00203958_m1) mRNA were made by TaqMan Gene Expression Assays® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and had been tested and validated by the manufacturer. Due to its low inter-sample variability, 18S rRNA was used as an endogenous control (Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control Appas Biosystems, Foster City, CA, USA). Gene expression assays consisted of 20x concentration (360 uM) of PCR primers and Taqman MGB® (Minor Groove Binding) probes. The primer used was intron-spanning to avoid genomic DNA amplification (Gene Expression Assays/Custom Primers and Probes; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The TaqMan® probe was labeled with a reported dye (FAM, 6-carboxyfluorescein) at the 5' region and a quencher dye (TAMRA, 6-carboxytetramethyl-rhodamine) at the 3' region, except for the endogenous control 18S rRNA that was labeled with VIC reporter dye. Relative gene expression quantification was measured as fluorescence rise resulting from amplification and probe degradation. The average measure from five samples of patients with histopathological diagnosis of “normal kidney” was used as the calibrator. The

number of cycles at which fluorescence exceeds the detection threshold is called threshold cycle (Ct). A more specific template in a sample results in exceeding fluorescence earlier. The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used in the assays, and steady-state mRNA levels were expressed as an n-fold difference relative to the calibrator.

Immunohistochemistry for FOXP3

Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue with a double marker technique for identification of FOXP3⁺ cells, with or without surface differentiation molecule CD8 (8). Sections were heated in an oven at 60°C for 30 min, deparaffinized in xylene, rehydrated in absolute and 95% ethanol, incubated for 5 minutes in 3% H₂O₂ in methanol to block endogenous peroxidase. Antigen was retrieved using Borg Decloaker™ pH 9.5 (Biocare Medical, Walnut Creek, CA, USA) in a pressure cooker and blocked with normal goat serum 1:50 and avidin D 1:10. Anti-CD8 (clone BC/1A5) monoclonal antibody (Biocare Medical, Walnut Creek, CA, USA) was diluted at 1:25 in Van Gogh Yellow diluent (Biocare Medical, Walnut Creek, CA, USA), and incubated overnight at 4°C. After biotin blockade, slides were incubated with Universal Link biotinylated goat purified anti-mouse IgG (Biocare Medical, Walnut Creek, CA, USA) for 20 min, followed by streptavidin-horseradish peroxidase (Biocare Medical, Walnut Creek, CA, USA) for 20 min, and developed with 3,3'-diaminobenzidine. All steps included washing with TBS/Tween 20. Slides were then incubated in sequence for blocking steps with 1% TBS/BSA for 20 min, 5% skim milk in TBS for 20 min and normal goat serum 1:50 and avidin D 1:10 for 20 min. A rabbit polyclonal anti-FOXP3 antibody (ab10563, Abcam, Cambridge, MA, USA) diluted at 1:800 in Van Gogh

Yellow was incubated overnight at 4°C.

After biotin blockade, a biotinylated goat anti-rabbit IgG secondary antibody was used for 35 min followed by avidin-biotinylated-alkaline phosphatase complex (ABC-AP, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 60 min. All steps included washing with TBS/Tween 20 and TBS only before developing FOXP3 staining. Tissue sections were developed with Vector Blue™ alkaline phosphatase substrate (Vector) and mounted in Faramount (DAKO, Carpinteria, CA, USA).

According to previous data (8) the vast majority of FOXP3⁺ cells express CD4 (around 96%) and few FOXP3⁺ cells express CD8. For technical reasons, we did not perform CD4 T cell staining, so we assumed that total FOXP3 expression would be represented by single FOXP3⁺ cells plus double CD8⁺FOXP3⁺ cells.

Immunohistochemistry for CD83⁺ dendritic cells

Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Sections were heated in an oven for 30 min at 60°C, deparaffinized in xylene, rehydrated in absolute and 95% ethanol, incubated for 5 minutes in 4.5% H₂O₂ in methanol to block endogenous peroxidase. Antigens were retrieved with Antigen Decloaker™ pH 6.0 (Biocare Medical, Walnut Creek, CA, USA) in a pressure cooker, and blocked with normal goat serum 1:50 and avidin D 1:10. Anti-CD83 (ab49324, Abcam, Cambridge, MA, USA) monoclonal antibody (Biocare Medical, Walnut Creek, CA, USA) was diluted at 1:100 in Renaissance diluent (Biocare Medical, Walnut Creek, CA, USA), and incubated overnight at 4°C. After biotin blockade, slides were incubated with Universal Link biotinylated goat purified anti-mouse IgG (Biocare Medical,

Walnut Creek, CA, USA) for 20 min, followed by streptavidin-horseradish peroxidase (Biocare Medical, Walnut Creek, CA, USA) for 20 min, and developed with 3,3'-diaminobenzidine. All steps included washing with PBS. Slides were counterstained with Harris hematoxylin (Merck, Darmstadt, Germany) and mounted in permanent non-aqueous medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

*Quantification of FOXP3 protein expression by digital image analysis
CD8⁺FOXP3⁺ cells and CD8⁻FOXP3⁺ cells*

FOXP3⁺ cells were identified by one examiner (FVV) blinded to clinical data according to the following criteria: a) blue nuclear staining in a single CD8⁻FOXP3⁺ cell; b) double positive staining including blue nuclear staining for FOXP3 and surface brown staining for CD8, a CD8⁺FOXP3⁺ T lymphocyte.

Quantification of FOXP3 expression was performed by digital image analysis using the Image Pro Plus software, version 4.5 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). Images were visualized through a Zeiss microscope (model AXIOSKOP-40, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), and captured using a Cool Snap-Pro CS camera (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). Non-consecutive random fields were selected using a greek line method to avoid field overlapping (on average 25 fields in each core). Positive event counting was performed under 400x magnification and a resolution of 2560 x 1920 pixels, with 1 mm corresponding to 5900 pixels and an image area of 0.1412 mm². The area (in pixels) of the field with no tissue or non-renal tissue was subtracted from the total area, thereby correcting for positive events per area of renal tissue in that field (45). Single FOXP3⁺ cells and double CD8⁺FOXP3⁺ cells were counted

separately. The number of positive cells in the cortex was recorded, as well as cells located in the perivascular areas and aggregates at the corticomedullary junction, thus generating scores for analysis. Counting was performed on an ordinal scale, and the arithmetic mean of positive events (single FOXP3⁺ cells plus double CD8⁺FOXP3⁺ cells/2) was calculated for each core biopsy. The results were expressed as positive cells per mm².

Quantification of CD83⁺ dendritic cells

Sections stained for CD83⁺ dendritic cells were scored in coded slides by one examiner (FVV) who was blinded to clinical data. The number of positive cells in the cortex, perivascular areas and at the corticomedullary junction was recorded at a 200x magnification. The area of the cortex was measured with a loupe (included glomeruli and vessels) and the data was expressed as the number of positive cells/mm².

Statistical analysis

Descriptive statistics are presented as percentages for qualitative data and mean±SD or median and interquartile ranges for quantitative data. The Shapiro-Wilk test was used to assess the normality of continuous variables. The chi-square test and ANOVA were used for group comparisons. The levels of FOXP3 mRNA and protein expression were analyzed by the Kruskal-Wallis test due to their asymmetric distribution. A logarithmic transformation was performed on FOXP3 mRNA quantified to reduce skewness. A post-hoc analysis was carried out with Tukey HSD correction for multiple comparisons. Correlations between FOXP3 gene and protein expression in biopsies and between FOXP3 and dendritic cells were assessed by the Spearman's rank coefficient. Graft function was measured as

eGFR by the CKD-EPI equation at six time points, from biopsy to last follow-up (last serum creatinine, return to dialysis therapy, or death with a functioning kidney). The evolution of eGFR over time in the patients with acute rejection was analyzed by Generalized Estimating Equation (GEE) using the Gama distribution with logarithmic function, comparing patients with high and low FOXP3 mRNA and protein expression. A delta of eGFR was calculated by the formula: (final eGFR – eGFR at biopsy), adjusted by time of follow up in months.

The association between FOXP3 expression and graft survival (time between transplant and allograft failure or censoring for death with a functioning graft) was assessed by the Kaplan-Meier survival analysis, and differences in survival were measured by the log-rank test. Multivariate Cox regression analysis was used to identify variables predicting graft loss at the last follow-up, including variables with statistical significance in the univariate analysis. Data were processed and analyzed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows version 18.0. The significance level was established at $p < 0.05$.

Acknowledgments

We are grateful to Robert Colvin, Patricia Della Pelle and Nicole Brousaides for their expert technical advice. This study was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre and by Programa de Fomento à Pós-Graduação (PROF) of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

Conflicts of interest: the authors declare no conflicts of interest

References

1. Zheng XX, Sanchez-Fueyo A, Sho M, Domenig C, Sayegh MH, Strom TB. Favorably tipping the balance between cytopathic and regulatory T cells to create transplantation tolerance. *Immunity* 2003; 19:503-14.
2. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345-52.
3. Fontenot J, Rudensky A. A well-adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005; 6: 331-7.
4. Jiang S, Lechler RI. Regulatory T cells in the control of transplantation tolerance and autoimmunity. *Am J Transplant* 2003; 3: 516-24.
5. Li XC, Turka LA. An update on regulatory T cells in transplant tolerance and rejection. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6: 577-83.
6. Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR, Tolokoff-Rubin N, Suthanthiran M, Saidman SL, et al. HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med* 2008; 358(4):353-61.
7. Dummer CD, Carpio VN, Gonçalves LF, Manfro RC, Veronese FV. FOXP3⁺ regulatory T cells: from suppression of rejection to induction of renal allograft tolerance. *Transplant Immunol* 2012;26,1-10.
8. Muthukumar T, Dadharia D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal allograft recipients. *N Engl J Med* 2005; 353: 2342-51.

9. Veronese FV, Rotman S, Smith RN, Della Pelle T, Farrell M, Kawai T, et al. Pathological and clinical correlates of FOXP3⁺ cells in renal allografts during acute rejection. *Am J Transplant* 2007; 7:1-9.
10. 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: 877-84.
11. Bestard O, Cruzado JM, Rama I, Torras J, Gomà M, Serón D, et al. Presence of Foxp3⁺ regulatory T cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 2020-6.
12. Kollins D, Stoelcker B, Hoffman U, Bergler T, Reinhold S, Banas MC, et al. FOXP3⁺ regulatory T-cells in renal allografts: correlation with long-term graft function and acute rejection. *Clin Nephrol* 2011; 75: 91-100.
13. Bunnag S, Allanach K, Jhangri GS, Sis B, Einecke G, Mengel M, et al. FOXP3 expression in human kidney transplant biopsies is associated with rejection and time post transplant but not with favorable outcomes. *Am J Transplant* 2008; 8: 1423-33.
14. Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 610-21.
15. Yamazaki S, Patel M, Harper A, Bonito A, Fukuyama H, Pack M, et al. Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2758-2763.
16. Wood KJ. Regulatory T Cells in Transplantation. *Transplant Proc* 2011; 43: 2135-6.

17. López-Hoyos M, Segundo DS, Fernández-Fresnedo G, Marin MJ, González-Martin V, Arias M. Regulatory T cells in renal transplantation and modulation by immunosuppression. *Transplantation* 2009; 88(3 Suppl): S31-S39.
18. Segundo DS, Ruiz JC, Izquierdo M, Fernández-Fresnedo G, Gómez-Alamillo C, Merino R, et al. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation* 2006; 82: 550-7.
19. Yong Z, Chang L, Mei YX, Yi L. Role and mechanisms of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance. *Transpl Immunol* 2007;17:120–9.
20. Chai JG, Xue S, Coe D, Addey C, Bartok I, Scott D, et al. Regulatory T cells, derived from naïve CD4⁺CD25⁻ cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation* 2005;79:1310–6.
21. Louis S, Braudeau C, Giral M, Dupont A, Moizant F, Robillard N, et al. Contrasting CD25^{hi}CD4⁺ T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drugfree tolerance. *Transplantation* 2006;81:398–407.
22. Grimbert P, Mansour H, Desvaux D, Roudot-Thoraval F, Audard V, Dahan K, et al. The regulatory/cytotoxic graft infiltrating cells differentiate renal allograft borderline change from acute rejection. *Transplantation* 2007;83:341–6.
23. Chung JY, Braunschweig T, Williams R, Guerrero N, Hoffmann KM, Kwon M, et al. Factors in tissue handling and processing that impact RNA

- obtained from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* 2008; 56: 1033-42.
24. Macabeo-Ong M, Gizinger DG, Dekker N, McMillan A, Regezi JA, Wong DT et al. Effect of duration of fixation on quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analyses. *Mod Pathol* 2002; 15(9): 979-87.
25. Godfrey TE, Kim SH, Chavira M, Ruff DW, Warren RS, Gray JW, ET AL. Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 2000; 2: 84-91.
26. Castiglione F, Degl'Innocenti DR, Taddei A, Garbini F, Buccoliero AM, Raspollini MR, et al. Real-time PCR analysis of RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues: effects of the fixation on outcome reliability. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; 15: 338-42.
27. Glenn ST, Head KL, Teh BT, Gross KW, Kim HL. Maximizing RNA yield from archival renal tumors and optimizing gene expression analysis. *J Biomol Screen* 2010; 15: 80-85.
28. Nakashima H, Miyake K, Moriyama M, Tanaka A, Watanabe M, Abe Y , et al. An amplification of IL-10 and TGF-beta in patients with IgG4-related tubulointerstitial nephritis. *Clin Nephrol* 2010; 73: 385-391.
29. Sánchez-Navarro I, Gámez-Pozo A, González-Barón M, Pinto-Marín A, Hardisson D, López R, et al. Comparison of gene expression profiling by reverse transcription quantitative PCR between fresh frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded breast cancer tissues. *Biotechniques* 2010; 48: 389-97.

30. Hendrikx TK, Velthuis JHL, Klepper M, van Gurp E, Geel A, Schoordijk W, et al. Monotherapy rapamycin allows an increase of CD4+CD25brightFoxP3+ T cells in renal recipients. *Transpl Int* 2009;22:884–91.
31. Bluestone JA, Liu W, Yabu JM, Laszik ZG, Putnam A, Belingheri M, et al. The effect of costimulatory and interleukin 2 receptor blockade on regulatory T cells in renal transplantation. *Am J Transplant* 2008;8:2086–96.
32. Chen X, Oppenheim JJ, Winkler-Pickett RT, Ortaldo JR, Howard OM. Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3+CD4+CD25+ T regulatory cells in vivo and enhances their capacity to suppress EAE. *Eur J Immunol* 2006;36:2139–49.
33. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, Buess M, Schulz S, Baker J, et al. Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin production. *Blood* 2006;108:390–9.
34. Haanstra KG, Wubben JA, Koreavaar SS, Kondova I, Baan CC, Jonker M. Expression patterns of regulatory T-cell markers in accepted and rejected nonhuman primate kidney allografts. *Am J Transplant* 2007;7:2236–46.
35. Batsford S, Dickenmann M, Dümmüller U, Hopfer H, Gudat F, Mihatsch M. Is monitoring of FOXP3 Treg cells in renal transplants during acute cellular rejection episodes useful? *Clin Nephrol* 2011;75:101–6.
36. Iwase H, Kobayashi T, Kodera Y, Miwa Y, Kuzuya T, Iwasaki K, et al. Clinical Significance of Regulatory T-Cell-Related Gene Expression in Peripheral Blood After Renal Transplantation. *Transplantation* 2011; 91: 191-198.

37. Zuber J, Brodin-Sartorius A, Lapidus N, Patey N, Tosolini M, Candon S et al. FOXP3-enriched infiltrate associated with better outcome in renal allografts with inflamed fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 3847-3854.
38. Shan J, Guo Y, Luo L, Lu J, Li C, Zhang C, Huang Y, Feng L, Wu W, Long D, Li S, Li Y. Do CD4⁺ Foxp3⁺ Treg cells correlate with transplant outcomes: a systematic review on recipients of solid organ transplantation. *Cell Immunol.* 2011;270(1):5-12.
39. Luo X, Tarbell KV, Yang H, Pothoven K, Bailey SL, Ding R, et al. Dendritic cells with TGF-beta1 differentiate naive CD4⁺CD25⁻ T cells into islet-protective Foxp3⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 2821-6.
40. Pothoven KL, Kheradmand T, Yang Q, Houlihan JL, Zhang H, Degutes M, et al. Rapamycin-conditioned donor dendritic cells differentiate CD4CD25Foxp3 T cells in vitro with TGF-beta1 for islet transplantation. *Am J Transplant* 2010; 10: 1774-84.
41. Kashimura S, Saze Z, Terashima M, Soeta N, Ohtani S, Osuka F., et al. CD83(+) dendritic cells and Foxp3(+) regulatory T cells in primary lesions and regional lymph nodes are inversely correlated with prognosis of gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2011 Nov 15. [Epub ahead of print].
42. Zuidwijk K, de Fijter JW, Mallat MJK, Eikmans M, van Groningen, Goemaere NN, et al. Increased influx of myeloid dendritic cells during acute rejection is associated with interstitial fibrosis and tubular atrophy and predicts poor outcome. *Kidney Int* 2012; 81: 64-75.

43. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro III AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150:604-12.
44. 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: 753-60.
45. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, *et al.* Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988; 96: 379-394).

Table 1. Demographic and clinical characteristics of renal transplant recipients

	NR (n=23)	AR (n=39)	IF/TA (n=29)	p-value
Age	46±15.0*	42.8±12.0	43.9±11.8	0.626
Gender (male)	12(50)**	29(71)	15(50)	0.122
Ethnicity/skin color (white)	22(91)	34(83)	26(87)	0.595
Type of donor (deceased)	18(75)	30(73)	23(77)	0.485
HLA mismatches (A, B, DR)	4.26±1.1	3.6±1.0	4.0±0.9	0.068
Induction therapy (basiliximab/anti-thymocyte globulin/OKT3)	14/0/2	25/1/3	12/1/2	0.808
Last pre-transplant PRA (%)				
Class I	9.5±19.4	17.8±31.0	7.7±14.4	0.235
Class II	13.8±31.6	17.4±32.8	14.6±32.2	0.907
Time between Tx and biopsy (days)	60 (11.5–345)***	29 (11–315)	615 (270–1695)	<0.001
Cr _s (mg/dL)	4.3±2.8	4.8±2.8	3.7±1.4	0.185
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	22.7±14.9	19.8±13.1	20.2±9.6	0.649
Time between Tx and last Cr _s (months)	64 (52–75)	55 (22–74)	55 (34–76)	0.424

NR: no rejection; AR: acute rejection; IF/TA: interstitial fibrosis/tubular atrophy; PRA: panel reactive antibodies; Tx: transplant;

Cr_s: serum creatinine; eGFR: estimated glomerular filtration rate (CKD-EPI); *Mean±SD; **n (%); ***Median and interquartile range

Table 2. Expression of FOXP3 mRNA and protein, and dendritic cells in renal allograft biopsies

	No rejection (n=23)	Acute rejection (n=39)	IF/TA (n=29)	p-value
Log ₁₀ FOXP3 RNAm	1.80±1.13 ^a	2.61±1.47 ^c	1.70±1.10 ^d	0.024
FOXP3+ cells/mm ²	0 (0–1.35) ^b	3.60 (0.57–11.35) ^{e,f}	1.77 (0–2.86)	<0.001
CD83 cells/mm ²	0.41 (0.22–0.92)	0.62 (0–3.55)	0.79 (0.35–2.28) ^g	0.523

^a x±SD; ^b median (IQR); ^c AR vs. NR, p=0.039; ^d AR vs. IF/TA, p=0.035, ^e AR vs. NR, p<0.001; ^f AR vs. IF/TA, p=0.034,

^g IF/TA vs. NR, p=0.065

Table 3. Delta of glomerular filtration rate in patients with high or low FOXP3 expression

	Delta of eGFR	P	Adjusted delta of eGFR	P
Log ₁₀ FOXP3 mRNA				
High	5.2 (-0.6 – 30.9) ^a	0.08	0.16 (-0.11 – 0.63)	0.14
Low	1.07 (-6.7 – 15.6)		0.02 (-0.48 – 0.37)	
FOXP3 protein (cells/mm ²)	6.0 (-0.6 – 23.1)	0.157	0.00 (-0.50 – 0.49)	0.11
High	0.5 (-5.9 – 18.6)		0.19 (-0.01 – 0.54)	
Low				

^a median (IQR)

Delta of eGFR was calculated as eGFR at last follow up minus eGFR at kidney allograft biopsy, ml/min/1.73 m²

Adjusted delta of eGFR by total time of follow up for each patient = (eGFR final – eGFR of biopsy)/months of follow up

Table 4. Independent factors associated to graft loss in Multivariate Cox regression model

Variable	Crude Hazard Ratio (95% IC)	P	Adjusted Hazard Ratio (95% IC)	P
Acute cellular rejection	2.41(0.66-8.78)	0.181	2.12(0.58-7.73)	0.252
Interstitial fibrosis/tubular atrophy	3.18(0.88-11.4)	0.076	3.10(0.86-11.2)	0.082
eGFR at biopsy	0.95(0.91-0.98)	0.012	0.94(0.90-0.98)	0.014
Type of donor	0.81(0.32-2.05)	0.666	NI	
Mismatch HLA I and II	0.99(0.66-1.48)	0.984	NI	
FOXP3 ⁺ cells/mm ²	0.93(0.38-2.27)	0.889	NI	
Log ₁₀ FOXP3 mRNA	0.97(0.68-1.26)	0.633	NI	
≥ 2.5 FOXP3 ⁺ cells/mm ²	0.75(0.32-1.75)	0.509	NI	
≥ 2.36 Log ₁₀ FOXP3	1.21(0.54-2.72)	0.630	NI	

IC: Confidence Interval; eGFR: estimated glomerular filtration rate; NI: not included in the multivariate regression model.

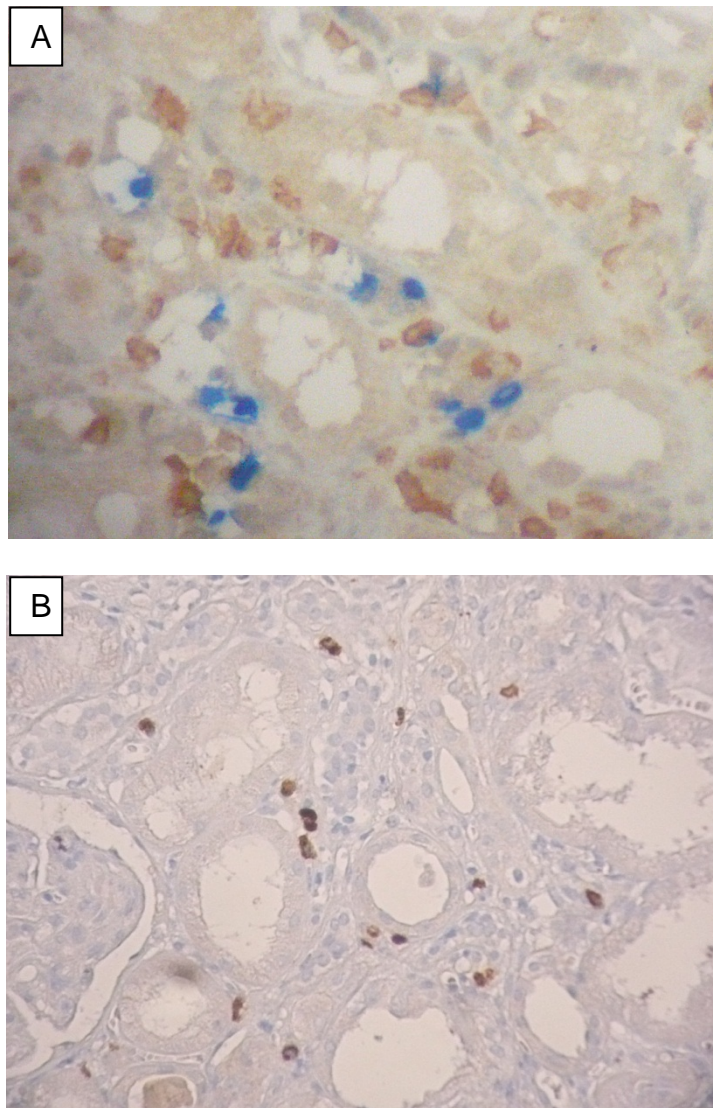


Figure 1. A. FOXP3⁺ cells distribution in the interstitium and tubules in a renal graft biopsy with acute rejection (peroxidase, 400x original magnification; blue nuclear stain). B. Tubulointerstitial CD83⁺ dendritic cells in a biopsy with interstitial fibrosis/tubular atrophy (peroxidase, 200x original magnification; brown cytoplasm stain).

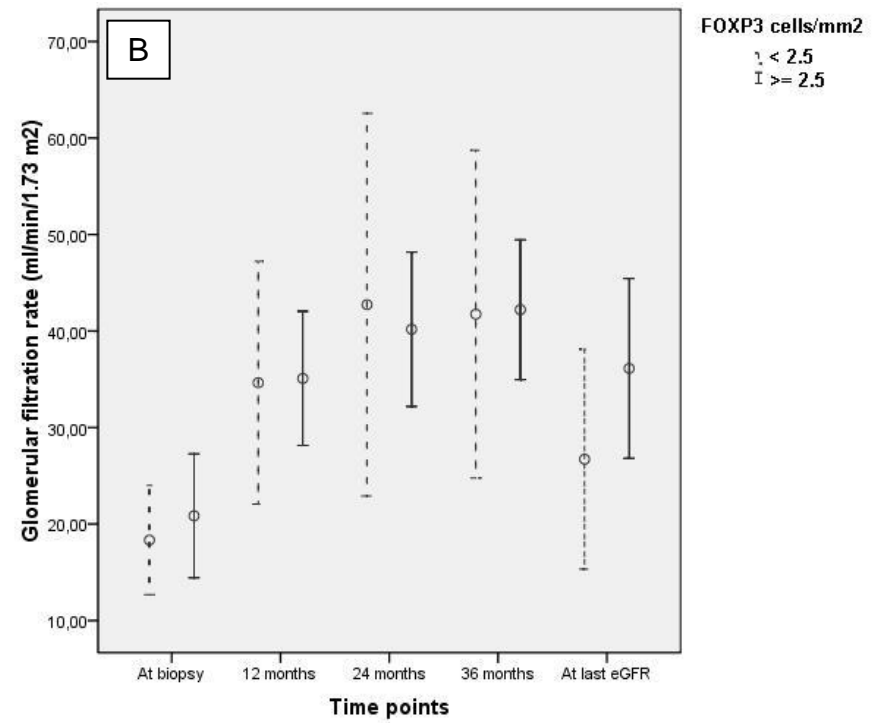
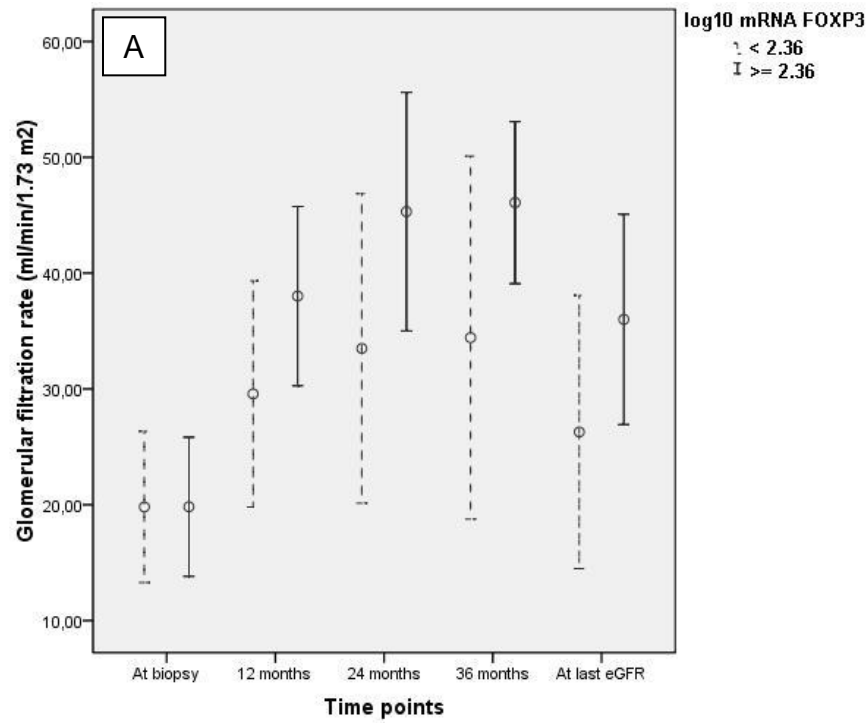


Figure 2. Estimated glomerular filtration rate according to the level of FOXP3 mRNA (Panel A) and protein (Panel B) expression over time, from kidney transplant biopsy to last follow up. Patients without rejection or with interstitial fibrosis/tubular atrophy in biopsy were excluded from the analysis as these groups have distinct prognosis, rendering 39 patients with acute cellular e/or humoral rejection included.

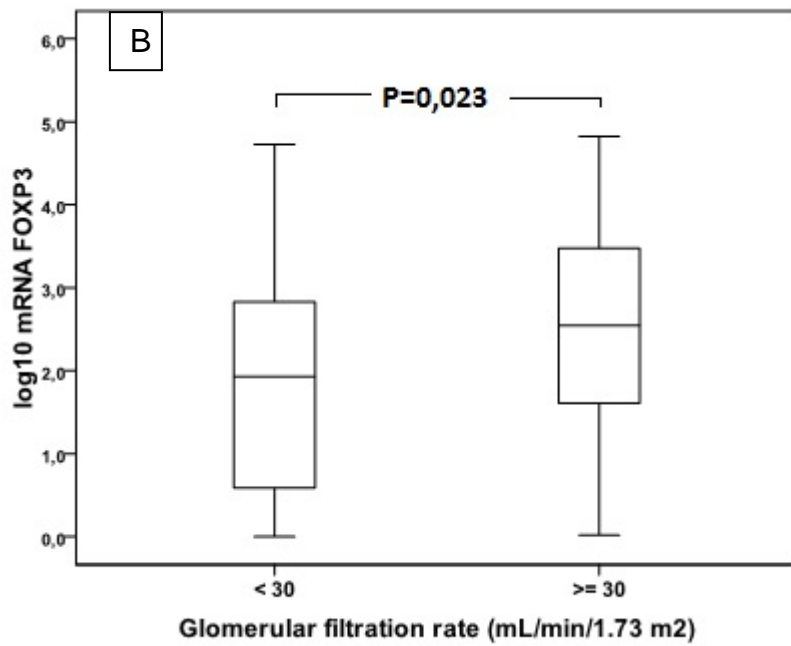
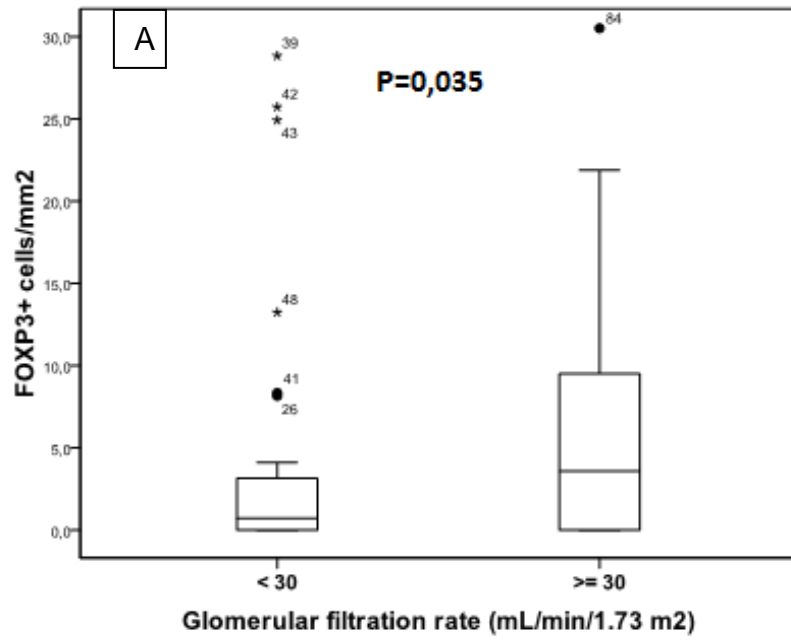
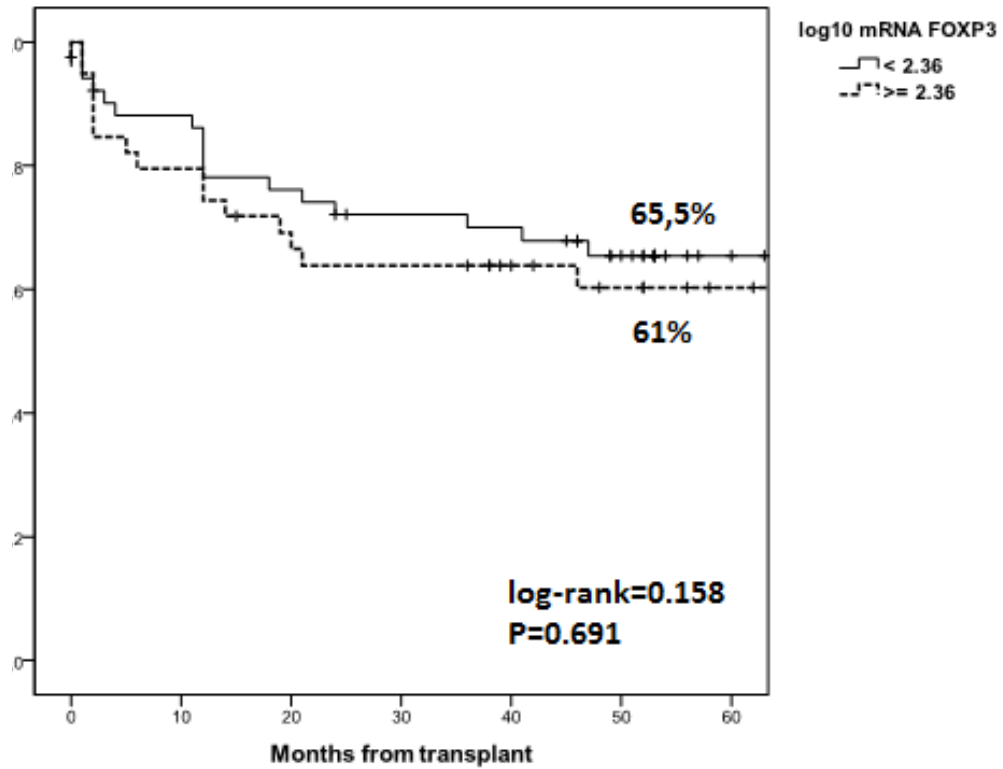


Figure 3. Correlation between FOXP3 protein expression and estimated glomerular filtration rate (eGFR) (panel A) and of FOXP3 mRNA expression and eGFR (panel B).



Low FOXP3 expression: n= 51; events = 18					
High FOXP3 expression: n= 40; events = 15					
	Number remaining:				
	12	24	36	48	60
	(months)				
Low FOXP3:	39	35	33	27	11
High FOXP3:	29	24	23	16	12

Figure 4. Cumulative renal graft survival according to high or low \log_{10} FOXP3 mRNA expression on kidney allograft biopsy.

Capítulo 7. Considerações Finais

O fator de transcrição FOXP3 é o marcador específico das células T reguladoras (Tregs) com função supressora, e a deficiência ou inibição das Tregs origina doenças auto-imunes e lesão em múltiplos órgãos, não só experimentalmente mas em nível clínico. A ação supressora das Tregs para controle da resposta imune inflamatória tem sido foco de intensa pesquisa em transplantação de órgãos. No transplante renal, modelos experimentais e estudos clínicos tem associado as Tregs FOXP3⁺ com controle da rejeição e tolerância imunológica do enxerto. A expressão gênica e proteica de FOXP3 vem sendo demonstrada em enxertos com rejeição celular aguda, tanto no tecido renal como no sangue periférico e em células da urina destes pacientes. Ainda não é claro, entretanto, se a presença das Tregs ocorre puramente por migração e retenção no enxerto para controle do processo inflamatório, ou se é induzida por mecanismo antígeno-dependente (apresentação antigênica sustentada para indução das Tregs) para, além de suprimir células T efetoras, direcionar a resposta imune para aquisição de tolerância.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivos avaliar a expressão gênica e proteica do fator de transcrição FOXP3 em biópsias do enxerto de receptores de transplante renal, determinar a correlação entre RNAm e proteína do FOXP3 quantificados em tecido parafinado, avaliar a sua associação com células apresentadoras do antígeno (células dendríticas CD83⁺) e correlacionar o nível de expressão do RNAm do FOXP3⁺ com a função e sobrevida do enxerto após o transplante.

A análise dos resultados do estudo permitem as seguintes conclusões:

1. A expressão do RNAm e da proteína de FOXP3 estavam significativamente aumentadas nas biópsias com rejeição aguda, cuja característica histológica principal é o infiltrado inflamatório tubulointersticial.

2. Houve uma correlação positiva e significativa entre o RNAm e a proteína de FOXP3 considerando todas as biópsias em conjunto, indicando que o processo de transcrição gênica e translação protéica estão ocorrendo simultaneamente no tecido renal.
3. A análise molecular do FOXP3 por PCR em tempo real foi tecnicamente possível no tecido parafinado, com curvas de amplificação adequadas.
4. O número de células dendríticas CD83⁺ tendeu a ser maior nas biópsias com dano crônico (fibrose intersticial e atrofia tubular, FI/AT) em relação aos rins sem rejeição, não diferindo das biópsias com rejeição aguda.
5. Determinou-se por curva ROC que a expressão de FOXP3 estava elevada se igual ou superior a 2.36 log₁₀ RNAm ou se igual ou superior a 2.5 células FOXP3⁺/mm². Não houve correlação entre variáveis demográficas com expressão aumentada de FOXP3 na biópsia. Nos pacientes com maior expressão de FOXP3, o número de células dendríticas na biópsia foi significativamente maior. Adicionalmente, pacientes com taxa de filtração glomerular >30 ml/min/1,73 m² no final do seguimento apresentaram níveis significativamente mais elevados de FOXP3 no momento da biópsia, quando comparados a pacientes com pior função do enxerto.
6. Neste estudo, o FOXP3 não foi preditivo da função ou da sobrevida do enxerto renal em uma mediana de quase cinco anos de seguimento.

Este estudo não foi delineado e não teve poder para avaliar o comportamento da expressão de FOXP3 ao longo do tempo após o transplante. Outro estudo envolvendo um maior número de pacientes com biópsias por indicação e protocolares, e maior representação das categorias de Banff (ausência de rejeição, rejeição celular aguda, rejeição mediada por anticorpos e rejeição crônica) poderá fornecer dados mais

acurados sobre o efeito do FOXP3 nos desfechos do enxerto renal, em curto e longo prazo.

Protocolo Clínico

Identificação

Nome					Protocolo	
Idade	Sexo	<input type="checkbox"/> 1=M <input type="checkbox"/> 2=F	Etnia	<input type="checkbox"/> 1=B <input type="checkbox"/> 2=P	Registro	
DN						

Transplante

Data Tx		Doador	<input type="checkbox"/> 1=C <input type="checkbox"/> 2=VR <input type="checkbox"/> 3=V ÑR
Risco	<input type="checkbox"/> 1=Alto	Mismatch	Classe I: <input type="checkbox"/> 0 a 2
Imunológico	<input type="checkbox"/> 2=Baixo		Classe II: <input type="checkbox"/> 0
Painel Pico	%	Painel Recnte	%
Indução	<input type="checkbox"/> 1=CD25 <input type="checkbox"/> 2=timoglobulina <input type="checkbox"/> 3=OKT3	Imunossupressão	<input type="checkbox"/> 1=CyA <input type="checkbox"/> 2=Tacro (Calcineurina) <input type="checkbox"/> 3=Rapamicina <input type="checkbox"/> 4=MMF
HLA	A:	B:	DR:
Δt Tx/último acompanhamento (m)			

Punção Biópsia

Data	Indicação	Diag. Histológico	Conduta pós PBR	Δt Tx/Bx (m)
	1=disf. ag 2= disf. cr 3=protocol 4=vigil	1=Normal 2=BL 3=RAC IA 4=RAC IB 5=RAC IIA RCelAg 6=RAC IIB 7=RAC III 8=R Humoral Ag 9=Fib.Int.NT I 10=Fib.Int.NTII 11=Fib.Int.NT III 12=NTA 13=Toxicidade	Rej. Corticoresist. 1=timoglobulina 2=OKT3 Rej. Humoral: 3=plasmaferese 4=imunoglobulina	
Δt biópsia e último acompanhamento				

Transfusão	Gestação	MDRD	
-------------------	-----------------	-------------	--

Laboratório

	12 m	24 m	36 m			
IPC						
	Na PBR	2 m	12 m	24 m	36 m	Última Cr
Cr sérica						

Desfechos

Perda do enxerto:	<input type="checkbox"/> 1=óbito c/ rim fu
<input type="checkbox"/> 4=em acompanhamento c/ rim funcional	
Sobrevida paciente:	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> n
Sobrevida enxerto:	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> n