

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**QUANTIFICAÇÃO GÊNICA PRÉ-TRANSPLANTE RENAL – PREDIÇÃO DA  
REJEIÇÃO AGUDA**

Raphael Sahd

**Porto Alegre, Brasil.**

**2012**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**QUANTIFICAÇÃO GÊNICA PRÉ-TRANSPLANTE RENAL – PREDIÇÃO DA  
REJEIÇÃO AGUDA**

Raphael Sahd

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro

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

**Porto Alegre, Brasil.**

**2012**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Sahd, Raphael  
QUANTIFICAÇÃO GÊNICA PRÉ-TRANSPLANTE RENAL – PREDIÇÃO  
DA REJEIÇÃO AGUDA / Raphael Sahd. -- 2012.  
73 f.

Orientador: Roberto Ceratti Manfro.

Dissertação (Mestrado) -- 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 Aguda. 3. Biomarcadores. 4. Predição.  
I. Manfro, Roberto Ceratti, orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro, pelo exemplo de profissional, com competência, caráter, ética e extrema pontualidade. Trabalhar junto, contar com todo seu apoio, e ensinamento foi uma verdadeira honra. Obrigado pela paciência e por sempre acreditar em mim. Certamente é responsável por uma ascensão em minha vida profissional.

Aos meus amigos do LABMAN, Gabriel, Virna, Jonathan, Patrícia, Tiago, Thays, Greice, Daniela, Mariana, Aline, por todos os bons momentos que passamos juntos, por todo carinho e amizade que me deram.

Agradecimento especial ao Gabriel, pelo apoio irrestrito, e ensinamentos em toda a fase do projeto. Sem seu apoio este trabalho não existiria. É um exemplo de competência profissional.

A querida Vera secretária do PPGCM, por toda amizade carinho, e incentivo, desde o processo seletivo.

A Daniela Benzano pelo apoio na parte estatística.

A Jussara e demais secretárias do serviço de nefrologia, por toda atenção.

A Maria, que cuida dos laboratórios do centro de pesquisa aplicada, por todo apoio e carinho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade

Ao fundo de incentivo a pesquisa (FIPE), do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) pelo apoio financeiro

A Universidade Paranaense, funcionários e queridos alunos pelo apoio.

Aos meus amigos Ricardo, Deison, Emerson e demais familiares, por todo apoio, meus mais sinceros agradecimentos.

A FR, por toda ajuda no início do mestrado e para entender imunologia.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Á Deus, por tudo que proporciona em minha vida, e à proteção durante os longos períodos de viagens.

Aos meus amados pais Edison e Lucia, por tudo que já passamos juntos, pelo amor, carinho, e apoio incondicional que me deram em todos os momentos da minha vida, e em especial neste mestrado. Sem vocês jamais poderia ter dado qualquer passo e alcançado qualquer objetivo. Vocês são as minhas maiores e mais importantes referências.

Ao meu irmão Edmundo, por todo carinho e por sempre conseguir um modo fácil de arrumar as coisas no computador.

A minha namorada Larissa, por todo apoio, paciência e amor, nos momentos mais difíceis desta caminhada.

A minha avó materna Nilda, que deixou uma herança muito valiosa: a amizade de Pedro Syrio Wendel, Dona Jardelina (Vó Nina), Pedrinho, Maria Tereza, Marcelo, Denise, Gesí e Piuí, por todo carinho, atenção, incentivo, almoços, jantas, viagens e alegrias que me proporcionaram. Enfim faltam agradecimentos por tudo que fizeram por mim. Certamente são mais que especiais, por isso faço questão de deixar desta forma o meus mais sinceros agradecimentos. Para sempre serão lembrados como incentivadores e patrocinadores da minha vitória.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1- .....	19
Figura 2 - .....	21
Figura 3 .....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>APC</b>	Célula apresentadora de antígeno
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucléico complementar
<b>CMV</b>	Citomegalovírus
<b>CXCL-10</b>	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 10 / IP-10
<b>CXCL-9</b>	<i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand 9 / IP-9</i>
<b>DC</b>	Disfunção Crônica
<b>Fas-L</b>	Fas ligante
<b>FOXP3</b>	<i>Forkhead Box P3</i>
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitário Humano / <i>Human Leucocyte Antigen</i>
<b>IF/TA</b>	Fibrose Intersticial com Atrofia Tubular
<b>IL</b>	Interleucina
<b>mRNA</b>	Mensageiro do ácido ribonucléico
<b>NF-AT</b>	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell
<b>NK</b>	<i>Natural killer</i>
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase / <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>RA</b>	Rejeição Aguda
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>RT-PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
<b>TCR/RcT</b>	Receptor de Célula T
<b>TFGe</b>	Taxa de Filtração Glomerular Estimada
<b>Th</b>	Células T auxiliar ( <i>T helper</i> )
<b>TIM3</b>	<i>T Cell Immunoglobulin Mucin-3</i>
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b><i>Treg cells</i></b>	Linfócitos T reguladores



# Sumário

## Sumário

Lista de Figuras.....	7
Lista de Abreviaturas .....	8
Resumo .....	10
Abstract.....	11
Capítulo 1. Introdução .....	12
Capítulo 2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
2.1 Imunologia do Transplante .....	16
2.1.1 A Rejeição.....	17
2.1.2 Tipos de rejeição .....	22
2.2 Biomarcadores .....	23
2.2.1 Biomarcadores: Aplicações no transplante renal .....	24
2.3 Biologia Molecular aplicada no Transplante Renal.....	29
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS.....	33
3.1. Objetivo Geral .....	34
3.2. Objetivos Específicos.....	34
Capítulo 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
Capitulo 5. Artigo “QUANTIFICAÇÃO GÊNICA PRÉ-TRANSPLANTE RENAL – PREDIÇÃO DA REJEIÇÃO AGUDA” .....	41
Capítulo 6. Conclusões.....	67
Capítulo 7. ANEXOS.....	69
Anexo 1. Protocolo de coleta de dados .....	70
Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	72

## RESUMO

**Introdução.** A rejeição aguda (RA) permanece entre as principais causas de perda de enxertos renais. A disponibilidade de biomarcadores prognósticos de RA no período pré-transplante poderia ser útil na individualização do tratamento destes pacientes. Neste estudo avaliamos o potencial da mensuração do RNA mensageiro de diferentes genes envolvidos na resposta alogênica como biomarcadores prognósticos pré-transplante.

**Material.** Foram coletadas amostras pré-transplante de 51 pacientes que receberam enxertos renais entre 2008 a 2009. Realizou-se a mensuração da expressão do mRNA dos genes TIM3, FOXP3, Perforina, CXCL-9, CXCL-10 e Granulisina, em células mononucleares do sangue periférico através da técnica de PCR em tempo real. Os resultados da expressão gênica foram correlacionados com a ocorrência de RA, presença de infecções virais e bacterianas em até 1 ano e com a função do enxerto renal aos 1, 6 e 12 meses pós-transplante.

**Resultados.** Os genes TIM3, FOXP3, Perforina e CXCL-9, não apresentaram significância estatística nos grupos que apresentaram ou não episódios de rejeição aguda. A expressão gênica de CXCL-10 e Granulisina foi significativamente menor no grupo que apresentou rejeição aguda ( $P < 0,05$ ). Não houve diferença significativa na correlação entre pacientes que desenvolveram infecção viral ou bacteriana no pós-transplante renal. O mesmo resultado foi encontrado na avaliação da função renal do enxerto.

**Conclusão.** A análise da expressão dos genes avaliados neste estudo no momento prévio ao transplante renal não foi preditor da ocorrência de rejeição aguda, infecções virais ou bacterianas ou da função do enxerto até um ano pós-transplante.

## **ABSTRACT**

**Background.** Acute rejection (AR) remains a significant risk factor for kidney-graft failure. Availability of AR prognostic biomarkers during pre-transplant could be helpful to individualize patient's immunosuppressive treatment. In this study we evaluated the measurement of RNA messenger of different genes involved in the allogeneic response as potential biomarkers of kidney graft rejection.

**Methods.** Pre-transplant samples were obtained from 51 kidney-grafted patients between 2008 and 2009. Expression of the messenger RNA from peripheral blood mononuclear cells of the TIM3, FOXP3, Perforin, CXCL-9, CXCL-10, and Granulysin genes was measured by real-time PCR technique. Gene expression results were associated with AR occurrence, the presence of bacterial and viral infections up to one year after grafting, and with kidney-graft function at 1, 6, and 12 months.

**Results.** Expression of the TIM3, FOXP3, Perforin and CXCL-9 genes were not correlated with episodes of acute rejection. CXCL-10 and Granulysin gene expressions were significantly lower in the group that presented acute rejection ( $P < 0.05$ ). No significant differences in mRNA expression were observed in patients with infections after kidney transplantation and kidney graft function was not correlated with gene expression.

**Conclusions.** As evaluated in the present study pre-transplant gene expression profiles were not predictive of acute rejection, infection or graft function.



Ao longo da história a humanidade tentou de diversas maneiras a realização de transplantes, porém sem o conhecimento dos fenômenos biológicos implicados na interação entre o receptor e o doador. O sucesso do transplante de órgãos sólidos, no entanto só foi alcançado no século XX, graças aos progressos marcantes nas técnicas cirúrgicas, imunologia dos transplantes e mais recentemente, no desenvolvimento de drogas imunossupressoras capazes de controlar a rejeição dos enxertos. A transplantação de órgãos constituiu um dos principais progressos da medicina nas últimas décadas, representando profundas transformações na vida de milhares de doentes [1].

A partir dos anos 50, o transplante renal começou a ser realizado com sucesso em seres humanos, sendo em 1959 realizado nos Estados Unidos o primeiro transplante bem sucedido, realizado entre gêmeos univitelinos. No Brasil, o primeiro transplante foi realizado seis anos mais tarde. Atualmente o transplante renal constitui a terapia de escolha em pacientes com insuficiência renal crônica, já que apresenta melhores resultados em relação a tratamentos como a diálise, oferecendo melhor sobrevida aos pacientes [2-5].

A possibilidade de rejeição do órgão é um importante fator a ser analisado, e sendo assim uma melhor compreensão de seus mecanismos é fundamental na abordagem terapêutica do receptor e na adequação da imunossupressão [6].

A rejeição aguda (RA) está entre as maiores causas de perda do enxerto renal nos primeiros anos pós-transplante e está relacionada a uma série de complicações, como o desenvolvimento da disfunção crônica (DC) e a falência renal [7, 8]. Em qualquer dos casos a sua influência negativa na sobrevivência do enxerto é descrita [9]. Os novos protocolos imunossupressores diminuíram a incidência da rejeição aguda significativamente, no entanto a sobrevida em longo prazo apresentou melhora apenas limítrofe devido principalmente às perdas

de enxertos pela condição atualmente denominada fibrose intersticial com atrofia tubular (IF/TA). Além destes, outros fatores contribuem para a perda de enxertos tais como a morbidade causada pela imunossupressão, infecções, diabetes mellitus, hipertensão arterial, obesidade, todos implicando também na sobrevida dos pacientes [10].

As técnicas de biologia molecular vêm apresentando grandes avanços nos últimos anos. Estas técnicas são potencialmente utilizáveis na monitorização dos transplantes renais, possibilitando diagnósticos precisos, não-invasivos e elucidação de mecanismos que possam vir a ser úteis na predição dos processos nocivos aos transplantes [11, 12].

O estudo de genes que possam ser preditores dos processos de rejeição pode visar também à adequação dos regimes de imunossupressão para condições de menor toxicidade. Sendo assim a capacidade de prever a rejeição antes da ocorrência de lesão irreversível permitiria estratégias imunossupressoras mais eficazes, levando a melhoras em desfechos como rejeição aguda e função do enxerto.

Até o presente momento maioria dos estudos que evidenciaram genes candidatos a marcadores do desenvolvimento de rejeição aguda, foram realizados após o transplante. Consideramos, no entanto que, um teste preditivo pode ter maior valor clínico se puder antecipar o risco antes da realização do transplante, o que poderia levar a escolha de estratégias imunossupressoras mais eficazes.

**CAPÍTULO 2. REFERENCIAL TEÓRICO**

## 2.1 Imunologia do Transplante

A substituição eficiente de um órgão doente ou danificado foi aguardada por muito tempo. Todavia, para que isto se tornasse realidade seria necessário romper a limitação imposta pela resposta imune do receptor ao tecido transplantado. Para isso uma maior compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na transplantação de órgãos foi essencial [13, 14].

A incompatibilidade no sistema sanguíneo ABO é a primeira barreira no processo da transplantação de um órgão, seguida pela compatibilidade no sistema HLA (*Human Leukocytes Antigen*), e na seqüência são realizadas as provas cruzadas e as pesquisas de anticorpos anti-HLA do doador. Assim, em um transplante renal ABO compatível, os antígenos tissulares que compõem o sistema HLA são os principais alvos moleculares da rejeição [15].

Diante da possível disparidade genética entre o doador e o receptor, os enxertos podem ser classificados em: enxertos autólogos ou auto-enxertos, enxertos singênicos ou isoenxertos, xenoenxertos ou heteroenxerto e aloenxertos ou homoenxertos, que são largamente a forma mais utilizada [16].

Não há protocolo clínico eficaz para a indução da tolerância aos aloenxertos. Sendo estes enxertos imunogênicos se não ocorrer modificação da resposta imune vai ocorrer sua destruição pela rejeição [17].

As moléculas HLA são glicoproteínas expressas nas superfícies celulares, e apresentam a função principal de apresentar os antígenos aos linfócitos T. Estão localizadas no braço curto do cromossomo 6, sendo herdadas em haplótipos e subdivididos em duas grandes classes de acordo com sua estrutura e local de expressão: HLA de classe I e HLA de classe II. A região da Classe I consiste nos *loci* HLA-A; HLA-B; HLA-C e estão presentes na membrana citoplasmática da maioria das células nucleadas que incluem os linfócitos T e B, células de órgãos



parenquimatosos e plaquetas, sendo esses alvos dos linfócitos T citotóxicos. A classe II consiste na região HLA-D, na qual se subdivide em três subgrupos: HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR, que são encontrados na maioria das vezes nos linfócitos B, células apresentadoras de antígenos (APCs) como: macrófagos e células dendríticas; células T ativadas, endotélio vascular e algumas células epiteliais tímicas. A determinação destes antígenos é de importância significativa uma vez que quanto maior a compatibilidade entre o doador e o receptor maior a probabilidade de sobrevida em longo prazo dos transplantes [18].

A resposta imune a um enxerto consiste no mecanismo da resposta celular (mediada pelos linfócitos) quanto pelo mecanismo da resposta humoral (mediada por anticorpos). Os linfócitos T representam o papel central na rejeição de enxertos, porém entre as diversas formas celulares participantes estão os macrófagos, leucócitos e plasmócitos [16, 19].

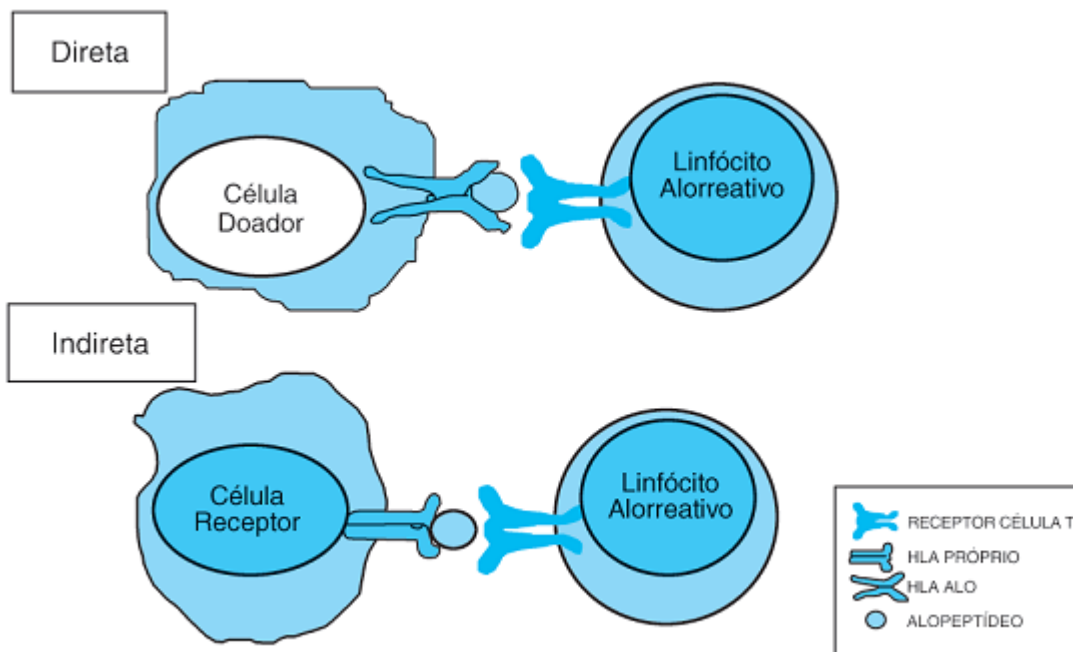
### **2.1.1 A Rejeição**

O processo origina-se a partir do aumento da expressão de mediadores inflamatórios e de moléculas de adesão, levando a intensa migração leucocitária, assim como de células apresentadoras de antígenos para o enxerto. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> do receptor fazem o reconhecimento dos antígenos HLA de classe I não próprios no enxerto, originando uma série de atividades mediadas por leucócitos (macrófagos, células T citotóxicas (CD8<sup>+</sup>) e auxiliares (CD4<sup>+</sup>) e plasmócitos). A partir de então as interleucinas, serão responsáveis pelo desencadeamento da expansão clonal das células efetoras e anticorpos com ação citolítica [18].

A resposta imune inicia com o reconhecimento e captação de antígenos do doador por APCs, que os apresentam às células auxiliares (CD4) do receptor. Esta apresentação ocorre na fenda dos seus antígenos de classe II, na forma de pequenos peptídeos que são apresentados ao

receptor de células T (RcT) dos linfócitos CD4+. Os linfócitos T reconhecem os antígenos dentro de uma molécula de HLA, apresentados pelas APCs aos receptores de células T (TcR), das células CD4+. O TcR encontra-se associado não covalentemente a moléculas CD3, encarregadas da transmissão do sinal de ativação para o citosol das células. O contato das moléculas CD4+ se dá nas porções não polimórficas ( $\alpha 2$  e  $\beta 2$ ) do HLA de classe II, e o contato das moléculas CD8+ se dá com a porção não polimórfica ( $\alpha 3$ ) do HLA de classe I. Existem duas vias pelas quais as moléculas de HLA podem ser apresentadas para a ativação de linfócitos T de um receptor: via de apresentação direta e via de apresentação indireta [11, 16].

Na via direta de alorreconhecimento os linfócitos T do indivíduo transplantado reconhecem os antígenos polimórficos presentes na superfície das células do doador (peptídeos apresentados dentro de moléculas HLA em APCs do doador), que podem ser desde células dendríticas presentes no órgão, como células endoteliais dos vasos do enxerto, até células do parênquima do órgão que expressam moléculas de HLA. Na via indireta de alorreconhecimento os linfócitos T reconhecem antígenos polimórficos processados e apresentados na forma de peptídeos, dentro de moléculas HLA, presentes na superfície celular das APC do próprio receptor. A importância relativa das vias direta e indireta na rejeição ao enxerto não está clara, mas sugere-se que os linfócitos T citotóxicos CD8+ induzidos pelo reconhecimento direto de aloantígenos sejam mais importantes na rejeição aguda, em contra partida as células T CD4+ efectoras estimuladas pela via indireta, teriam um papel mais relevante na rejeição crônica (Figura 1) [15, 16].



**Figura 1.** O reconhecimento dos antígenos do doador pelo linfócito T do receptor pode ser feito através de apresentação por célula do próprio doador (via direta) ou por célula do receptor (via indireta). No primeiro caso, o leucócito passageiro presente no órgão transplantado apresenta antígeno próprio, e o complexo peptídeo mais molécula do HLA será reconhecido como estranho. No segundo caso, a molécula do HLA do doador processada por célula apresentadora de antígeno do receptor é apresentada ao linfócito do receptor (linfócito alorreativo)[15].

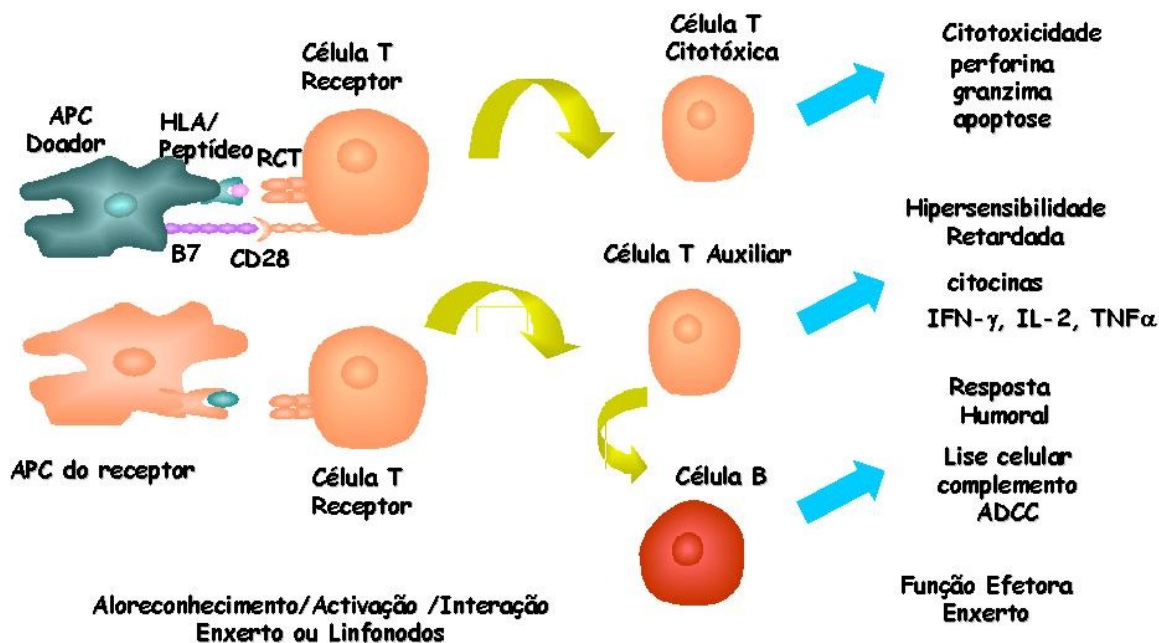
Desta maneira a molécula HLA do doador é tratada como qualquer antígeno estranho. Ela é processada e apresentada em moléculas HLA classe II para a ativação de LT CD4+, os quais são ativados em um padrão de resposta Th1 (helper). Tanto a via direta como a indireta não são excludentes entre si e, muito provavelmente, os dois mecanismos operam no alorreconhecimento, no desencadeamento da resposta imune e conseqüentemente na rejeição de órgãos [16]. As células Th (helper) são ativadas por APC derivadas da medula óssea e expressam moléculas HLA de classe II. As APCs indutoras de rejeição podem ser oriundas do doador ou do receptor. Aquelas oriundas do doador estão presentes no enxerto como “leucócitos passageiros” (células dendríticas intersticiais) e causam ativação direta das células Th do

receptor. Já as APCs oriundas do receptor estão localizadas nos tecidos linfóides que drenam a região do tecido transplantado e adquirem o antígeno liberado do transplante apresentando-o às células Th do receptor, promovendo a ativação indireta [16].

É importante salientar que o sinal gerado através do TCR durante o reconhecimento não é suficiente para a completa ativação do linfócito T, desta forma sinais coestimulatórios, também chamados de segundos sinais, devem ocorrer para a ativação de células T se complete [15, 18, 20]. A principal via coestimulatória é a via B7:CD28. As moléculas CD28 são expressas principalmente em linfócitos T, na maioria CD4+, e moléculas B7 e B7-2, (CD80 e CD86 respectivamente) em APCs. Outra via coestimulatória importante é a via CD40:CD40L. A partir destas ocorre a tradução dos sinais intracelulares, que por intermédio de uma cascata de ativação de fatores levará à transcrição de diversos genes e síntese de fatores de crescimento como as diversas interleucinas, além de receptores de alta afinidade para citocinas, o que irá colaborar para a diferenciação em células efetoras e para a expansão clonal [13].

Após a estimulação dos linfócitos T pela interação TCR com HLA mais peptídeos, ocorre aumento na concentração de cálcio intracelular e ativação de várias proteínas citoplasmáticas regulatórias, chamadas fatores de transcrição, entre eles destacam-se: NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell*), NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*) que se liga a regiões regulatórias dos genes de várias citocinas como IL-2, IL-4, Interferon- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral). A ativação da imunidade celular, seguida de resposta do tipo hipersensibilidade tardia com a ativação de macrófagos, monócitos e linfócitos T CD8+ parece ser o mecanismo final de agressão celular ao enxerto, sendo estes linfócitos os responsáveis pelo reconhecimento e a destruição da célula alvo. Para tanto o mecanismo final inclui os mediadores citolíticos como as granzimas e a perforina que ficam

estocadas no citoplasma dos linfócitos T CD8+, em grânulos semelhantes aos lisossomos, ocorrendo ativação celular ocorre a migração para a membrana citoplasmática, fundem-se a ela e libera os grânulos na direção da célula alvo. As células podem morrer por mecanismos de apoptose ou por necrose. A morte celular pode ocorrer pela ativação da via Fas/Fas-L uma potente indutora de apoptose. Estudos clínicos relataram através de técnicas de expressão molecular a presença de mRNA (RNA mensageiro) de Fas-L e perforina em rins com rejeição irreversível [16, 21]. Os principais mecanismos de reconhecimento, ativação e efetores da resposta aloimune estão sumarizados na figura 2 abaixo.



**Figura 2.** Mecanismos efetores de rejeição de aloenxertos. O reconhecimento alógeno, pelos linfócitos T, desencadeia uma série de interações entre diferentes células do sistema imune, ativando diversos mecanismos efetores de agressão ao enxerto, como: (i) citotoxicidade mediada por células, seja por apoptose, ou pela ação de substâncias citolíticas, como perforina e granzima; (ii) reação imunológica de hipersensibilidade retardada (ou tardia), com a produção de diversas citocinas inflamatórias; (iii) citotoxicidade mediada por anticorpos, seja pela ativação da cascata do complemento, seja com o envolvimento conjunto de células como as células NK (citotoxicidade dependente de anticorpo).

### 2.1.2 Tipos de rejeição

Os principais tipos de rejeição ao enxerto renal são a rejeição hiperaguda, acelerada, aguda e a crônica [22].

A rejeição hiperaguda caracteriza-se por uma rápida trombose oclusiva da vasculatura do enxerto, que tem início poucos minutos após os vasos sanguíneos do hospedeiro serem anastomosados aos vasos do órgão enxertado. A resposta hiperaguda é mediada por anticorpos pré-existentes que aderem ao endotélio, ativam complemento produzindo quimiotaxia de polimorfonucleares e trombose intravascular. A rejeição ocorre de forma imediata ou dentro do prazo de 24 horas. Muitas vezes o processo é observado ainda no centro cirúrgico pela equipe médica que contata um rim com aspecto flácido e azulado [16, 22, 23].

Este processo decorre da presença de anticorpos anti-HLA dirigidos a antígenos presentes nas células endoteliais do enxerto. Esses anticorpos reconhecem os antígenos do endotélio vascular ativando o complemento e a coagulação intravascular. Este tipo de rejeição é muito infreqüente com uso dos métodos disponíveis da prova cruzada pré-transplante, entretanto, incompatibilidades do sistema ABO também podem levar a perda imediata de órgãos transplantados [24, 25].

Clinicamente a rejeição acelerada pode ser considerada como uma forma intermediária entre a rejeição hiperaguda e aguda. Ela está relacionada à resposta imune secundária, usualmente por componente misto, composto por células e anticorpos citotóxicos. Clinicamente ela se apresenta com a diminuição súbita e importante da função renal geralmente entre o primeiro e o quarto dia pós-transplante [22].

O processo de rejeição aguda pode ocorrer em qualquer momento pós-operatório, porém o período crítico situa-se nos três primeiros meses. Ela ocorre devido à ativação primária dos

linfócitos T e de vários outros mecanismos efetores. As células T são ativadas em resposta principalmente as disparidades HLA produzindo citocinas que recrutam e ativam células inflamatórias com conseqüente inflamação do enxerto. O componente humoral se deve anticorpos anti-HLA *de novo*. Histologicamente a reação caracteriza-se pela presença de um infiltrado agudo de mononucleares freqüentemente associados à angeíte e tubulite podendo haver evidência de danos mediados por anticorpos, como presença de polimorfonucleares e glomerulite. Na análise imuno-histoquímica encontra-se infiltrado mononuclear heterogêneo de células T, macrófagos, células B, diversos linfócitos granulares com ocasionais leucócitos polimorfonucleares, eosinófilos e basófilos [26, 27]. O componente humoral é detectado pela deposição, nos capilares peri-tubulares, de fração C4d do complemento [28].

A rejeição crônica é a principal causa de perda tardia de rins transplantados, e sua patogenia está relacionada com mecanismos imunológicos mediados por células T e anticorpos [29, 30]. Caracteriza-se por fibrose, com perda da função do enxerto, fato este que ocorre em períodos tardios ao transplante podendo estar presente por longos períodos ou até mesmo anos. Dentre os achados patológicos neste tipo de rejeição encontram-se arteriosclerose e nefrosclerose relacionado a dano endotelial, fibrose intersticial relacionada a dano e reparação dos elementos do interstício e alterações da estrutura dos glomérulos [31, 32].

## **2.2 Biomarcadores**

Nos últimos 60 anos tem se observado uma explosiva evolução nos campos da genética e biologia molecular: a descoberta da dupla hélice de DNA por *Watson* e *Crick* em meados dos anos cinqüenta, a conclusão do projeto genoma humano em 2003 e o aperfeiçoamento das ferramentas utilizadas nas análises possibilitaram o mapeamento da grande variação estrutural

genética humana. Com todos esses conhecimentos em ascensão, as técnicas e os equipamentos em biologia molecular passaram por grandes e importantes transformações [33].

O termo biomarcador foi introduzido a partir de 1989 e traduz a idéia de “marcadores biológicos”, onde descreve qualquer indicador mensurável de diagnóstico que pode ser utilizado para avaliar o risco ou a presença de doença, levando a elucidação de processos fisiopatológicos e identificando novos alvos terapêuticos [33, 34].

A utilização de biomarcadores vem sendo uma ferramenta útil na avaliação da fisiopatogenia de diversas condições associadas com disfunção do enxerto, podendo fornecer dados prévios sobre o órgão transplantado, possibilitando a elucidação precoce dos mecanismos envolvidos nos ataques imunológicos. Além disso, a mensuração se dá de forma rápida, exequível e padronizada, sendo altamente sensíveis [11, 35].

Os marcadores biológicos ganham espaço na prática clínica principalmente na monitorização do enxerto, uma vez que a dosagem sérica da creatinina não pode ser considerada como um indicador acurado da função renal devido ao grande viés ao qual está inerente, como por exemplo: alteração em virtude da idade, sexo, hidratação. Além disso, as concentrações séricas da creatinina podem não mudar até que uma porção substancial da função renal seja perdida. A biópsia renal é o “padrão-ouro” para a elucidação das disfunções dos enxertos, no entanto ela é um procedimento com potencial morbidade, elevados custos, sujeito a erros de amostragem e a variabilidade de interpretação [36-38].

### **2.2.1 Biomarcadores: Aplicações no transplante renal**

O alorreconhecimento, a ativação de linfócitos T, e a subsequente infiltração de células inflamatórias são elementos-chaves no processo de rejeição aguda ao enxerto. Na fase efetora os



processos citotóxicos desempenham um importante papel, que quando ativam células CD8+ secretam, entre outras moléculas, perforina e granzima B. Essas duas moléculas são importantes para a atividade citotóxica do linfócito CD8+, que acarretará em danos nos tecidos e apoptose das células alvo [39].

A identificação de linfócitos T citotóxicos em aloenxertos foi inicialmente demonstrada por Strom e colaboradores, pela da fenotipagem do infiltrado mononuclear em rins com rejeição irreversível. Posteriormente, utilizando a técnica do PCR competitivo em rins com rejeição aguda, pesquisadores do mesmo grupo, quantificaram o aumento da expressão dos genes de perforina e granzima B, que atuam na fase cito-destrutiva da resposta imune. Na continuidade, Strehlau e colaboradores detectaram em rins com critérios histológicos de rejeição aguda, aumento significativo da expressão dos genes que codificam para a síntese de IL-7, IL-10, IL-15, fas ligante, perforina e granzima B. Neste estudo a análise simultânea de perforina, granzima B e fas ligante foram capazes de identificar rejeição aguda mesmo em órgãos com infiltrados leves, com elevada sensibilidade e especificidade [40-43].

A perforina sofre polimerização na presença de íons de cálcio promovendo assim a formação de poros na membrana da célula alvo, permitindo a entrada da granzima B na célula que exercerá as ações descritas abaixo. Além disso, estes poros induzem as mudanças no gradiente osmótico celular, propiciando assim perturbação do ambiente intra-celular com a ocorrência de lise. A granzima B, que pertence à família da serino-proteases, quando presente no citoplasma de uma célula-alvo ativa reações que levam a fragmentação do DNA, causando a apoptose da célula [39, 44].

A proteína codificada pelo gene Fas é um membro da superfamília de receptores do TNF, que desempenha papel fisiológico da morte celular programada. Assim como o Fas, o seu ligante

Fas Ligante (Fas-L), fica expresso na superfície de linfócitos Th1 ativados, representando assim função na modulação da resposta imunológica, incluindo a supressão periférica de células com atividade auto-imune, a ativação da morte celular induzida por células T e a mediada por células T citotóxicas [44-46].

Outra proteína relevante neste processo foi descrita em 2001 e pertence à família TIM (*T-cell immunoglobulin domain mucin*). Dentre os três grupos existentes em humanos destaca-se a TIM-3 (*T-cell immunoglobulin domain mucin 3*), que se expressa principalmente na superfície celular de linfócitos Th1 com função de inibir a resposta imune, e importantes implicações no transplante de órgãos, investigação de processos imunes e a indução de tolerância imunológica [47-49]. Renesto e colaboradores demonstraram que a molécula Tim-3 está expressa em células da urina de pacientes com rejeição aguda 428 vezes mais do que em pacientes sem esta condição, apresentando sensibilidade superior a 97% para o seu diagnóstico [50].

Quantificado o mRNA desta mesma molécula observou-se resultados acurados, tanto na análise do sangue periférico quanto nas células do sedimento urinário, para o diagnóstico não invasivo da rejeição aguda em pacientes com disfunção aguda e em pacientes com disfunção inicial do enxerto [51].

Na última década diferentes estudos destacam um subgrupo de linfócitos especializados na supressão da auto-imunidade, chamados “reguladores de expressão” (*Treg cells*). Essas células expressam o fator de transcrição FOXP3 (*X-linked forkhead/winged helix transcription factor*) [52, 53], sendo capazes de inibir a atividade de outros linfócitos, por mecanismos ainda não completamente esclarecidos, mas que aparentemente envolvem a regulação transcricional do gene da IL-2. Além da presença nas células Treg de origem tímica, a expressão de FOXP3 também pode ser induzida em linfócitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no sangue periférico, sob estímulo de

algumas citocinas, como o TGF- $\beta$  [54-57]. No sangue humano 97,5% destas células, expressam FOXP3, em vista da especificidade do gene, ele tem sido proposto como marcador molecular de eventos imunológicos. Em transplante renal o mRNA deste gene foi identificado em células urinárias, podendo propiciar um marcador não-invasivo acurado na predição de rejeição aguda destes transplantes . Muthukumar e colaboradores observaram sensibilidade de 90% e especificidade de 96 % nos níveis de FOXP3 na urina de pacientes com rejeição aguda, concluindo que a quantificação do mRNA FOXP3 na urina pode oferecer um diagnóstico não invasivo e assim, predizer a rejeição aguda no transplante renal [58] . Em estudo de nosso laboratório, fomos capazes de detectar aumentos expressivos desta molécula em episódios de rejeição aguda de transplantes renais com disfunção inicial em três compartimentos (tecido renal, células sanguíneas e células do sedimento urinário) [11, 26, 59, 60].

A granulicina é uma molécula pertencente à família da *saposin-like protein* (SAPLIP) sendo descrita como uma proteína com ação citolítica expressa constitutivamente em células *natural killer* (NK) e linfócitos T citotóxicos [61, 62]. O seu mecanismo relaciona-se com a estimulação do receptor da célula T levando a apoptose celular devido à liberação da granulicina na célula alvo com subsequente dano celular na membrana e na mitocôndria com ativação das caspases . Esta proteína já vem sendo considerada preditora de episódios de rejeição já nos primeiros dias após o transplante, através da mensuração do gene que a codifica em células urinárias [63, 64].

As quimiocinas são citocinas com função central na fisiologia leucocitária ao controlar o tráfego basal e inflamatório. Elas se classificam em famílias baseadas no número e localização de resíduos de cisteínas N-terminais. O papel das citocinas e quimiocinas no transplante renal, foi documentado pela primeira vez em 1993 e os estudos demonstram a participação tanto de

mediadores relacionados com a produção de células T helper 1 (Th1) quanto de células T helper2 (Th2) [65]. Recentemente investigações da expressão gênica estudaram dois grupos de quimiocinas e as relacionaram com a rejeição aguda em transplante renal: *Chemokine ligand -10* (CXCL-10/ IP-10) e a *Chemokine ligand -9* (CXCL-9/IP-9), a primeira revelou não somente uma correlação do seu aumento em amostras de urina em casos de rejeição aguda do enxerto, como também a diferenciação de sua expressão nos primeiros dias após o transplante [66]. Em pacientes pós-transplante renal, Rotondi e colaboradores relacionaram um aumento da expressão de CXCL10, com o diagnóstico de rejeição aguda nos três primeiros meses após o transplante [67]. Estudos realizados por Pereira e colaboradores relataram a importância do CXCL10 e CXCL9, como preditores úteis da resposta ao tratamento da rejeição aguda [68].

Em estudos realizados por grupos distintos, o gene denominado CXCL9 caracterizou-se como um biomarcador preditivo da rejeição aguda em transplante renal [69-71]. Rotondi e colaboradores relataram que níveis de CXCL9, bem como CXCL10, poderiam representar um parâmetro clínico útil para identificar indivíduos com alto risco de rejeição aguda e falência do enxerto [67]. Brouard e colaboradores também demonstraram que CXCL9 é altamente expressa em células de biópsias renais de pacientes com rejeição aguda, particularmente em estruturas vasculares e tubulares. Os autores sugerem que o CXCL9 pode estar envolvido no surgimento da disfunção crônica do enxerto [71].

Outros estudos demonstram a relevância na quantificação de células urinárias de CXCL9, como indicativa de eventos relacionados a rejeição aguda [72]. Rotondi e colaboradores relataram que o nível sérico pré-transplante do CXCL9 foi significativamente maior em pacientes cujos enxertos sobreviveram do que naqueles em que houve perda do enxerto. Neste mesmo estudo os níveis séricos pré-transplante de CXCL9 de pacientes que desenvolveram

rejeição aguda foi significativamente maior do que nos pacientes que não a apresentaram [73]. Em concordância com estes estudos, Hauser e colaboradores descrevem a medida de CXCL9 urinária, como sendo um indicador sensível e específico de rejeição aguda [70].

Muthukumar e colaboradores avaliaram a expressão gênica da serpina proteinase inibidora 9 (IP9), granzima B e perforina, e concluíram que a elevada expressão de IP9 pode ser um preditor da disfunção renal [74].

Até o presente momento maioria dos estudos que evidenciaram genes candidatos a preditores do desenvolvimento de rejeição aguda, foram feitos após o transplante. Consideramos, no entanto que, um teste preditivo poderia ter maior valor clínico se o teste puder antecipar o risco antes da realização do transplante, o que poderia levar a estratégias imunossupressoras mais eficazes, levando a melhoras em desfechos como rejeição aguda e função do enxerto. Evidentemente, neste cenário apenas condições afeitas ao sistema imune do receptor seriam avaliadas não sendo considerada a importante interação receptor com o tecido transplantado.

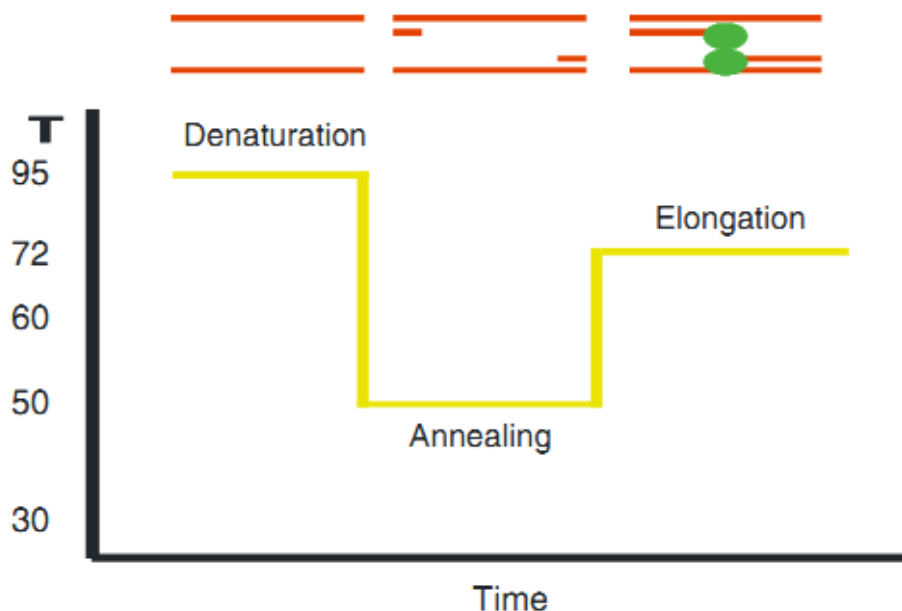
### **2.3 Biologia Molecular aplicada no Transplante Renal**

Em meados da década de 90 as diferentes abordagens diagnósticas histopatológicas obtiveram consistência e aumento de reprodutibilidade com a introdução da classificação de Banff [75, 76]. Desde então, padrões para o diagnóstico de rejeição vêm sendo estabelecidos, no entanto continuam a existir limitações relacionadas a subjetividade e a heterogeneidade diagnóstica [75].

Nas últimas décadas as técnicas da biologia molecular proporcionaram novas oportunidades para o desenvolvimento de ferramentas mais acuradas para relacionar a expressão de genes em amostras não invasivas com eventos intra-enxerto . Ademais o advento da biologia

molecular acrescenta novas abordagens ao diagnóstico e à compreensão da patogênese das doenças renais, com a participação de áreas correlatas a genômica como a proteômica, e a metabolômica [33, 77]. De forma a exemplificar a vasta importância da biologia molecular aplicada à nefrologia, cita-se a utilização desta ciência na avaliação prognóstica onde é possível constatar que os níveis de mRNAs codificadores de proteínas de matriz extracelular, sofrem gradual elevação acompanhando o avanço e o grau de esclerose nas fases tardias de várias doenças renais, também a expressão dos fatores intrínsecos de proteção do tecido contra o dano permanente ao tecido renal [78, 79]. Em biópsias de transplante renal, diversas moléculas demonstraram aumento de expressão devido a uma resposta alogênica ou por outras lesões [80, 81].

A PCR foi descrita originalmente como uma técnica para amplificação de DNA, posteriormente a amplificação de DNA complementar, pela ação da transcriptase reversa, permitiu a análise transcricional do RNA. A reação a partir do DNA complementar é denominada RT-PCR. As fases da reação, abertura da fita de DNA, anelamento dos “*primers*” e incorporação dos oligonucleotídeos estão sumarizadas na figura 3 abaixo [82].



**Figura 3.** O ciclo de Temperatura da PCR: 1) A temperatura se eleva em cerca de 95°C, ocorrendo desta forma a separação da dupla fita de DNA. 2) Ocorre diminuição da temperatura para que ocorra anelamento dos primers 3) A temperatura, se eleva a 72°C para que a polimerase realize o anelamento dos primers Ciclos de uma PCR convencional.

A técnica de PCR evoluiu substancialmente com o advento da PCR em tempo real. Ela foi desenvolvida por Higuchi e colaboradores, e basicamente permite que se monitore a quantidade de produto formado durante o curso da reação sendo assim uma reação quantitativa, altamente sensível que permite quantificar transcritos raros [83, 84] com pequenas variações na expressão gênica. Esta metodologia exige um termociclador com precisão óptica, capaz de monitorar a emissão de fluorescência das amostras, uma vez que a quantificação do produto da reação é feita ciclo a ciclo e o sistema é baseado na detecção e quantificação de um *reporter* fluorescente. Os programas de computador que dão sustentação ao termociclador monitoram os dados ao longo de toda a PCR em cada ciclo e geram um gráfico de amplificação para cada reação. O sinal aumenta na proporção direta da quantidade de produto formado na reação [43, 85-88].

No presente estudo utilizamos a técnica da PRC em tempo real aplicada em amostras de sangue periférico colhidas antes do transplante renal para testar a hipótese de que é possível se obter no período pré-transplante análises moleculares que sejam preditivas do desenvolvimento do evento imunológico da rejeição aguda no período pós-transplante renal.



### **CAPÍTULO 3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo Geral**

Identificar, em pacientes urêmicos, pré-transplante renal, perfis de expressão gênica que permitam prever a ocorrência de rejeição aguda no período pós-transplante.

### **3.2. Objetivos Específicos**

Avaliar se as quantificações das expressões dos mRNAs dos genes FOXP3, TIM3, Perforina, CXCL-10, Granulosina e CXCL9 em células mononucleares do sangue periférico de pacientes em pré-operatório imediato de transplante renal podem:

Ser preditoras da rejeição aguda pós-transplante renal;

Se correlacionar com a função do enxerto renal;

Apresentar correlação com a ocorrência de infecções após o transplante renal.

## **CAPÍTULO 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Mota, A., *Transplantação renal: uma história de sucesso*. Rev Fac Med Lisboa, 2004. **9**(1): p. 19-26.
2. Neto, A.L.C., et al., *Atualização em insuficiência renal aguda: Nefrotoxicidade aguda de drogas imunossupressoras* J Bras Nefrol, 2000. **22**(2): p. 114-20.
3. Carvalho, A.A.T., M.A.S.F. Sofia, and H.L. Melo, *Renal Transplant: the influence of the immunosuppressive therapy in the prevalence of stomatologic manifestations*. Revista Odontologia Clínico Científica / OCC, 2003.
4. Manfro, R.C., L.F. Goncalves, and D. Saitovitch, *Atualização em Transplante Renal: Progresso na Indução de tolerância em transplantes humanos*. J.Bras. Nefrol., 1999. **21**: p. 130-142.
5. Peres, L.A.B., et al., *Análise da sobrevida de enxertos e receptores de 188 transplantes reanais realizados na cidade de Cascavel, Pr.* J Bras Nefrol, 2003. **25**(3): p. 133-41.
6. Meier-Kriesche, H.U., J.D. Schold, and B. Kaplan, *Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies?* Am J Transplant, 2004. **4**(8): p. 1289-95.
7. Meier-Kriesche, H.U., et al., *Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era*. Am J Transplant, 2004. **4**(3): p. 378-83.
8. Cosio, F.G., et al., *Impact of acute rejection and early allograft function on renal allograft survival*. Transplantation, 1997. **63**(11): p. 1611-5.
9. Mota, A., [Acute rejection in cadaveric renal transplantation under cyclosporine based therapy. Analysis of the risk factors and its influence on chronic dysfunction]. Acta Med Port, 2004. **17**(1): p. 8-14.
10. Mota, A., *Rejeição Aguda em Transplantação Renal: Análise dos factores de Risco e sua Influência na Disfunção Crônica*. Acta Med Port, 2004. **17**: p. 8-14.
11. Aquino-Dias, E.C., et al., *Monitorização Molecular da Rejeição de Transplantes Renais*. J Bras Nefrol 2005. **XXVII**(2): p. 76-83.
12. Hernandez-Fuentes, M.P. and R.I. Lechler, A 'biomarker signature' for tolerance in transplantation. Nat Rev Nephrol. **6**(10): p. 606-13.
13. Noronha, L.I., et al., *Inmunobiologia Del Transplante Renal*, in *Manual de Transplante Renal*, Manole, Editor. 2007.
14. Otto, C.H. and K. Ulrichs, *The Immunology of Allograft Rejection: A Survey of Current Knowledge and a Discussion of Peptide-Specific Anti-Rejection Strategies*. Transplantationsmedizin 2004. **16**.
15. Kalil, J., P. Nicolas, and V. Coelho, *Imunologia do Transplante Renal*, in *Manual de Transplante Renal*, Manole, Editor. 2004: São Paulo.
16. Abbas, A.K. and A.H. Lichtman, *Imunologia celular e Molecular*. 5 ed. 2005, Rio de Janeiro. 553.
17. Goncalves, L.F., et al., *Aspectos Clínicos Rotinas e Complicações do Transplante Renal*, in *Nefrologia Rotinas e Diagnostico*, A. Medicas, Editor. 2005: Porto Alegre. p. 455-485.
18. Barros, E., et al., *Nefrologia - Rotinas, diagnóstico e tratamento*. 3 ed. 2006. 620.
19. Barros, E., et al., *Introdução a Biologia Celular e Molecular*, in *Nefrologia: Rotinas Diagnostico e Tratamento*, Artmed, Editor. 2006.

20. Manfro, R.C. and L.F. Goncalves, *Transplante Renal: Imunologia e farmacologia das drogas imunossupressoras in Nefrologia Rotinas, diagnóstico e tratamento*, E. Barros, et al., Editors. 2006. p. 443-453.
21. Suthanthiran, M. and T.B. Strom, *Renal transplantation*. N Engl J Med, 1994. **331**(6): p. 365-76.
22. Ajzen, H. and N. Schor, *Guia de Nefrologia*. 3 ed. 2010. 872.
23. Davis, C.L. and D.E. Hricik, *Transplant: immunology and treatment of rejection*. Am J Kidney Dis, 2004. **43**(6): p. 1116-37.
24. Cai, J. and P.I. Terasaki, *Human leukocyte antigen antibodies for monitoring transplant patients*. Surg Today, 2005. **35**(8): p. 605-12.
25. Michaels, P.J., M.C. Fishbein, and R.B. Colvin, *Humoral rejection of human organ transplants*. Springer Semin Immunopathol, 2003. **25**(2): p. 119-40.
26. Aquino-Dias, E.C., et al., *Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function*. Kidney Int, 2008. **73**(7): p. 877-84.
27. Hartono, C., T. Muthukumar, and M. Suthanthiran, *Noninvasive diagnosis of acute rejection of renal allografts*. Curr Opin Organ Transplant, 2010. **15**(1): p. 35-41.
28. Ribeiro, A.R., et al., *Treatment of the Acute Humoral Rejection in Kidney Allografts* J Bras Transpl, 2009. **12**: p. 1092-1095.
29. Azuma, H. and N.L. Tilney, *Immune and nonimmune mechanisms of chronic rejection of kidney allografts*. J Heart Lung Transplant, 1995. **14**(6 Pt 2): p. S136-42.
30. Tullius, S.G. and N.L. Tilney, *Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection*. Transplantation, 1995. **59**(3): p. 313-8.
31. Racusen, L.C., et al., *The Banff 97 working classification of renal allograft pathology*. Kidney Int, 1999. **55**(2): p. 713-23.
32. Toresan, R., *Avaliação da Presença de anticorpos Anti-HLA no primeiro ano do Transplante Renal*, in *Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas - Nefrologia*. 2007, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS: Porto Alegre. p. 132.
33. Naesens, M. and M.M. Sarwal, *Molecular diagnostics in transplantation*. Nat Rev Nephrol, 2010. **6**(10): p. 614-28.
34. Soni, S.S., R. Pophale, and C. Ronco, *New biomarkers for acute renal injury*. Clin Chem Lab Med, 2011. **49**(8): p. 1257-63.
35. Devarajan, P., *Emerging urinary biomarkers in the diagnosis of acute kidney injury*. Expert Opin Med Diagn, 2008. **2**(4): p. 387-398.
36. Ronco, C., *N-GAL: diagnosing AKI as soon as possible*. Crit Care, 2007. **11**(6): p. 173.
37. Dennen, P. and C.R. Parikh, *Biomarkers of acute kidney injury: can we replace serum creatinine?* Clin Nephrol, 2007. **68**(5): p. 269-78.
38. Bellomo, R., J.A. Kellum, and C. Ronco, *Defining acute renal failure: physiological principles*. Intensive Care Med, 2004. **30**(1): p. 33-7.
39. Leitão, T.G., et al., *Expression of cytotoxic mediators (perforin, granzyme B, FAS, and FAS-l) in renal allograft biopsies*. einstein, 2006. **4**(4): p. 277-283.
40. Strom, T.B., et al., *Cellular components of allograft rejection: identity, specificity, and cytotoxic function of cells infiltrating acutely rejecting allografts*. J Immunol, 1977. **118**(6): p. 2020-6.

41. Strehlau, J., et al., *Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(2): p. 695-700.
42. Lipman, M.L., A.C. Stevens, and T.B. Strom, *Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts*. J Immunol, 1994. **152**(10): p. 5120-7.
43. Aquino-Dias, E.C., *Avaliação Molecular da Disfunção Inicial do Enxerto em Transplantes Renais*, in *Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas : Nefrologia*. 2007, Universidade Federal do Rio Grande do Sul UFRGS: Porto Alegre. p. 84.
44. Graziotto, R., et al., *Perforin, Granzyme B, and fas ligand for molecular diagnosis of acute renal-allograft rejection: analyses on serial biopsies suggest methodological issues*. Transplantation, 2006. **81**(8): p. 1125-32.
45. Cashion, A.K., et al., *Serial peripheral blood cytotoxic lymphocyte gene expression measurements for prediction of pancreas transplant rejection*. Transplant Proc, 2006. **38**(10): p. 3676-7.
46. Netto, M.V., et al., *Granzyme B, FAS-ligand and perforin expression during acute cellular rejection episodes after kidney transplantation: comparison between blood and renal aspirates*. Transplant Proc, 2002. **34**(2): p. 476-8.
47. Sanchez-Niño, M.D., et al., *TNF Superfamily: A Growing Saga of Kidney Injury Modulators*. Mediators of Inflammation, 2010. **2010**: p. 11.
48. Zhao, W., et al., *Molecular characterization of the porcine TIM-3 gene*. Scand J Immunol, 2010. **73**(1): p. 29-35.
49. Schroll, A., et al., *Tim3 is upregulated and protective in nephrotoxic serum nephritis*. Am J Pathol, 2010. **176**(4): p. 1716-24.
50. Yeung, M.Y., M. McGrath, and N. Najafian, *The Emerging Role of the TIM Molecules in Transplantation*. Am J Transplant, 2011.
51. Renesto, P.G., et al., *High expression of Tim-3 mRNA in urinary cells from kidney transplant recipients with acute rejection*. Am J Transplant, 2007. **7**(6): p. 1661-5.
52. Manfro, R.C., et al., *Noninvasive Tim-3 messenger RNA evaluation in renal transplant recipients with graft dysfunction*. Transplantation, 2008. **86**(12): p. 1869-74.
53. Ricciardelli, I., et al., *Anti tumour necrosis-alpha therapy increases the number of FOXP3 regulatory T cells in children affected by Crohn's disease*. Immunology, 2008. **125**(2): p. 178-83.
54. Sakaguchi, S. and F. Powrie, *Emerging challenges in regulatory T cell function and biology*. Science, 2007. **317**(5838): p. 627-9.
55. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
56. Sakaguchi, S., et al., *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **305**: p. 51-66.
57. Naka, E.L., et al., *Detection of immunoregulator molecules inside non-functional kidney allografts upon a rejection episode*. J Bras Transpl 2008. **11**: p. 856-860.
58. Muthukumar, T., et al., *Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients*. N Engl J Med, 2005. **353**(22): p. 2342-51.
59. Manfro, R.C., et al., *Acute phosphate nephropathy in a kidney transplant recipient with delayed graft function*. Transplantation, 2009. **87**(4): p. 618-9.

60. Nogare, A.L., et al., *Quantitative analyses of kidney injury molecule-1 messenger RNA in kidney transplant recipients with graft dysfunction*. *Transplant Proc.* **42**(2): p. 473-4.
61. Sarwal, M.M., et al., *Granulysin Expression is a Marker in Human Renal Transplantation*. *Transplantation*, 2001. **62**: p. 21-31.
62. Pena, S.V. and A.M. Krensky, *Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity*. *Semin Immunol*, 1997. **9**(2): p. 117-25.
63. Clayberger, C. and A.M. Krensky, *Granulysin*. *Curr Opin Immunol*, 2003. **15**(5): p. 560-5.
64. Kotsch, K., et al., *Enhanced granulysin mRNA expression in urinary sediment in early and delayed acute renal allograft rejection*. *Transplantation*, 2004. **77**(12): p. 1866-75.
65. Gerard, C. and B.J. Rollins, *Chemokines and disease*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(2): p. 108-15.
66. Hancock, W.W., et al., *Donor-derived IP-10 initiates development of acute allograft rejection*. *J Exp Med*, 2001. **193**(8): p. 975-80.
67. Rotondi, M., et al., *High pretransplant serum levels of CXCL10/IP-10 are related to increased risk of renal allograft failure*. *Am J Transplant*, 2004. **4**(9): p. 1466-74.
68. Pereira, A.B., et al., *cytokines and chemokines in renal transplantation*. *J Bras Nefrol* 2009. **31**(4): p. 286-296.
69. Lo, D.J., et al., *Chemokines and their receptors in human renal allotransplantation*. *Transplantation*. **91**(1): p. 70-7.
70. Hauser, I.A., et al., *Prediction of acute renal allograft rejection by urinary monokine induced by IFN-gamma (MIG)*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. **16**(6): p. 1849-58.
71. Brouard, S. and J.P. Soulillou, *Pre-transplant serum level of CXCL9 as a biomarker of acute rejection and graft failure risk in kidney transplantation*. *Transpl Int*, 2009. **23**(5): p. 461-2.
72. Belperio, J.A., et al., *Role of CXCL9/CXCR3 chemokine biology during pathogenesis of acute lung allograft rejection*. *J Immunol*, 2003. **171**(9): p. 4844-52.
73. Rotondi, M., et al., *High pretransplant serum levels of CXCL9 are associated with increased risk of acute rejection and graft failure in kidney graft recipients*. *Transpl Int*. **23**(5): p. 465-75.
74. Muthukumar, T., et al., *Serine proteinase inhibitor-9, an endogenous blocker of granzyme B/perforin lytic pathway, is hyperexpressed during acute rejection of renal allografts*. *Transplantation*, 2003. **75**(9): p. 1565-70.
75. Solez, K., et al., *Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions*. *Am J Transplant*, 2008. **8**(4): p. 753-60.
76. Solez, K., et al., *Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN')*. *Am J Transplant*, 2007. **7**(3): p. 518-26.
77. Rush, D.N., et al., *Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients*. *Transplantation*, 1994. **57**(2): p. 208-11.
78. Soares, M. and M. F., *Application of Molecular Biology to Renal Pathology: Review of the Literature*. *J Bras Nefrol* 2007. **29**(2).
79. Eikmans, M., et al., *Genetic factors in progressive renal disease: the good ones, the bad ones and the ugly ducklings*. *Nephrol Dial Transplant*, 2006. **21**(2): p. 257-60.

80. Riera, M., S. Burtey, and M. Fontes, *Transcriptome analysis of a rat PKD model: Importance of genes involved in extracellular matrix metabolism*. *Kidney Int*, 2006. **69**(9): p. 1558-63.
81. Mueller, T.F., et al., *Microarray analysis of rejection in human kidney transplants using pathogenesis-based transcript sets*. *Am J Transplant*, 2007. **7**(12): p. 2712-22.
82. Reeve, J., et al., *Diagnosing rejection in renal transplants: a comparison of molecular- and histopathology-based approaches*. *Am J Transplant*, 2009. **9**(8): p. 1802-10.
83. Kubista, M., et al., *The real-time polymerase chain reaction*. *Mol Aspects Med*, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.
84. Higuchi, R., et al., *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences*. *Biotechnology (N Y)*, 1992. **10**(4): p. 413-7.
85. Zimring, J.C. and F.S. Nolte, *Reação em Cadeia da Polimerase e Outras Tecnologias de Amplificação*, in *Diagnósticos Clínicos e Tratamentos por Métodos Laboratoriais*, Manole, Editor. 2008: São Paulo. p. 1734.
86. Higuchi, R., et al., *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. *Biotechnology (N Y)*, 1993. **11**(9): p. 1026-30.
87. Bustin, S.A. and R. Mueller, *Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis*. *Clin Sci (Lond)*, 2005. **109**(4): p. 365-79.
88. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(9): p. e45.



**CAPITULO 5. ARTIGO “QUANTIFICAÇÃO GÊNICA PRÉ-TRANSPLANTE RENAL  
– PREDIÇÃO DA REJEIÇÃO AGUDA”**

Formato para submissão à revista *TRANSPLANTATION*

Raphael Sahd<sup>1,2</sup>

Gabriel Joelsons<sup>1,2</sup>

Thais Haim<sup>2</sup>

Roberto C. Manfro,<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Nefrologia – Labman

<sup>3</sup> Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. Brasil. Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Palavras Chaves: Transplante renal, Rejeição Aguda, Biomarcadores, Predição

Contagem de palavras do resumo: 231

Contagem de palavras do texto: 3.156

Número de tabelas: 04

Número de figuras: 01

Correspondência: Dr. Roberto C. Manfro

Serviço de Nefrologia do Hospital das Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, sala 2030

Porto Alegre, RS. 90035-003

Fax: 51 3359-8121, e-mail: [rmanfro@hcpa.ufrgs.br](mailto:rmanfro@hcpa.ufrgs.br)

---

<sup>1</sup> RS participou do delineamento e realização do estudo, na redação do artigo e na análise de dados, GJ participou da realização do estudo e análises dos dados, TH participou no levantamento de dados e realização do estudo, LFG participou no delineamento do estudo, RCM participou do delineamento e realização do estudo, na redação do artigo e na análise de dados.

Não há conflitos de interesse.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>
<b>cDNA</b>	ácido desoxirribonucléico complementar
<b>CT</b>	ciclo do <i>threshold</i>
<b>CXCL-10</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 10 / IP-10
<b>CXCL-9</b>	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 9 /IP-9</i>
<b>CXCR3</b>	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 3</i>
<b>DC</b>	disfunção crônica
<b>DGF</b>	retardo na função do enxerto
<b>FOXP3</b>	<i>forkhead box P3</i>
<b>HLA</b>	antígeno leucocitário humano / <i>human leucocyte antigen</i>
<b>IF/TA</b>	fibrose intersticial com atrofia tubular
<b>IL</b>	interleucina
<b>MDRD</b>	<i>modification of diet in renal disease</i>
<b>mRNA</b>	mensageiro do ácido ribonucléico
<b>NCE</b>	nefropatia crônica do enxerto
<b>NRA</b>	ausência de rejeição aguda
<b>PCR</b>	reação em cadeia da polimerase / <i>polymerase chain reaction</i>
<b>PRA</b>	reatividade contra painel
<b>RA</b>	rejeição aguda
<b>RNA</b>	ácido ribonucléico
<b>RT-PCR</b>	reação em cadeia da polimerase em tempo real
<b>SPSS</b>	<i>statistical package for social sciences</i>
<b>TCR</b>	receptor de célula T
<b>TFGe</b>	taxa de filtração glomerular estimada
<b>TIM3</b>	<i>T Cell Immunoglobulin Mucin-3</i>

## RESUMO

**Introdução:** A rejeição aguda (RA) permanece entre as principais causas de perda de enxertos renais. A disponibilidade de biomarcadores prognósticos de RA no período pré-transplante poderia ser útil na individualização do tratamento destes pacientes. Neste estudo avaliamos o potencial como biomarcadores prognósticos pré-transplante da mensuração do RNA mensageiro de diferentes genes envolvidos na resposta alogênica.

**Material e Métodos:** Foram coletadas amostras pré-transplante de 51 pacientes que receberam enxertos renais entre 2008 a 2009. Realizou-se a mensuração da expressão do mRNA dos genes TIM3, FOXP3, Perforina, CXCL-9, CXCL-10 e Granulisina, em células mononucleares do sangue periférico através da técnica de PCR em tempo real. Os resultados da expressão gênica foram correlacionados com a ocorrência de RA, presença de infecções virais e bacterianas em até 1 ano e com a função do enxerto renal aos 1, 6 e 12 meses pós-transplante.

**RESULTADO:** Os genes TIM3, FOXP3, Perforina e CXCL-9, não apresentaram significância estatística nos grupos que apresentaram ou não episódios de rejeição aguda. A expressão gênica de CXCL-10 e Granulisina foi significativamente menor no grupo que apresentou rejeição aguda ( $P < 0,05$ ). Não houve diferença significativa na correlação entre pacientes que desenvolveram infecção viral ou bacteriana no pós-transplante renal. O mesmo resultado foi encontrado na avaliação da função renal do enxerto.

**CONCLUSÃO:** A análise da expressão dos genes avaliados neste estudo no momento prévio ao transplante renal não foi preditor da ocorrência de rejeição aguda.

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o transplante renal passou a ser um procedimento rotineiro para o tratamento dos pacientes com insuficiência renal crônica, oferecendo-lhes maior sobrevida com melhor qualidade. A rejeição aguda (RA) está entre as maiores causas de perda do enxerto renal nos primeiros anos após o transplante e também está relacionada a uma série de complicações que muitas vezes levam à disfunção crônica (DC) e a falência renal. Os novos fármacos imunossuppressores diminuíram a incidência da rejeição aguda significativamente, no entanto, a sobrevida em longo prazo apresentou melhora menos substancial devido principalmente às perdas de enxertos pela condição atualmente denominada fibrose intersticial com atrofia tubular (IF/TA) (1-4).

Na prática clínica, a monitorização dos enxertos renais realiza-se pela medida de sua função, determinando-se rotineiramente a creatinina sanguínea, cujas variações não são específicas para a rejeição, e pela biópsia renal, um procedimento invasivo, com potencial de morbidade, elevado custo financeiro e sujeito a erros de amostragem e variabilidade de interpretação (5, 6). As tentativas de desenvolvimento de marcadores biológicos (biomarcadores) acurados têm ocupado espaço cada vez maior como objeto de estudo na transplantação, podendo ser útil na monitorização dos transplantes renais, possibilitando estabelecimento de prognósticos e diagnósticos precoces, não invasivos e acurados de diversas condições, mas principalmente da rejeição aguda (7-10).

A aplicação de técnicas mais sensíveis de biologia molecular na identificação de RNA mensageiro (mRNA), como a reação em cadeia da polimerase (PCR), tem fornecido informações importantes com relação ao diagnóstico da rejeição aguda, ao prognóstico e a resposta

terapêutica em transplantes renais, já que é possível por esta metodologia realizar uma quantificação de transcritos de genes em amostras não invasivas como em células do sangue periférico e em células do sedimento urinário (11-13).

A técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) permite a quantificação dos produtos da reação com elevada precisão. O método é bastante sensível e reprodutível, permitindo a detecção da expressão gênica em curto período de tempo. A aplicação deste método na avaliação de transplantes renais poderá vir a se constituir em um importante método na monitorização dos eventos inflamatórios intra-enxerto (14, 15).

Neste estudo buscou-se testar a hipótese de que é possível se obter, no período pré-transplante, análises moleculares de quantificação da expressão gênica que possam ser preditivas da rejeição aguda pós-transplante renal. Estudamos TIM3, FOXP3, Perforina, CXCL9, CXCL10 e a Granulisina como genes candidatos os quais foram avaliados pela técnica da RT-PCR.

## **RESULTADOS**

### ***Dados demográficos e rejeição aguda***

A amostra estudada foi constituída de 51 pacientes cujos principais dados demográficos estão demonstrados na tabela 1. As variáveis demográficas apresentadas demonstram que a amostra estuda é representativa da prática atual dos transplantes na região sul do Brasil. Onde predominam receptores masculinos, caucasóides, com baixo grau de sensibilização HLA e que recebem órgãos de doadores falecidos.

Na tabela 2, estão apresentados os principais dados demográficos e relacionados ao transplante separando-se os pacientes entre os que tiveram rejeição aguda (RA) e os que não a apresentaram. Não foram observadas diferenças com significância estatística nas comparações

entre idade, sexo, raça, uso de terapia de indução com anticorpos, tempo em diálise, creatinina sanguínea final do doador, tempo de isquemia fria, utilização de doador com critério expandido, porcentagem de reatividade contra painel (PRA) pré-transplante e no número de incompatibilidades nos antígenos do sistema HLA. Observou-se maior incidência de RA no grupo de pacientes com disfunção inicial do enxerto (DGF) ( $P=0,011$ ).

#### ***Avaliações da expressão gênica e incidência de rejeição aguda***

A figura 1 representa os níveis da expressão dos genes TIM3, FOXP3, Perforina, Granulisina, CXCL-9 e CXCL-10, em sangue periférico coletado antes da cirurgia do transplante renal e antes do início das medicações imunossupressoras, comparando-se os níveis de expressão nos grupos de pacientes com e sem RA. A expressão dos genes TIM3, FOX3, Perforina e CXCL9, não apresentaram diferenças com significância estatística nos grupos (Figura 1, quadros A, B, C e D). Entretanto, a expressão gênica de CXCL-10 e de Granulisina foram significativamente menores no grupo de pacientes que apresentou RA (Figura 1, quadros E e F) ( $P < 0,05$ ).

#### ***Avaliação da expressão gênica e função do enxerto renal***

A avaliação da função do enxerto renal pela equação *Modification Diet in Renal Disease* (MDRD) foi realizada um, seis e doze meses após o transplante renal. Como ponto de corte foi utilizado a média da taxa de filtração glomerular (TFG) do grupo ( $n=51$ ) em cada um dos períodos. Obtiveram-se os seguintes pontos de corte: 48,1 mL/min (1º. mês), 51,3 mL/min (6º. mês) e 55,10 mL/min (1 ano). Sendo que no primeiro e sexto mês 41,9% dos pacientes com rejeição aguda apresentaram níveis acima do ponto de corte. No primeiro ano apenas 33% dos



pacientes com rejeição aguda apresentaram resultados acima do ponto de corte. O resultado da análise junto à expressão gênica não demonstrou correlação estatística quando comparado com o resultado acima ou abaixo da média, conforme demonstrado na tabela 3.

#### ***Avaliações da expressão gênica correlacionada com infecção viral e bacteriana.***

Dentre os 51 pacientes analisados durante um ano após o transplante renal, 33 (64,7%) apresentaram algum episódio infeccioso bacteriano no período de seguimento. Conforme demonstrado na tabela 4 os níveis da expressão gênica pré-transplante não apresentaram diferenças significativas nos grupos com e sem infecção bacteriana.

No mesmo período de estudo 9 (26,5%) dos pacientes apresentaram infecções virais no período pós-transplante. A exemplo do ocorrido com as infecções bacterianas não se observaram diferenças significativas, na análise da expressão gênica nos grupos com e sem infecção viral (tabela 4).

## **DISCUSSÃO**

Apesar da significativa diminuição da sua frequência com o uso dos imunossuppressores atualmente utilizados, a rejeição aguda ainda é um evento de impacto significativo na sobrevida de enxertos renais em curto e longo prazo (16-18). Idealmente as rejeições devem ser diagnosticadas e tratadas precocemente, sob pena de comprometimento da função e mesmo da perda do enxerto. Além do risco imediato a sua ocorrência é preditora da ocorrência de perda crônica de função, evento significativamente relacionado à diminuição da sobrevida dos rins transplantados (19). A disponibilidade de testes capazes de que predizer com acurácia a

probabilidade da ocorrência de rejeição aguda seria útil na medida em que poderia orientar o uso de terapias imunossupressoras mais eficazes evitando ou diminuindo a incidência das rejeições agudas e suas conseqüências na função e sobrevida dos órgãos transplantados.

As quimiocinas apresentam papel central na fisiologia leucocitária pelo controle do tráfego basal e inflamatório. A medida de níveis plasmáticos pré-transplante renal de diversas citocinas, entre elas, CXCL-9 e CXCL-10 podem ser capazes de predizer a evolução da RA e IF/TA após o transplante renal (20, 21). Segerer e colaboradores encontraram em 26 biópsias com rejeição aguda, aumento da expressão de CXCR3 que é o receptor celular para CXCL10. Anteriormente, o mesmo autor, já havia demonstrado que CXCL10 estavam aumentados em biópsias renais durante a RA (22). Outro estudo demonstrou, em biópsias de 16 pacientes transplantados, maior expressão de CXCL9 e CXCL10 em pacientes com nefropatia crônica do enxerto (NCE) e glomerulopatia do transplante em comparação aos que apresentavam somente NCE (23). No presente estudo avaliamos, no sangue periférico de 51 pacientes em período pré-operatório, a expressão do mRNA do gene CXCL-10. Encontramos que estes níveis estiveram significativamente diminuídos nos pacientes que vieram a apresentar RA. Nossos resultados estão em desacordo com os obtidos por Rotondi e colaboradores que relataram que níveis elevados da proteína CXCL-10, no período pré-operatório, foram preditivos da ocorrência de rejeição aguda e relacionaram-se com a sobrevida dos enxertos, porém nenhum dos pacientes incluídos no estudo de Rotondi recebeu terapia de indução com anticorpos (24). Resultados semelhantes foram descritos por Crescioli e colaboradores em receptores de transplante cardíaco (25). Entretanto, Heid e colaboradores que avaliaram a expressão de CXCL-9 e CXCL-10 por técnica imunoenzimática, encontraram que os níveis pré-transplante não foram

preditores da ocorrência de RA em pacientes sob terapia de indução com basilixmab ou alemtuzumab (26).

Brouard e colaboradores sugerem que a combinação da mensuração pré-transplante renal de níveis séricos de CXCL9 e CXCL10 possa ter elevado potencial para uso clínico (27). No entanto, os resultados contraditórios, incluindo os do presente estudo, demonstram a necessidade de um estudo prospectivo robusto, multicêntrico, com padronização de técnicas, para que se avalie a expressão dessas moléculas como biomarcadores prognósticos em transplante renal.

A granulicina parece ter ampla relevância clínica como um biomarcador diagnóstico, tendo a sua expressão sido descrita como preditora de episódios de RA precocemente após o transplante renal. A mensuração da expressão do mRNA deste gene foi avaliada sequencialmente em pacientes transplantados renais por Kotsch e colaboradores que observaram em células do sedimento urinário aumento na expressão gênica, precedendo o diagnóstico clínico da RA (28, 29). Resultados semelhantes foram descritos por Sarwall e colaboradores (30). No presente estudo avaliamos a transcrição desse gene em células do sangue periférico, colhidas antes do transplante renal, portanto antes da ativação antigênica e encontramos expressão diminuída no grupo de pacientes que apresentou rejeição aguda. Pena e colaboradores descrevem que este gene se expressa somente após ativação das células T sendo liberado após engajamento do TCR, portanto é dito como marcador de células T ativadas. Sendo assim, a sua mensuração, parece ter valor preditivo, desde que mensurados nos primeiros dias após o transplante (31, 32).

Diversos estudos anteriores demonstraram, em pacientes com RA de enxertos renais, quantidades aumentadas de transcritos de genes que codificam moléculas com atividade citotóxica em tecido renal, células urinárias e do sangue periférico (33, 34). Entre as moléculas

mais estudadas estão a granzima, perforina e o Fas-ligante, considerados biomarcadores acurados da rejeição aguda de transplantes renais (35, 36).

A perforina e a granzima são moléculas efetoras do ataque citolítico propiciado por linfócitos T CD8+ e que levam à morte celular por necrose ou apoptose, na dependência de ativação de outras vias (37-39). Lipman e colaboradores, utilizando a técnica do PCR competitivo, detectaram o aumento da expressão dos genes de perforina e granzima B, nas amostras de pacientes com RA. Strehlau e colaboradores detectaram aumento significativo da expressão dos genes que codificam para a síntese de IL-7, IL-10, IL-15, fas ligante, perforina e granzima B nas biópsias de transplantados renais com RA. Neste estudo a análise simultânea de perforina, granzima B e fas ligante, foi capaz de identificar rejeição aguda, mesmo em órgãos com infiltrados leves, com elevada sensibilidade e especificidade. No entanto até o momento estas moléculas não haviam sido avaliadas como biomarcadores prognósticos. Em nosso estudo não foi encontrada diferença significativa na expressão da perforina avaliada no período pré-transplante, nos grupos de pacientes que apresentaram episódios de rejeição aguda.

O mRNA de diversos genes tem sido avaliado com o objetivo de diagnóstico da RA. Em vista sua especificidade o gene, FOXP3 tem sido proposto como marcador molecular acurado de eventos imunológicos (40-42). Estudos anteriores já haviam associado o processo da RA com células T citotóxicas e mostraram que o monitoramento dos níveis dessas células no sangue, urina, ou em ambos poderia ser útil no tratamento de receptores de enxerto renal. O mRNA de FOXP3 tem sido identificado também em células urinárias, podendo propiciar um marcador não-invasivo acurado na predição de rejeição aguda em transplantes renais. Muthukumar e colaboradores observaram elevada sensibilidade e especificidade para dos níveis urinários do mRNA de FOXP3 para o diagnóstico de rejeição aguda. Em estudos anteriores de nosso

laboratório, detectamos aumentos expressivos desta molécula em episódios de rejeição aguda de transplantes renais com disfunção inicial do enxerto em tecido renal, células sanguíneas e células do sedimento urinário (43). De forma semelhante a outros genes o FOXP3 não foi estudado como biomarcador prognóstico no período pré-transplante. No presente estudo não foi encontrada diferença significativa na sua expressão, avaliada no período pré-transplante, nos grupos de pacientes que apresentaram ou não, episódios de rejeição aguda.

A proteína Tim-3 (*T-cell immunoglobulin domain mucin 3*) está expressa na superfície de linfócitos com o fenótipo Th1 e no transplante de órgãos parece estar envolvida em vias de indução de tolerância imunológica (44, 45). Renesto e colaboradores demonstraram que a molécula Tim-3 está hiperexpressa em células da urina de pacientes transplantados renais com rejeição aguda (46). Estes achados foram confirmados pelo nosso grupo que adicionalmente relatou expressão significativamente aumentada em células mononucleares do sangue periférico. Novamente esta molécula não foi avaliada no período pré-transplante como marcador biológico prognóstico de RA. No presente estudo não foi encontrada diferença significativa na sua expressão, avaliada no período pré-transplante, nos grupos de pacientes que apresentaram ou não, episódios de rejeição aguda.

Neste estudo buscamos a validação de biomarcadores prognósticos da ocorrência de RA, avaliados antes do transplante renal. A avaliação de marcadores preditores de rejeição pode ser de importância prática, com a possibilidade de indicar o uso de imunossupressão mais eficiente e melhor controle clínico pelo diagnóstico e tratamento precoces da rejeição ao transplante renal. Nossos resultados não confirmaram a hipótese do estudo. Isto pode ter ocorrido por diferentes razões. A primeira seria a escolha dos genes utilizados para a análise. Metodologia de maior amplitude em termos de geração como os microarranjos de RNA podem vir a evidenciar genes

ou conjuntos de genes com maior relevância biológica neste contexto. Alternativamente polimorfismos genéticos e não a expressão do gene pode ser o caminho a ser testado para a consolidação de biomarcadores prognósticos em transplante de órgãos sólidos.

Considera-se que um extenso caminho ainda deva ser percorrido, para que a predição da rejeição aguda possa ser utilizada na rotina clínica. Deve-se por fim considerar a possibilidade de que este objetivo dificilmente possa ser alcançado em virtude principalmente da questão da resposta imune específica aos antígenos do doador no período pré-transplante.

## **PACIENTES E MÉTODOS**

Foi realizado um estudo de avaliação prognóstica com amostras de sangue periférico de pacientes que realizaram transplante renal no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) entre os anos de 2008 e 2009. As amostras foram coletadas em momento anterior ao transplante renal. Incluíram-se 59 pacientes adultos submetidos a transplante renal no período, que consentiram em fornecer amostras de sangue para a realização deste estudo. O protocolo do estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da instituição. Foram excluídos do estudo os pacientes que faleceram ou que perderam o enxerto em período inferior a três meses após o transplante renal ou cujas amostras pré-transplante não puderam ser analisadas. Desta forma 51 pacientes foram acompanhados no estudo.

As amostras foram processadas com a extração do RNA pelo método QIAamp<sup>®</sup> RNA *Blood* mini kit (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A mensuração da concentração do RNA bem como a sua pureza foi realizada através do espectrofotômetro de amplo espectro Nanodrop 1000 v.3.7 (*Thermo Fisher Scientific*, Wilmington, DE) em que foram realizadas leituras de absorbâncias nos comprimentos de onda

260/280 e somente as amostras com uma razão de densidade ótica entre comprimentos superiores a 1,7 foram utilizadas. A seguir realizou-se a transcrição reversa em DNA complementar através do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA), de acordo com as instruções do fabricante.

Os ensaios de expressão gênica consistiram em uma mistura de *primers* e sondas *TaqMan*® MGB (*minor groove binding*) a 360 µM, concentrada 20 vezes (20x). Estes ensaios foram adquiridos a partir de identificação das sequências alvo no banco de genes, sendo estas já desenhadas, testadas e validadas em estudos prévios pelo fabricante (*TaqMan Gene Expression Assays – Applied Biosystems, CA*). Os corantes fluorescentes utilizados como marcadores das sondas foram 6- *carboxy fluorescein* (FAM<sup>TM</sup>) como *reporter* (em 5') e non-fluorescent como *quencher* (em 3'). O controle molecular endógeno utilizado foi o 18S RNA (*Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control – Applied Biosystems, CA*).

As reações foram feitas em duplicatas utilizando-se para isso o *kit TaqMan*® *Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com o seguinte protocolo: 5,0 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix e 2,5 µL de água livre de DNase. A esta mistura adicionou-se para cada reação 0,5 µL de *primers* e sondas (20x) e 2 µL de cDNA, totalizando um volume final de reação de 10 µL. O programa de ciclagem constitui-se em: Estágio 1 (1 ciclo): 50°C por 2 minutos; estágio 2 (1 ciclo): 60°C por 30 minutos; estágio 3 (1 ciclo): 95°C por 5 minutos; estágio 4 (40 ciclos): 95°C por 20 segundos e 60°C por 1 minuto. As análises dos produtos amplificados foram feitas através de quantificação relativa pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Os dados coletados conforme instrumento de coleta de dados em anexo. A expressão de cada gene foi analisada pelo método da quantificação relativa pela reação em cadeia da polimerase em tempo real, utilizando-se o sistema de detecção ABI Prism 7000 (Applied

Biosystems, Foster City, CA, USA). As quantificações relativas descrevem as mudanças na expressão do gene alvo relativo a um grupo de referência que foi constituído por indivíduos com função renal normal.

O método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  requer equações e é utilizado para calcular as mudanças relativas na expressão dos genes determinadas nos experimentos de PCR em tempo real. O CT (*ciclo do threshold*) indica a fração numérica em que a quantidade do alvo alcança um limiar fixo. A partir do valor do CT, calculou-se o  $\Delta CT$ , que se caracteriza como sendo a diferença entre os CTs do alvo e do controle endógeno, subtrai-se então o  $\Delta CT$  resultante do  $\Delta CT$  do calibrador escolhido. O resultado é apresentado em dados exponenciais, que são convertidos em lineares pela equação  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . A derivação da equação em questão, desenho experimental e testes de validação estão disponíveis na literatura (47).

O protocolo de imunossupressão utilizado constou do uso de terapia de indução com Timoglobulina® em pacientes considerados de elevado risco imunológico e indução com Basiliximab®, administrado nas primeiras 24 horas após o transplante nos pacientes que evoluíram com disfunção inicial do enxerto. Todos os pacientes receberam corticosteróides, inibidores de calcineurina e um derivado do ácido micofenólico como imunossupressão de manutenção. O diagnóstico de rejeição aguda foi baseado no quadro clínico de disfunção do enxerto, análise histológica e resposta ao tratamento específico com corticosteróides ou anticorpos anti-linfocitários. A interpretação das biópsias renais foi realizada por um patologista que desconhecia o quadro clínico, de acordo com a classificação Banff-2007 (48, 49). A função dos enxertos renais foi avaliada pela taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) através da equação MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*) (50), em 1, 6 e 12 meses após o transplante renal, utilizando como ponto de corte a média do grupo em cada período. A



incidência de infecções virais e bacterianas foi avaliada de acordo com dados de exames laboratoriais disponíveis no prontuário eletrônico e nas planilhas de apontamento pós-transplante.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) para *Windows*, versão 18.0. As variáveis quantitativas com distribuição simétrica foram descritas pela média e o desvio padrão e comparadas pelo teste “t” de Student para amostras independentes, e as variáveis com distribuição assimétrica foram descritas pela mediana e o intervalo interquartil e comparadas pelo teste de Mann-Whitney. As variáveis categóricas foram descritas por frequências e percentuais e analisadas pelo teste de qui-quadrado com correção de Yates ou teste exato de Fisher. Foi adotado o nível de significância de  $p < 0,05$ .

## **RECONHECIMENTOS**

Este trabalho obteve suporte financeiro do Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) e do Fundo de Pesquisa do Serviço de Nefrologia do HCPA.

<sup>1</sup> RS recebeu bolsa parcial de estudos do Programa de Fomento à Pós-Graduação (PROF) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

<sup>2</sup> RCM foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico durante o período de realização deste projeto.

## Referências Bibliográficas

1. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004; 4 (3): 378.
2. Cecka JM. The OPTN/UNOS Renal Transplant Registry. *Clin Transpl* 2005: 1.
3. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant* 2004; 4 (8): 1289.
4. Cosio FG, Pelletier RP, Falkenhain ME, et al. Impact of acute rejection and early allograft function on renal allograft survival. *Transplantation* 1997; 63 (11): 1611.
5. Sorof JM, Vartanian RK, Olson JL, Tomlanovich SJ, Vincenti FG, Amend WJ. Histopathological concordance of paired renal allograft biopsy cores. Effect on the diagnosis and management of acute rejection. *Transplantation* 1995; 60 (11): 1215.
6. Colvin RB, Cohen AH, Saiontz C, et al. Evaluation of pathologic criteria for acute renal allograft rejection: reproducibility, sensitivity, and clinical correlation. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8 (12): 1930.
7. Aquino-Dias EC, Camara NO, Filho APS, Manfro RC. Monitorização Molecular da Rejeição de Transplantes Renais. *J Bras Nefrol* 2005; XXVII (2): 76.
8. Hartono C, Dadhania D, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of acute rejection of solid organ transplants. *Front Biosci* 2004; 9: 145.
9. Nickerson P. Post-transplant monitoring of renal allografts: are we there yet? *Curr Opin Immunol* 2009; 21 (5): 563.
10. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 2005; 353 (22): 2342.
11. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)* 2005; 109 (4): 365.
12. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27 (2-3): 95.
13. Eikmans M, Baelde HJ, de Heer E, Bruijn JA. Messenger RNA assessment in clinical nephrology: perspectives and progress of methodology. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20 (12): 2598.
14. Desvaux D, Schwarzingler M, Pastural M, et al. Molecular diagnosis of renal-allograft rejection: correlation with histopathologic evaluation and antirejection-therapy resistance. *Transplantation* 2004; 78 (5): 647.
15. Sabek O, Dorak MT, Kotb M, Gaber AO, Gaber L. Quantitative detection of T-cell activation markers by real-time PCR in renal transplant rejection and correlation with histopathologic evaluation. *Transplantation* 2002; 74 (5): 701.
16. Thierry A, Thervet E, Vuiblet V, et al. Long-term impact of subclinical inflammation diagnosed by protocol biopsy one year after renal transplantation. *Am J Transplant* 2011; 11 (10): 2153.
17. Manfro RC, Aquino-Dias EC, Joelsons G, Nogare AL, Carpio VN, Goncalves LF. Noninvasive Tim-3 messenger RNA evaluation in renal transplant recipients with graft dysfunction. *Transplantation* 2008; 86 (12): 1869.
18. Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche HU. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am J Transplant* 2011; 11 (3): 450.

19. Basadonna GP, Matas AJ, Gillingham KJ, et al. Early versus late acute renal allograft rejection: impact on chronic rejection. *Transplantation* 1993; 55 (5): 993.
20. Pereira AB, Rezende NA, Junior ALT, Teixeira MM, A.C.S S. cytokines and chemokines in renal transplantation. *J Bras Nefrol* 2009; 31 (4): 286.
21. Hauser IA, Spiegler S, Kiss E, et al. Prediction of acute renal allograft rejection by urinary monokine induced by IFN-gamma (MIG). *J Am Soc Nephrol* 2005; 16 (6): 1849.
22. Segerer S, Mac KM, Regele H, Kerjaschki D, Schlondorff D. Expression of the C-C chemokine receptor 5 in human kidney diseases. *Kidney Int* 1999; 56 (1): 52.
23. Akalin E, Dikman S, Murphy B, Bromberg JS, Hancock WW. Glomerular infiltration by CXCR3+ ICOS+ activated T cells in chronic allograft nephropathy with transplant glomerulopathy. *Am J Transplant* 2003; 3 (9): 1116.
24. Rotondi M, Rosati A, Buonamano A, et al. High pretransplant serum levels of CXCL10/IP-10 are related to increased risk of renal allograft failure. *Am J Transplant* 2004; 4 (9): 1466.
25. Crescioli C, Buonamano A, Scolletta S, et al. Predictive role of pretransplant serum CXCL10 for cardiac acute rejection. *Transplantation* 2009; 87 (2): 249.
26. Heidt S, Shankar S, Muthusamy AS, San Segundo D, Wood KJ. Pretransplant serum CXCL9 and CXCL10 levels fail to predict acute rejection in kidney transplant recipients receiving induction therapy. *Transplantation* 2011; 91 (8): e59.
27. Brouard S, Souillou JP. Pre-transplant serum level of CXCL9 as a biomarker of acute rejection and graft failure risk in kidney transplantation. *Transpl Int* 2009; 23 (5): 461.
28. Kotsch K, Mashreghi MF, Bold G, et al. Enhanced granulysin mRNA expression in urinary sediment in early and delayed acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2004; 77 (12): 1866.
29. Krensky AM, Clayberger C. Granulysin: a novel host defense molecule. *Am J Transplant* 2005; 5 (8): 1789.
30. Sarwal MM, Jani A, Chang S, et al. Granulysin expression is a marker for acute rejection and steroid resistance in human renal transplantation. *Hum Immunol* 2001; 62 (1): 21.
31. Pena SV, Krensky AM. Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Semin Immunol* 1997; 9 (2): 117.
32. Pena SV, Hanson DA, Carr BA, Goralski TJ, Krensky AM. Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *J Immunol* 1997; 158 (6): 2680.
33. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, et al. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94 (2): 695.
34. Lipman ML, Stevens AC, Strom TB. Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts. *J Immunol* 1994; 152 (10): 5120.
35. Sharma VK, Bologa RM, Li B, et al. Molecular executors of cell death differential intrarenal expression of Fas ligand, Fas, granzyme B, and perforin during acute and/or chronic rejection of human renal allografts. *Transplantation* 1996; 62 (12): 1860.
36. Aquino Dias EC, Veronese FJ, Santos Goncalves LF, Manfro RC. Molecular markers in subclinical acute rejection of renal transplants. *Clin Transplant* 2004; 18 (3): 281.

37. Walsh PT, Strom TB, Turka LA. Routes to transplant tolerance versus rejection; the role of cytokines. *Immunity* 2004; 20 (2): 121.
38. Carpio VN, Aquino-Dias EC, Prochnow TA, Manfro RC, Goncalves LF. Evaluation of apoptosis in peripheral blood lymphocytes of renal transplant patients. *Transplant Proc* 2006; 38 (6): 1898.
39. Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331 (6): 365.
40. Sakaguchi S, Setoguchi R, Yagi H, Nomura T. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 305: 51.
41. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006; 212: 8.
42. Sanchez-Fueyo A, Sandner S, Habicht A, et al. Specificity of CD4+CD25+ regulatory T cell function in alloimmunity. *J Immunol* 2006; 176 (1): 329.
43. Aquino-Dias EC, Joelsons G, da Silva DM, et al. Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney Int* 2008; 73 (7): 877.
44. Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 2002; 415 (6871): 536.
45. Sabatos CA, Chakravarti S, Cha E, et al. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat Immunol* 2003; 4 (11): 1102.
46. Renesto PG, Ponciano VC, Cenedeze MA, Saraiva Camara NO, Pacheco-Silva A. High expression of Tim-3 mRNA in urinary cells from kidney transplant recipients with acute rejection. *Am J Transplant* 2007; 7 (6): 1661.
47. Akalin E, Hendrix RC, Polavarapu RG, et al. Gene expression analysis in human renal allograft biopsy samples using high-density oligoarray technology. *Transplantation* 2001; 72 (5): 948.
48. Cendales LC, Kanitakis J, Schneeberger S, et al. The Banff 2007 working classification of skin-containing composite tissue allograft pathology. *Am J Transplant* 2008; 8 (7): 1396.
49. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; 7 (3): 518.
50. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130 (6): 461.

**Tabela 1:** Características demográficas dos pacientes e dados relacionados ao transplante.

Idade (anos) (média ± DP) <sup>a</sup>	43,2±13,1
Sexo (Masculino/ Feminino) % <sup>b</sup>	30/21
Raça (Branca/Não Branca) % <sup>b</sup>	48/ 03
PRA I (média ± DP) <sup>a</sup>	6,69±17,8
PRA II (média ± DP) <sup>a</sup>	5,54±17,5
Doador (Vivo/Falecido) <sup>b</sup>	21/30
Indução [Sim/Não] % <sup>b</sup>	41 / 10
Doador com critério expandido <sup>b</sup>	12/34
DGF (Sim / Não) % <sup>b</sup>	22 / 29
Tempo em diálise (meses) <sup>c</sup>	18 (10-63)
Creatinina final do doador (mg/dL) <sup>c</sup>	1,27 (0,80-1,83)
Tempo de isquemia fria (horas) <sup>c</sup>	19,1±5,6
Incompatibilidades HLA ABDR (N)	
0/6	3,(5,9)
1/6	0 (0)
2/6	7 (13,7)
3/6	12 (23,5)
4/6	11 (21,6)
5/6	13 (25,5)
6/6	5 (9,8)

<sup>a</sup> Variáveis quantitativas com distribuição simétrica descrita pela média±DP. <sup>b</sup> Variáveis categóricas descritas pelo n (%). <sup>c</sup> Variável com distribuição assimétrica pela mediana (intervalo interquartil: P25-P75)

**Tabela 2:** Características demográficas dos pacientes e dados relacionados ao transplante em pacientes com e sem rejeição aguda.

<b>Variável</b>	<b>RA</b> (n=21)	<b>Sem RA</b> (n=30)	<b>P</b>
Idade ( anos) (média ± DP) <sup>a</sup>	45,6±13,8	41,3±12,6	0,267
Sexo (Masculino/ Feminino)% <sup>b</sup>	13/8 (61,9/56,7%)	17/13 (56,7)	0,932
Raça (Branca / Não Branca)% <sup>b</sup>	21 (100,0)	27/3	0,259
Doador (Vivo/Falecido)	7/14 (33,3%/66,7%)	14/16	0,507
Indução (Sim / Não) % <sup>b</sup>	19/2 (90,5%/9,5%)	22/8	0,167
Doador com critério expandido (S/N)	6/13 (31,6%/68,4%)	6/21	0,513
DGF (Sim / Não) % <sup>b</sup>	14/7 (66,7/33,3%)	8/22	<b>0,011</b>
Tempo em diálise (meses) <sup>b</sup>	25,0 (9,0-53,0)	15,0	0,877
Creatinina final doador (mg/dL) <sup>c</sup>	1,30 (1,20-2,00)	1,24	0,375
Tempo de isquemia fria (horas) <sup>c</sup>	20,2±5,5	18,1±5,7	0,324
Incompatibilidade HLA - A/B/DR (N)			
0-3	8 (38,1)	14 (46,7)	
4-6	13 (61,9)	16 (53,3)	0,748

<sup>a</sup>Variáveis quantitativas com distribuição simétrica descrita pela média±DP e comparada pelo teste t de *Student* para amostras independentes, <sup>b</sup> Variáveis categóricas descritas pelo n (%) e comparadas pelo teste de Qui-quadrado com correção de *Yates* ou teste Exato de Fisher,, <sup>c</sup> Variáveis quantitativas com distribuição assimétrica descritas pela mediana (intervalo interquartil: P25-P75) e comparadas pelo teste *Mann - Whitney*,

**Tabela 3.** Expressão dos genes e a correlação com a TFG.

Período		1º mês (PC=48,1)	p	6º mês (PC = 51,3)	p	12º mês (PC=55,1)	p
Expressão gênica							
Tim3	> PC	17,01 mL/min		14,65 mL/min		19,06 mL/min	
	≤ PC	12,34 mL/min	0,324	15,75 mL/min	0,930	10,14 mL/min	0,408
Foxp3	> PC	6,77 mL/min		5,87 mL/min		6,77 mL/min	
	≤ PC	5,8 mL/min	0,498	6,31 mL/min	0,790	5,47 mL/min	0,454
Perf	> PC	23,95 mL/min		24,86 mL/min		26,64 mL/min	
	≤ PC	12,34 mL/min	0,44	12,34 mL/min	0,406	16,80 mL/min	0,558
CXCL-9	> PC	7,68 mL/min		6,22 mL/min		6,22 mL/min	
	≤ PC	3,88 mL/min	0,44	3,06 mL/min	0,545	3,88 mL/min	0,597
CXCL-10	> PC	12,2 mL/min		226,82 mL/min		18,60 mL/min	
	≤ PC	3,99 mL/min	0,44	395,31 mL/min	0,465	3,99 mL/min	0,387
GNLY	> PC	857,51 mL/min		18,60 mL/min		247,59 mL/min	
	≤ PC	274,72 mL/min	0,25	6,44 mL/min	0,833	387,26 mL/min	0,984

\*Expressão quantitativa dos genes do estudo com a divisão da TFG acima e abaixo do ponto de corte (PC) em cada período, Perf/ Perforina, GNLY/ Granulisina

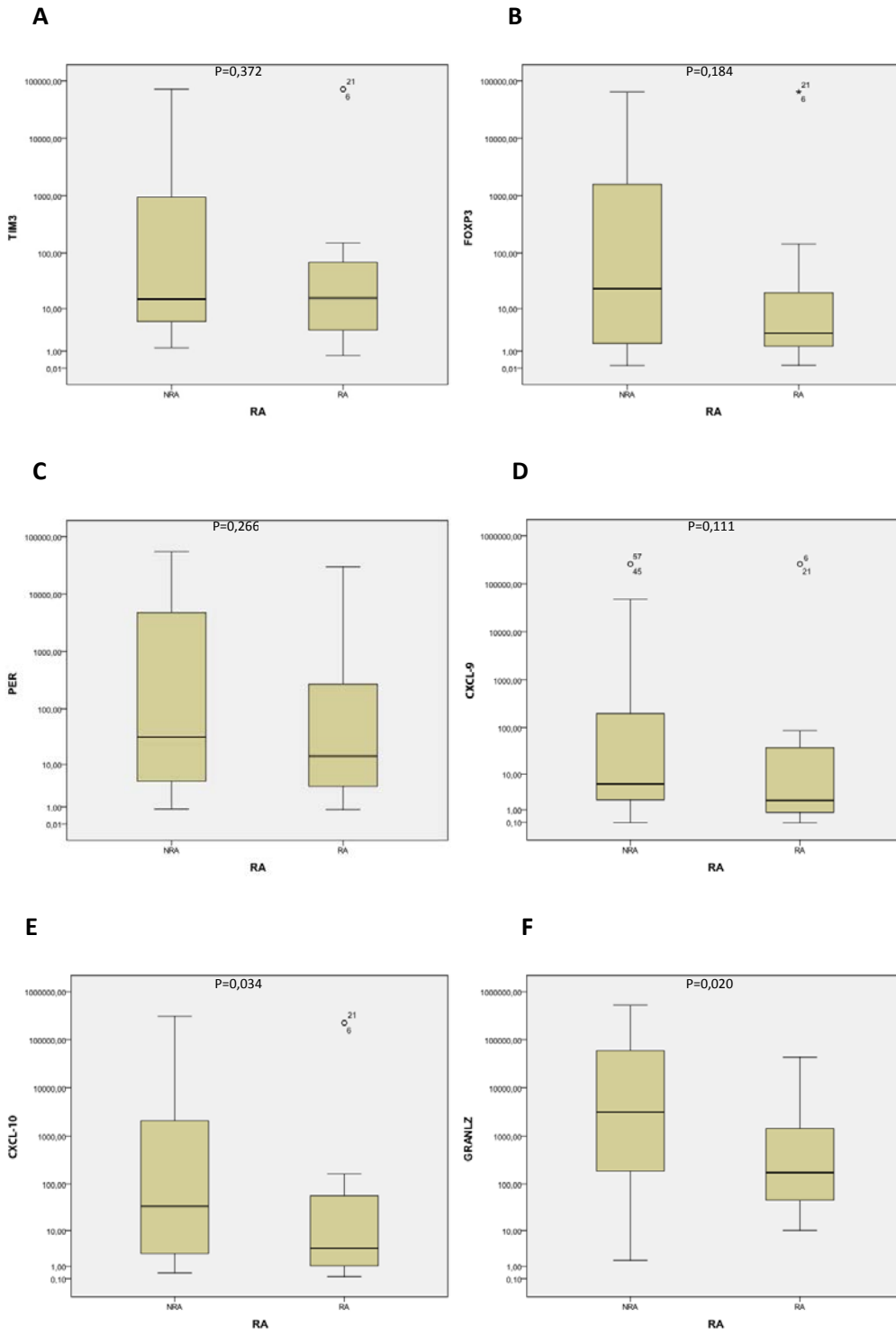
**Tabela 4.** Pacientes com infecção bacteriana e viral e a expressão gênica no primeiro ano após o transplante renal.

Variáveis	Sem Infecção bacteriana	Com infecção bacteriana	P	Sem Infecção viral	Com infecção viral	P
TIM3 <sup>a</sup>	22,6 (6,3-393,0)	14,8 (4,4-108,1)	0,387	46,3 (6,7-829,0)	22,1 (8,7-5674,9)	0,848
FOXP3 <sup>a</sup>	21,4 (1,6-492,2)	5,5 (1,3-134,4)	0,682	32,7 (1,7-1489,3)	13,7 (3,4-3655,6)	0,685
PER <sup>a</sup>	146,7 (8,0-3711,7)	16,6 (3,6-582,4)	0,554	52,5 (5,0-3245,3)	35,3 (10,0-18206,6)	0,564
CXCL-9 <sup>a</sup>	13,9 (0,9-181,3)	2,7 (1,2-60,9)	0,441	7,9 (1,0-192,1)	55,3 (3,8-35725,1)	0,256
CXCL-10 <sup>a</sup>	74,7 (1,8-1636,7)	7,3 (1,6-639,1)	0,407	25,2 (2,2-1246,0)	46,9 (4,6-2418,7)	0,606
GNLY <sup>a</sup>	7896,5 (122,7-53402,2)	206,1 (74,9-11361,4)	0,241	487,5 (65,3-40419,0)	1018,2 (313,4-115556,3)	0,254

<sup>a</sup>Variáveis descritas pela mediana (intervalo interquartil e comparadas pelo teste de Mann-Whitney. Per/ Perforina/ GNLY/ Granulisina



Figura 1,



**Legenda da figura, 1**

**Figura 1,** Níveis de mRNA em leucócitos de sangue periférico de amostras coletadas pré-transplante renal: TIM3(A), FOXP3 (B), Perforina (C), CXCL-9 (D), CXCL-10 (E) e Granulisina (F), Os gráficos *boxplot* demonstram os valores medianos e *percentis* 10, 25, 75, e 90 para os níveis quantificados normalizados de RNAm ( $2^{-\Delta\Delta ct}$ ), Os valores de P representam a relação entre o gene e o processo de rejeição aguda, Os genes TIM3(A), FOXP3(B), Perforina(C) e CXCL-9(D), não apresentaram significância estatística, O CXCL-10(E) e a Granulisina(F) apresentaram diminuição da expressão nos pacientes com rejeição aguda.



Nossos resultados não confirmaram a hipótese do estudo. Isto pode ter ocorrido por diferentes razões. A primeira seria a escolha dos genes utilizados para a análise, Metodologia de maior amplitude em termos de geração como os microarranjos de RNA podem vir a evidenciar genes ou conjuntos de genes com maior relevância biológica neste contexto. Alternativamente polimorfismos genéticos e não a expressão do gene pode ser o caminho a ser testado para a solidação de biomarcadores prognósticos em transplante de órgãos sólidos.

Considera-se que um extenso caminho ainda deva ser percorrido, para que a predição da rejeição aguda possa ser utilizada na rotina clinica, Deve-se por fim considerar a possibilidade de que este objetivo dificilmente possa ser alcançado em virtude principalmente da questão da resposta imune específica aos antígenos do doador no período pré-transplante.

**CAPÍTULO 7. ANEXOS**

**Anexo 1. Protocolo de coleta de dados**

<b>Nome:</b>	
<b>Prontuário:</b>	<b>Tx N°      Pesquisa n°:</b>
<b>Data de nascimento: Sexo:</b>	
<b>Data transplante:</b>	<b>Idade:</b>
<b>Doença básica:</b>	
<b>Tempo em diálise:</b> (meses)	
<b>Prova cruzada pré Tx:</b>	<b>Último PRA: CI: CII:</b>
<b>Protocolo imunossupressor inicial:</b>	
<b>Indução:</b>	
<b>Tempo de isquemia fria:</b> horas + minutos	
<b>HLA Doador:</b> A      B      DR	
<b>Doador:</b> Tipo:	<b>Idade:</b>
<b>Doador falecido. Causa do óbito:</b>	
<b>Creatinina do doador: Inicial: ; Final:</b>	
<b>Doador de critérios expandidos:</b>	
<b>HLA Receptor:</b> A      B      DR	
<b>Rejeição aguda pós-TR:</b>	
<b>Tipo da rejeição:.</b>	<b>Data:</b> __/__/____ <b>Tratamento:</b>

<b>Tipo da rejeição:.</b>	<b>Data:</b> __/__/____	<b>Tratamento:</b>	
<b>Tipo da rejeição:.</b>	<b>Data:</b> __/__/____	<b>Tratamento:</b>	
<b>Infecções Virais - Pós Tx ?:</b> .			
<b>Infecção bacteriana ?</b> .			
<b>DGF:</b> ; <b>Se SIM duração:</b> (dias)			
<b>POD 7:</b>	<b>Creatinina</b>	<b>MDRD</b>	
<b>POD 30:</b>	<b>Creatinina</b>	<b>MDRD</b>	<b>P24/IPC:</b>
<b>POD 180:</b>	<b>Creatinina</b>	<b>MDRD</b>	<b>P24/IPC:</b>
<b>POD 360:</b>	<b>Creatinina</b>	<b>MDRD</b>	<b>P24/IPC:</b>
<b>Perda do enxerto:</b>	<b>Data:</b>		
<b>Óbito:</b>	<b>Data:</b>		

**Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

A unidade de Transplante Renal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo presente termo de consentimento convida o (a) Sr (a) \_\_\_\_\_ a participar de um estudo que tem como objetivo desenvolver melhores métodos para o diagnóstico da rejeição de transplantes renais e de forma mais rápida e segura. Os procedimentos a que os (as) Sr (as) serão submetidos são coleta de biópsias renais que forem necessárias por indicação do médico. Junto com a biópsia serão coletados sangue e urina. Informamos que os riscos envolvidos na pesquisa são os mesmos envolvidos no transplante renal e o risco mínimo representado pelas biópsias renais. Pode ocorrer em até 2% dos casos, sangue na urina depois da coleta, que não necessita tratamento específico. Risco de hemorragia grave é raro ocorrendo em menos de 1% dos pacientes submetidos à biópsias. As coletas de sangue (por punção da veia do braço) e urina não oferecem risco, podendo ocorrer apenas um pequeno hematoma na área da punção da veia. Nenhum benefício financeiro será obtido na participação presente estudo tanto para a unidade de transplante renal, quanto para os (as) Sr (as), mas sua ajuda será importante na pesquisa de tratamentos melhores para a rejeição de futuros pacientes. Para seu esclarecimento a qualquer momento ou em caso de necessidade o Sr (a) poderá entrar em contato com os membros da equipe da unidade de transplante renal pelos telefones 2101-8295, 2101-8121, 2101-8878 ou ainda pelos telefones celulares do Dr. Roberto Ceratti Manfro (9975-2461). Ainda em caso de urgências com o plantão da Nefrologia Transplante do HCPA telefone 21018000.

Eu, \_\_\_\_\_ aceito a participar do estudo  
\_\_\_\_\_ e

declaro que fui também informado:



Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta sobre o presente estudo;

Da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo à continuação de meu cuidado e tratamento;

Do caráter confidencial das informações relacionadas com minha privacidade;

Da disponibilidade de tratamento médico caso existam complicações causadas por esta pesquisa;

De que não terei despesas por participar do estudo.

---

Assinatura do paciente

---

Assinatura do pesquisador  
Dr. Roberto Ceratti Manfro  
(51) 3359-8295