

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**Avaliação de miRNAs como biomarcadores não invasivos de rejeição  
aguda em transplante renal.**

Dissertação de Mestrado

Tuany Di Domenico  
Porto Alegre, 2014

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**Avaliação de miRNAs como biomarcadores não invasivos de rejeição  
aguda em transplante renal.**

*Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós Graduação em Medicina:  
Ciências Médicas da Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul para a obtenção do  
título de Mestre.*

Autor: Tuany Di Domenico

Orientador: Dr. Roberto Ceratti Manfro

Porto Alegre, 2014

### CIP - Catalogação na Publicação

Domenico, Tuany

Avaliação de miRNAs como biomarcadores não invasivos de rejeição aguda em transplante renal. / Tuany Domenico. -- 2014.  
68 f.

Orientador: Roberto 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, 2014.

1. Transplante de rim. 2. Biomarcador. 3. MicroRNA. I. Manfro, Roberto , orient. II. Título.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais pelo apoio e incentivo, por confiarem em minhas escolhas.

Ao meu orientador professor Doutor Roberto Ceratti Manfro por ter me recebido mesmo sem indicações. Pela confiança, oportunidade, liberdade e autonomia oferecidas, certamente de uma imensa contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada pela oportunidade.

Ao meu namorado Luciano Folador, cujos nossos caminhos se cruzaram graças ao meu mestrado. Pela paciência em escutar minhas reclamações quando alguma intercorrência ocorria. Obrigada pelo carinho, pela compreensão e pelo apartamento emprestado quando precisava de um lugar tranquilo para escrever.

Aos colegas de laboratório, em especial ao Gabriel Joelsons pela paciência, disponibilidade e colaboração. Agradecimento especial também à colega e confidente Mariane dos Santos, se mostrando sempre disposta, pelos períodos de animação e preocupação passados juntos, sempre se compadecendo a minha causa, mesmo quando as intercorrências no meio do caminho não a atingiam diretamente, em resumo, obrigada pela amizade.

Agradeço também a duas colegas de diferentes laboratórios, a Bárbara Alemar e a Nidiane Martinelli por me receberem prontamente em momentos de dúvida quanto às técnicas de microRNA, por me auxiliarem com protocolos e por dispensarem seus tempos comigo quando me deparava com situações inesperadas.

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

A toda equipe do transplante do serviço Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que se mobilizou e participou diretamente da realização desse trabalho ao longo desses dois anos.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa pelo apoio financeiro (FIPE).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida.

À todas as outras pessoas que, de alguma maneira, ajudaram na realização desse trabalho e que não foram citadas, mas que apesar disso foram muito importantes. Sem a ajuda de cada pessoa, anônima ou não, a concretização do meu projeto de mestrado não seria possível.

## Lista de Figuras

Figura 1: processo de isquemia e reperfusão .....	13
Figura 2: Interação entre um linfócito T e célula apresentadora de antígeno dendrítica.....	15
Figura 3: Esquematização da biogênese dos miRNAs .....	19
Figura 4: Sinal fluorescente.....	24
Figura 5: Gráfico de fluorescência por número de ciclos .....	25
Figura 6: RT-PCR utilizando o método TaqMan.....	26

## Lista de Abreviaturas

**ATP** - Adenosina trifosfato

**cAMP** - Adenosina monofosfato cíclico

**cDNA** - Molécula complementar de DNA

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

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

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

**miRNAs** - micro-RNAs

**mRNA** - RNA mensageiro

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

**RA** - Rejeição aguda

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

**TLR** - receptores de células "toll-like" (*toll-like receptors*)

## Resumo

**Introdução:** o transplante renal é o tratamento de escolha para uma significativa porção dos pacientes com perda crônica terminal da função renal. A rejeição aguda é uma importante complicação pós-transplante e entre outras disfunções agudas tem na biópsia do enxerto o padrão ouro para o seu diagnóstico. No entanto as biópsias apresentam uma série de limitações e riscos sendo necessário que se desenvolva biomarcadores não invasivos capazes de identificar disfunções do enxerto. **Objetivos:** analisar e quantificar a expressão dos microRNAs miR-142-3p, miR-155 e miR-210 em amostras de sangue periférico, urina e tecido renal coletadas de pacientes que submetidos à transplante renal que desenvolveram disfunção do enxerto. **Métodos:** estudo com delineamento transversal e executado no Laboratório de Biologia Molecular aplicado à Nefrologia (LABMAN), do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As amostras são de pacientes submetidos a transplante renal que necessitaram de biópsia, por critério clínico. A expressão dos miRNAs miR-142-3p, miR-155 e miR-210 nos materiais biológicos (tecido renal, sangue periférico e células do sedimento urinário) foi avaliada através da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real. **Resultados:** foi encontrada, no sangue periférico uma diminuição estatisticamente significativa na expressão do miR-142-3p no grupo de pacientes com rejeição aguda (n=23) quando comparado ao grupo com outras causas de disfunção do enxerto (n=68) (P = 0,01). Não houve diferença entre os grupos na expressão do miR-155 e do miR-210, tampouco para o miR142-3p nos demais compartimentos. **Conclusão:** miR-142-3p mostra uma expressão diferenciada de rejeição aguda de enxertos renais, há um envolvimento deste marcador no grupo de biomarcadores molecular potencial para a disfunção do enxerto renal.

**Palavras-chave:** transplante de rim, expressão gênica, rejeição aguda, micro-RNAs.



## Abstract

**Background:** kidney transplantation is the treatment of choice for a significant portion of patients with end-stage kidney disease. Acute rejection is a major post-transplant complication among other acute disorders and has on graft biopsy the gold standard for diagnosis. Biopsy, however it is an invasive and potentially harmful procedure so it is desirable to develop new noninvasive markers for diagnosing graft dysfunction. **Objective:** to analyze and quantify the expression of microRNAs miR-142-3p, miR-155 and miR-210 in the peripheral blood, urinary sediment and kidney tissue obtained from patients who developed graft dysfunction after kidney transplantation. **Methods:** cross-sectional study performed at the Laboratory of Molecular Biology applied to Nephrology (Labman), Center of Experimental Research from Hospital de Clinicas de Porto Alegre. The samples are from kidney transplant patients who undertook indication biopsies as a part of investigation of graft dysfunction. Micro-RNAs expression was evaluated by quantitative real-time polymerase chain reaction. **Results:** it was found that in peripheral blood, a significant decrease in the expression of miR-142-3p occurred in patients with acute rejection (n = 23) as compared to the group of patients with other causes of graft dysfunction (n = 68), (P = 0.01). No other significant differences were found in gene expression of miR-155 and miR-210, neither for miR142-3p in the other urine or kidney tissue. **Conclusion:** miR-142-3p presents differential expression in the peripheral blood of patients with rejecting kidney grafts. The role of miRNAs as biomarkers for kidney graft dysfunction is worth be further explored.

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

## Sumário

<b>1. Introdução.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1. Transplantes Renais.....</b>	<b>11</b>
2.1.1. <i>Histórico</i> .....	11
2.1.2. <i>Fatores pré-transplante</i> .....	11
2.1.3. <i>Imunologia do transplante</i> .....	13
2.1.4. <i>Rejeições e Biópsia Renal</i> .....	15
<b>2.2. microRNAs .....</b>	<b>17</b>
2.2.1. <i>Histórico</i> .....	17
2.2.2. <i>Fisiologia</i> .....	18
2.2.3. <i>miR-142-3p</i> .....	20
2.2.4. <i>miR-155</i> .....	21
2.2.5. <i>miR-210</i> .....	21
<b>2.3. A reação em cadeia da polimerase e os microRNAs.....</b>	<b>22</b>
2.3.1 <i>A amplificação de miRNAs por RT-PCR</i> .....	25
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Geral.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Específicos.....</b>	<b>27</b>
<b>4. Referências bibliográficas da revisão .....</b>	<b>28</b>
<b>5. Artigo: Avaliação de miRNAs como biomarcadores não invasivos de rejeição aguda em transplante renal. ....</b>	<b>34</b>
<b>6. Considerações finais .....</b>	<b>63</b>
<b>7. Anexos .....</b>	<b>65</b>

## **1. Introdução**

Transplante renal é o tratamento de escolha para muitos pacientes com disfunção renal crônica que leva a falência do órgão. O transplante oferece um significativo aumento na expectativa e na qualidade de vida destes pacientes (1-3). No Brasil sobrevida do aloenxerto renal é de 87,6% no primeiro ano, 74,6% no quinto ano e 44,3 % no décimo ano (4).

Desde o início da prática de transplantes entre indivíduos geneticamente distintos, órgãos e tecidos perdem suas funções pelas reações do sistema imunológico do hospedeiro à sua presença, essas reações são denominadas rejeições (5). A rejeição aguda (RA) é um dos principais fatores deletérios do enxerto renal, podendo levar à sua falência em qualquer momento do curso pós-transplante e ocorrendo em torno de 10 a 15%% dos pacientes no decorrer do primeiro ano. Ela envolve morbidade significativa pela perda de função do enxerto e pela exposição a maior intensidade da imunossupressão (3, 6).

Atualmente os tipos de rejeição estão bem elucidados e na prática clínica suas consequências são inicialmente evidenciadas pela disfunção orgânica, sendo posteriormente classificadas pelo tipo de alteração histológica na biópsia do enxerto (7, 8). Sua evolução é de difícil predição e os achados histológicos observados nos tecidos renais obtidos ainda são considerados os melhores preditores (3, 8-10).

A biópsia está associada a complicações além de ser onerosa e apresentar problemas relacionados à representatividade e à variabilidade de interpretação. Apesar disso, ela permanece sendo o padrão-ouro para o diagnóstico das disfunções dos enxertos renais visto que não há biomarcadores não invasivos acurados que possam afirmar com alta sensibilidade e especificidade a situação do aloenxerto.

## **2. Revisão da literatura**

### **2.1. Transplantes Renais**

#### **2.1.1. Histórico**

Mathieu Jaboulay (1860-1913) foi o responsável pelo primeiro transplante renal com registro, em 1906. Sua tentativa incluiu como doadores um porco e uma cabra. Os xenoenxertos foram transplantados no braço e na coxa de um paciente com falência crônica renal e cada rim funcionou por uma hora. As segunda e terceira tentativas foram realizadas por Ernst Unger (1875-1938) também utilizando xenoenxertos e que não obtiveram sucesso por motivos ainda desconhecidos na época, porém os estudos *postmortem* desses pacientes mostraram a viabilidade da anastomose vascular (11, 12).

Após essas tentativas frustradas, o interesse nessa área foi diminuindo significativamente, e apenas em meados da Segunda Guerra Mundial as bases da imunologia do transplante voltaram a chamar atenção. Em 1946 um rim humano foi transplantado no braço de um paciente e o curto período de tempo de funcionamento deste foi o suficiente para que o paciente se recuperasse de uma insuficiência renal aguda. Em dezembro de 1954, em Boston foi realizado com sucesso o primeiro transplante renal entre gêmeos idênticos. Mas foi apenas em 1961, com o reconhecimento das propriedades imunossupressoras da azatioprina em combinação com corticosteróides que se tornou possível a realização de transplantes envolvendo doadores e receptores não-idênticos (2, 5, 11).

#### **2.1.2. Fatores pré-transplante**

A década de 60 foi um período de recomeço otimista na área do transplante renal, com o sucesso inicial da imunossupressão e possibilidade de manter o paciente em condições saudáveis até o transplante através da hemodiálise, os grandes hospitais da época começaram a colaborar, testes de

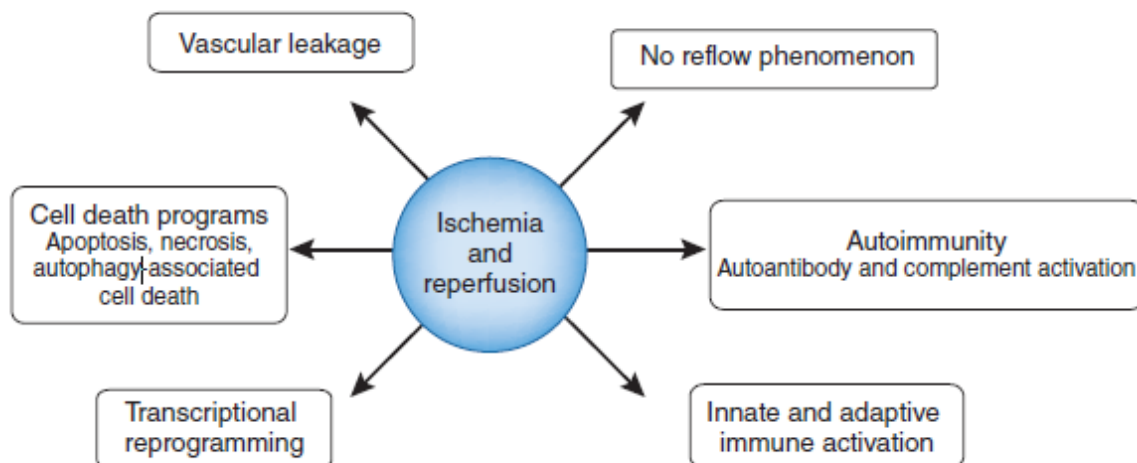
viabilidade começaram a ser ofertados e com o aumento da demanda, o transporte de órgãos entre os hospitais se tornou necessário (11).

No processo pré-transplante de doadores falecidos, o rim a ser recebido passa por um período sem circulação sanguínea até o momento de ser implantado. Os processos de isquemia e reperfusão do órgão acionam uma cascata inflamatória caracterizada pela intensa infiltração linfocitária seguida por injúria ao parênquima tecidual, causando danos ao enxerto (13).

A hipóxia causada pela baixa disponibilidade de oxigênio diminui a atividade da adenilato ciclase, dos níveis de Adenosina Monofosfato cíclico (cAMP) intracelular e da adenosina trifosfato (ATP), ocorre desregulação do cálcio, ocorrendo concomitantemente o aumento da permeabilidade vascular. Esse processo também leva a ativação dos programas de morte celular como apoptose, autofagia e necrose, além de causar alterações significantes na transcrição gênica visto que ocorre a inibição de enzimas que necessitam de oxigênio como cofator. Ao iniciarem esse processo de apoptose celular, os danos de isquemia e reperfusão podem contribuir para o desenvolvimento de RA ao tecido transplantado (14-16).

Após a liberação das anastomoses a reperfusão do órgão pode levar a chamada injúria de reperfusão que facilita a ativação das vias imunes (figura 1), incluindo reconhecimento por anticorpos de novos antígenos e ativação do sistema do complemento. Processos importantes e inevitáveis que possuem um grande potencial de afetar a integridade celular, acreditando-se ser um dos principais responsáveis pela lesão inicial do enxerto e por mediar, em longo prazo, mudanças estruturais incluindo a fibrose intersticial (17, 18).

**Figura 1: processo de isquemia e reperfusão**



Processo biológico envolvido no processo de isquemia e reperfusão (14).

### **2.1.3. Imunologia do transplante**

A rejeição hiperaguda ocorre minutos ou horas após a reperfusão do órgão transplantado. Ela é causada por anticorpos preexistentes no receptor e atualmente é rara devido à disponibilidade dos testes realizados previamente aos transplantes, como a prova cruzada e os testes de detecção de anticorpos. Os testes incluem a avaliação da compatibilidade no sistema dos antígenos leucocitários humanos (HLA), que são as principais moléculas alvo das respostas imunológicas que levam a rejeição do enxerto (19).

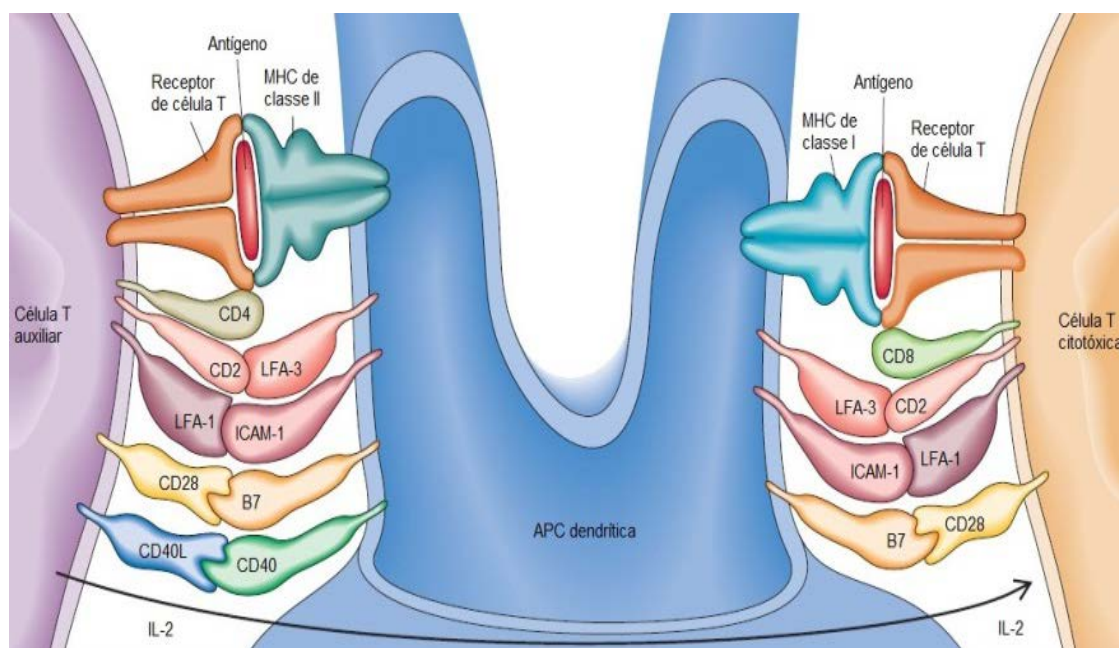
Sistema HLA é o nome em humanos das moléculas codificadas no complexo principal de histocompatibilidade (MHC), presente na maioria dos vertebrados, localizado no braço curto do cromossomo seis, formado por genes com funções imunológicas. O sistema MHC divide-se em três regiões codificadoras de antígenos, chamadas classe I, classe II e classe III, sendo os antígenos das duas primeiras classes, proteínas expressas na superfície celular e os da terceira classe, proteínas presentes no soro e em outros fluídos,

não tendo interesse para a área de transplante. O sistema HLA apresenta grande polimorfismo genético, no transplante renal os *loci* das classes de compatibilidade que apresentam maior relevância pertencem a I e a II, sendo respectivamente HLA-A, HLA-B, HLA-DR e HLA-DQ os mais relevantes (20).

Como parte da resposta imune inata, neutrófilos e macrófagos migram para o enxerto na tentativa de combater o “não próprio” (*non-self*) ao organismo. Células dendríticas são responsáveis pela ativação das células T através da apresentação direta de antígenos. Fragmentos capturados no tecido afetado são transportados para os órgãos linfóides secundários por células dendríticas que processam esses antígenos e os apresentam, sob a forma de pequenos peptídeos, na fenda do MHC de classe II, formando o complexo alopeptídeo-MHC, ao receptor da célula T CD3+ (20, 21).

Quando esse complexo se dá com moléculas da classe II do complexo MHC são ativadas as células T helper CD4+ (auxiliares) do receptor. Essas células entram em expansão clonal e migram para o enxerto onde irão exercer sua função efetora. Quando se dá com moléculas MHC classe I, esse complexo é identificado por células T CD8+ (citotóxicas), que são os principais efetores no reconhecimento e ataque de células alvo, ativando na fase inflamatória uma variedade de mecanismos citolíticos através da liberação de Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ , Perforina, Granzima B e espécies reativas de oxigênio. Sob ataque, a célula alvo pode morrer por necrose (caracterizada por ruptura da membrana plasmática e destruição das organelas) ou apoptose (caracterizada por condensação da cromatina, fragmentação do DNA e bolhas de membrana com citoplasma condensado) (19, 21). Figura 2.

**Figura 2: Interação entre um linfócito T e célula apresentadora de antígeno dendrítica**



As células T auxiliares reconhecem antígenos associados ao MHC de classe II. As células T citotóxicas reconhecem antígenos associados ao MHC de classe I. ICAM = molécula de adesão intercelular (intercellular adhesion molecule); LFA = antígeno associado à função leucocitária (leukocyte function-associated antigen) (22).

#### **2.1.4. Rejeições e Biópsia Renal**

A RA é uma séria complicação com risco para a perda do enxerto renal podendo ocorrer a qualquer momento da evolução do transplante (7, 19, 23). É uma condição heterogênea com o envolvimento de diversas estruturas cujo processo se inicia pelo reconhecimento dos antígenos de histocompatibilidade (aloantígenos) do doador pelos linfócitos T do receptor, passando a envolver estruturas renais e do sistema imune gerando alterações clínicas. Os principais alvos do sistema imune nessas condições são as células epiteliais tubulares e suas estruturas adjacentes, capilares glomerulares e vasos do aloenxerto (24, 25).

Seu diagnóstico e evolução baseados apenas em evidências clínicas são de difícil predição e os achados histológicos observados nos tecidos renais



obtidos através de biópsia ainda são considerados os melhores parâmetros diagnósticos. Porém, nesse estágio, o dano no órgão já está estabelecido e por consequência o tratamento anti-rejeição começa relativamente tarde (3, 7, 26).

A rejeição celular se manifesta de forma aguda, geralmente após a primeira semana do transplante sendo caracterizada principalmente pela infiltração de linfócitos T, podendo também apresentar linfócitos B, macrófagos e granulócitos. A rejeição mediada por anticorpos ocorre com ativação de linfócitos B que se diferenciam em plasmócitos, via estimulação por mediadores solúveis (interleucinas) produzidos por linfócitos T CD4+. Os anticorpos reconhecem sequências específicas de aminoácidos presentes em antígenos HLA expressos na superfície das células endoteliais do enxerto, ativam a cascata do complemento levando ao dano da microcirculação do enxerto, podendo se manifestar de forma aguda ou crônica (24, 27). Quando se manifesta de forma crônica, não apenas mecanismos do sistema imune estão envolvidos, mas também não imunes e ambos levam a um processo de fibrose do enxerto renal (28).

A classificação do dano histopatológico é feito através da padronização por um consenso internacional de nomenclaturas e critérios específicos para a caracterização histológica de rejeição do órgão, denominado classificação *Banff*, no qual a rejeição mediada por células T ou a rejeição mediada por anticorpos é diagnosticada com base em regras empíricas e as lesões são graduadas de maneira semi-quantitativa. Os diagnósticos segundo essa classificação podem ser agrupados como rejeição borderline, rejeições celulares agudas, tubulointersticial ou vascular, de diferentes severidades ou como rejeição aguda mediada por anticorpos, caracterizada pelos achados histológicos, presença de anticorpos anti-HLA do doador e pela marcação de C4d nos capilares peritubulares (29).

C4d consiste em um dos produtos gerados pela ativação do sistema do complemento, através da ativação da proteína C4, a qual, no fim do processo de ativação, gera dois produtos, um fragmento maior não funcional, o C4c e um fragmento menor, (com peso molecular de aproximadamente 42 kDa) que

possui um grupo tioéster reativo que rapidamente se liga as estruturas do alvo, ocasionando o depósito dessas moléculas nos capilares(30).

Apesar de ser considerado o padrão-ouro para diagnóstico de disfunções renais, essa metodologia é baseada na remoção de fragmentos corticais de natureza focal intra-enxerto, sendo um método invasivo, está associado a complicações como, sangramento, formação de fístulas arteriovenosas, perda do enxerto e óbito. Além de onerosa, tem problemas relacionados à representatividade e variabilidade de interpretação (3, 7, 8, 10). Uma vez que sua acurácia nunca pôde ser validada devido ao fato de não haver outra metodologia independente para a avaliação da existência de rejeição (31).

## **2.2. *microRNAs***

### **2.2.1. *Histórico***

Uma importante descoberta da biologia molecular nas últimas décadas são os micro-RNAs (miRNAs), que consistem em pequenos fragmentos conservados e não codificadores de RNA com aproximadamente 22 nucleotídeos. O primeiro miRNA, o lin-4, foi identificado em 1993 por Lee e colaboradores, através de um estudo genético em nematódeos *Caenorhabditis elegans*, onde foi observada a capacidade de um miRNA alterar a expressão de determinado gene (lin-14) através da sua ligação na posição 3'UTR (32, 33). Quase uma década depois, no ano 2000, um segundo miRNA (let-7) foi descoberto em nematódeos da mesma espécie e encontrado também em humanos, assim outra característica relevante dos miRNAs foi descoberta, a conservação deles através das espécies (34). A ligação desses micros fragmentos de RNA com o RNA mensageiro (mRNA) e sua conservação através das espécies atraiu a atenção de pesquisadores, iniciando a pesquisa nesta área (33, 35).

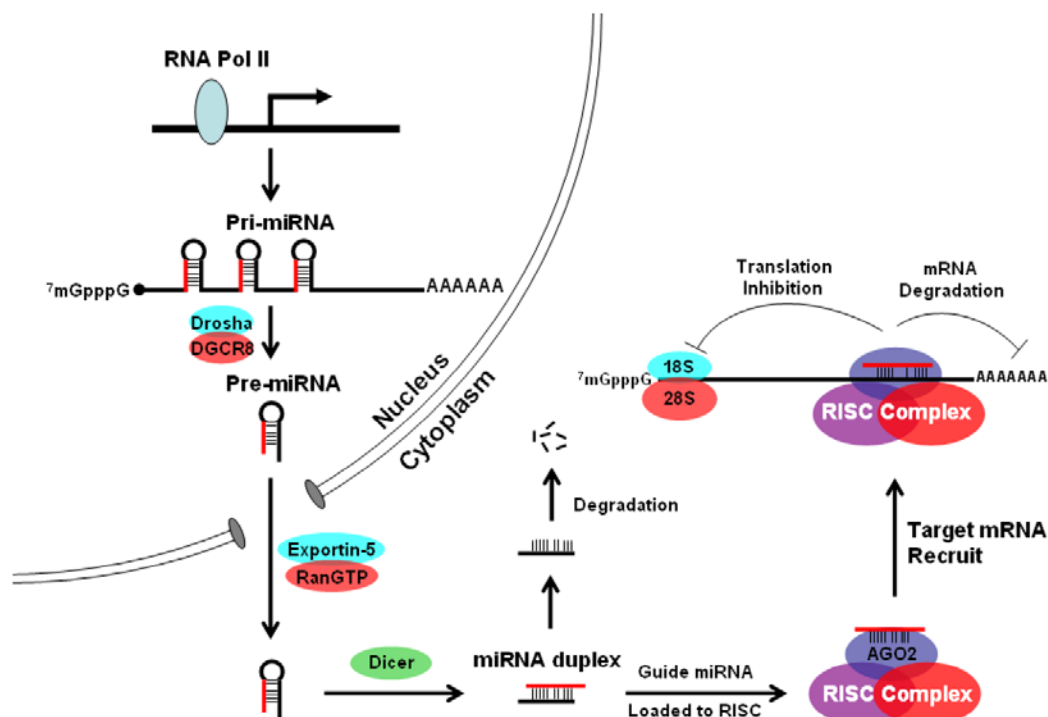
Centenas já foram clonados e previstos pela bioinformática, a organização genômica dos miRNAs é consideravelmente variada, representando de 1 a 4% do genoma humano, estimando-se que contenha em

torno de 800-1000 miRNAs, sendo parte comum aos primatas e que em torno de 50% do mRNA expresso seja controlado por miRNAs (35, 36).

### **2.2.2. Fisiologia**

Os microRNAs são codificados por genes específicos expressos no núcleo. São transcritos pela RNA polimerase II e chamados de transcritos primários, ou pri-miRNAs que são longas estruturas que possuem estrutura *cap5'*, ligação 5'-5' trifosfato entre a molécula precursora e um nucleotídeo para proteção contra ribonucleases e cauda poli(A), que permite a ligação com proteínas e garante a estabilidade da molécula, organizados em uma região central *stem*, em que dois segmentos de RNA com bases complementares (pelo pareamento de Watson-Crick) são pareados. Esta sequência é flanqueada de um lado por outras bases não pareadas e de outro lado pela região *loop* onde os pares de base não são complementares formando alças circulares, assumindo um formato de “grampo de cabelo” (*hairpin*). Dentro do núcleo as regiões não pareadas são clivadas pela RNase III Drosha e Parsha/DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) permanecendo as regiões *stem* e *loop* de aproximadamente 70 nucleotídeos, denominados pre-miRNAs. Os pre-miRNAs são transportados para o citoplasma via Exportina-5 e clivados pelo complexo enzimático RNase III Dicer/Argonauta que remove a alça terminal (estrutura *loop*) formando uma dupla de miRNAs com aproximadamente 22 nucleotídeos. Uma das fitas do miRNA é degradada por uma RNA helicase ATP-dependente e a outra fita, funcional é incorporada ao complexo silenciador RNA-induzido (RISC) compostos por diversas proteínas que guiam a maquinaria silenciadora para o RNA mensageiro alvo, inibindo a transcrição ou promovendo a degradação deste (35, 37-39). Figura 3.

**Figura 3: Esquemática da biogênese dos miRNAs**



Genes que codificam miRNA são transcritos em pri-miRNAs pela RNA polimerase II e processados por uma endonuclease (Drosha e Parsha/DGCR8) em fragmentos com estrutura de haste e alça de aproximadamente 70 nucleotídeos, denominados pré-miRNAs. Estes são transportados para o citoplasma via exportina-5 e processados em formas maduras duplas pela enzima Dicer, uma RNase III. A fita complementar é degradada e a funcional é incorporada ao RISC, iniciando a regulação do RNA. (Adaptação de Huang, 2010) (40)

Levando em consideração a pequena estrutura do miRNA, estudos indicam que a porção 5' deste, que equivale aos nucleotídeos 2 a 8 é essencial para manter a estabilidade e transporte da molécula ao RISC, essa porção é de grande interesse para ferramentas de bioinformática e estudos resultantes do uso dessa ferramenta mostram que os miRNAs possuem múltiplos alvos, sendo que um único miRNA pode regular negativamente centenas de mRNAs com funções distintas e a expressão de um único mRNA pode ser regulada por vários miRNAs distintos que atuam em conjunto (38, 41, 42). Os miRNAs regulam seus genes alvos através de dois mecanismos, por repressão translacional ou por degradação de RNA mensageiro, porém

persiste uma lacuna no conhecimento dos mecanismos que fazem um miRNA escolher entre uma forma e outra (36).

Esses pequenos fragmentos de RNA demonstram ter controle de processos como desenvolvimento, proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo e oncogênese. Apesar de se saber pouco sobre o processo de regulação dos miRNAs, sabe-se que a desregulação desses pode levar à perturbação e supressão de genes que operam na sinalização de cascatas intracelulares, levando a condições de doença ou de sua progressão (38, 41-43).

Diferentes estudos sugerem que os miRNAs participam ativamente na regulação e no desenvolvimento de células imunes (38, 41, 42). Já foram identificados miRNAs específicos que apresentam significativo impacto na diferenciação de células B e T e no processo celular necessário para a imunidade inata e adaptativa, incluindo inflamação, sinalização via receptores de células T e receptores de células “toll-like” (TLR), produção de citocinas, da função celular das células Treg e apresentação de antígenos (38, 39).

Um único miRNA é capaz de regular a expressão de centenas de mRNAs e proteínas, eles demonstram ter controle de processos como o desenvolvimento, a diferenciação e proliferação celular, e portanto têm habilidades como modular ambas respostas imunes, a inata e a adaptativa. A desregulação dos miRNA pode levar a perturbação e supressão de genes que operam na sinalização de cascatas intracelulares, levando a condições de doença ou de sua progressão. Diversas doenças já foram relacionadas a distúrbios desta sinalização (37, 41-44).

### **2.2.3. *miR-142-3p***

Este miRNA foi descrito com um marcador restritos às células mononucleares do sangue periférico (41, 45). Entre outras características, está diretamente relacionado com funções supressoras do sistema imune, especialmente na diferenciação e supressão das células Treg CD4+CD25+ reduzindo a expressão do membro nove da família da adenilato ciclase, uma das isoformas do cAMP (45, 46). Danger e colaboradores compararam a

expressão de diversos miRNAs em células do sangue periférico de pacientes que desenvolveram tolerância operacional e pacientes estáveis tratados com imunossupressão convencional. Eles identificaram que o miR-142-3p está diretamente envolvido com o processo de tolerância, estimulando alguns genes, entre eles fator de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ) envolvido na diferenciação e proliferação celular (47).

#### **2.2.4. miR-155**

Esse miRNAs se tornou importante ao ser detectado que a proteína Foxp3 (*Forkhead box P3*) se liga ao promotor do seu gene, Bic (*B-cell integration cluster*) localizado no braço longo do cromossomo 21 (38, 48). Em humanos esse miRNA está relacionado com linfócitos B e T maduros, incluindo centro germinal de células B (locais de maturação anticorpos e geração de células B de memória em respostas a anticorpos células T dependentes), produção de imunoglobulinas, com a estimulação de macrófagos e dos TLR de células dendríticas (43, 48, 49). Sendo expresso em macrófagos este miRNA é alvo de um grande número de mediadores inflamatórios sendo regulado também em resposta a estimulação de células imunes por endotoxinas (37). Nas células dendríticas o miR155 também faz parte do ciclo de feedback negativo direcionado a interação TLR/Interleucina-1. Assim, o miR-155 possui um papel importante na homeostase do sistema imune (38, 50).

#### **2.2.5. miR-210**

O miR-210 está localizado em um íntron de um RNA não codificante transcrito a partir do AK123483 no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5). Uma das funções desse miRNA que atrai a atenção na área de transplantes é seu envolvimento na regulação de situações de baixa oxigenação, pois dos sensores fisiológico de hipóxia chamados Fator Indutor da Hipóxia (HIFs), o HIF1 $\alpha$  se liga diretamente na parte proximal do promotor do miR-210 e a Efrina-A3 é um de seus alvos mais relevantes. Esse marcador também está relacionado com a parada do crescimento celular, regula o metabolismo

mitocondrial, auxilia no reparo de DNA e na diferenciação celular (40, 51). Estudos prévios mostram que ele está diminuído em amostras de urina de pacientes com RA e se correlaciona com a taxa de filtração glomerular um ano após o transplante. Lorenzen et al realizou um estudo específico para este marcador na urina e, afirmou que apenas o miR-210 diferencia pacientes com RA de pacientes transplantados estáveis com infecção do trato urinário e também que seus níveis no sangue periférico estão aumentados em doenças agudas isquêmicas tais como a injúria renal aguda (44).

### **2.3. A reação em cadeia da polimerase e os microRNAs**

Um dos maiores avanços na área das ciências biológicas se deu com o desenvolvimento de uma técnica denominada Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) desenvolvida por Kary Mullis em 1983 vindo a lhe render o prêmio Nobel da Química em 1993. Essa técnica se tornou possível com o isolamento da enzima DNA Polimerase de uma bactéria termofílica encontrada nos lagos quentes do Parque Nacional de Yellowstone (Estados Unidos da América) cuja temperatura ótima é elevada, em torno dos 72-80°C e passou a ser denominada TaqDNA Polimerase (52).

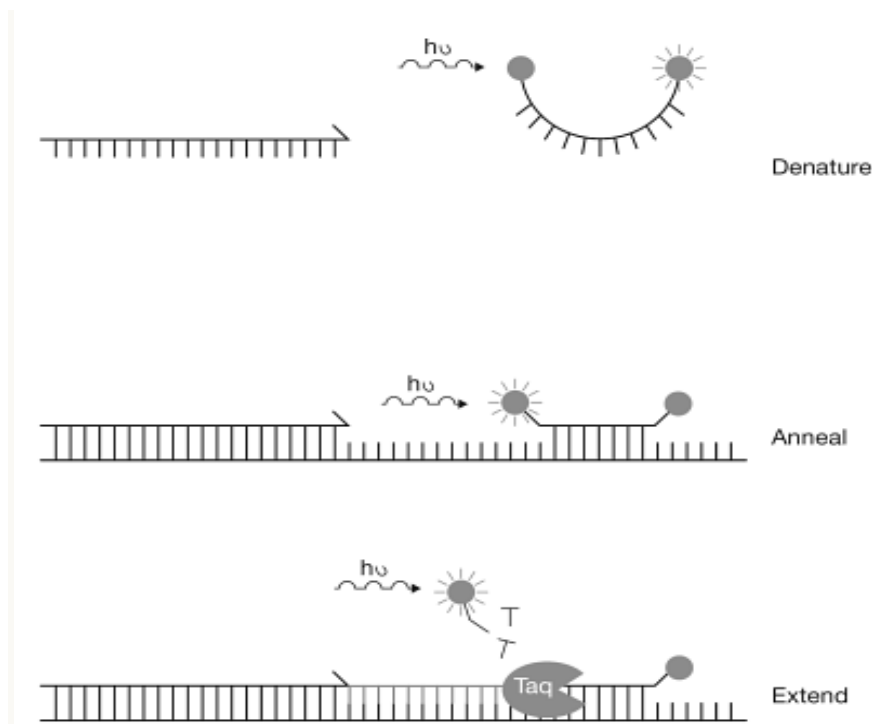
A técnica convencional proporcionava resultados qualitativos, exceto na modalidade denominada PCR competitivo, trabalhosa, artesanal e de difícil reprodutibilidade. Com o avanço tecnológico esta técnica foi inovada para uma determinada PCR em tempo real (RT-PCR) que é altamente sensível e permite a quantificação de transcritos de pequenas variações na expressão gênica (53).

Para análise de expressão gênica por RT-PCR é necessária a extração do material genético (RNA) do material de interesse. O RNA por ser uma fita simples é instável e necessita que seja sintetizado uma molécula complementar (cDNA) através da ação de uma transcriptase reversa para então a técnica poder ser aplicada (54). Esta técnica se baseia na adição da Taq Polimerase, desoxinucleotídeos, íons e *primers*, sequências de DNA iniciadoras específicas do gene de interesse que sinalizarão a partir de qual ponto a enzima começará a sequência (52).

Uma das metodologias empregadas para RT-PCR é a TaqMan (Perkin Elmer Applied Biosystems) que consiste na atividade exonucleásica 5'-3' da TaqMAN® DNA Polimerase. Essa enzima digere uma sonda marcada que anela especificamente na parte interna do seguimento a ser amplificado entre dois *primers*. A sonda TaqMan possui na extremidade 5' uma molécula fluorescente chamada "*reporter*" e na outra extremidade, 3', uma molécula chamada "*quencher*" cuja função é inibir a fluorescência natural emitida pela "*reporter*". Em determinada temperatura do ciclo essa sonda anela entre os *primers* sendo posteriormente clivada pela enzima quando esta sintetiza a fita complementar. Ao ser clivada, as sondas se afastam e a "*reporter*" passa a emitir sua fluorescência (figura 4). Esse processo passa a acontecer seriadamente, através da variação de temperatura, os ciclos consistem na quebra das pontes de hidrogênio da fita dupla, do anelamento dos *primers* e da sonda e a síntetização de uma nova fita pela a enzima que cliva a sonda que passa a emitir fluorescência, ao término de um ciclo, retorna-se ao passo inicial (53, 55).



**Figura 4: Sinal fluorescente**



Esquemática do anelamento e do sinal fluorescente gerado com a clivagem pela TaqMan (56).

Com o passar dos ciclos o sinal fluorescente aumenta proporcionalmente e esses sinais são detectados pela máquina, que une um termociclador e um leitor de fluorescência. À medida que os ciclos se completam os sinais produzidos são detectados por um sistema óptico, processados por um software que expressa graficamente a intensidade de fluorescência por número de ciclos (figura 5) (57). A quantificação do produto pode ser absoluta quando esse é comparado com uma curva padrão ou relativa quando se relaciona o produto de interesse com um calibrador, amostra utilizada como comparativa. A partir desses dados é aplicado o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  descrita por Livak e colaboradores em 2001 (58).

**Figura 5: Gráfico de fluorescência por número de ciclos**

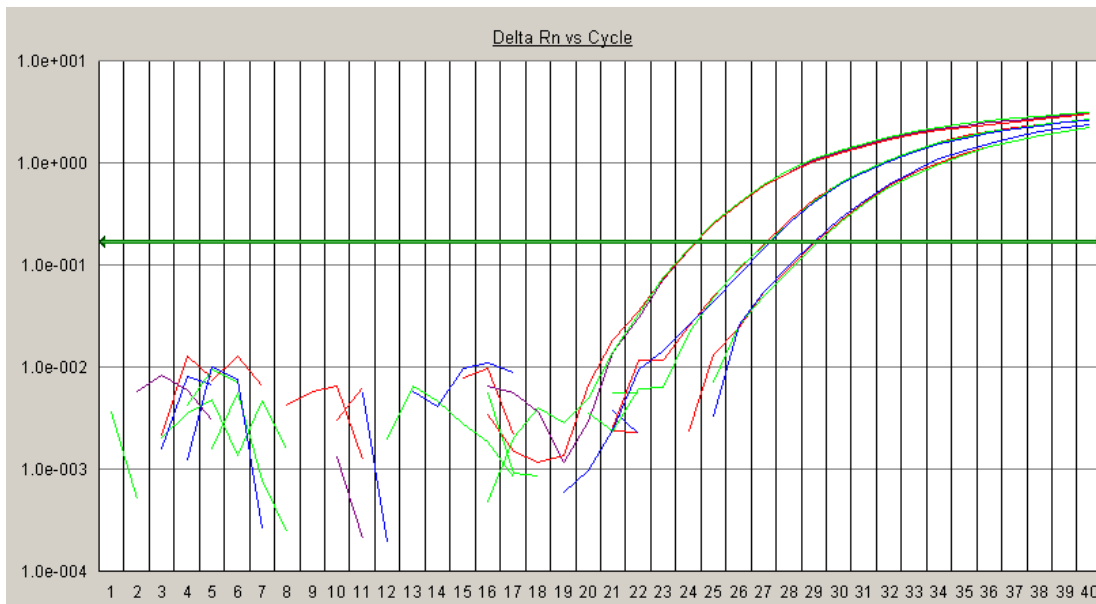
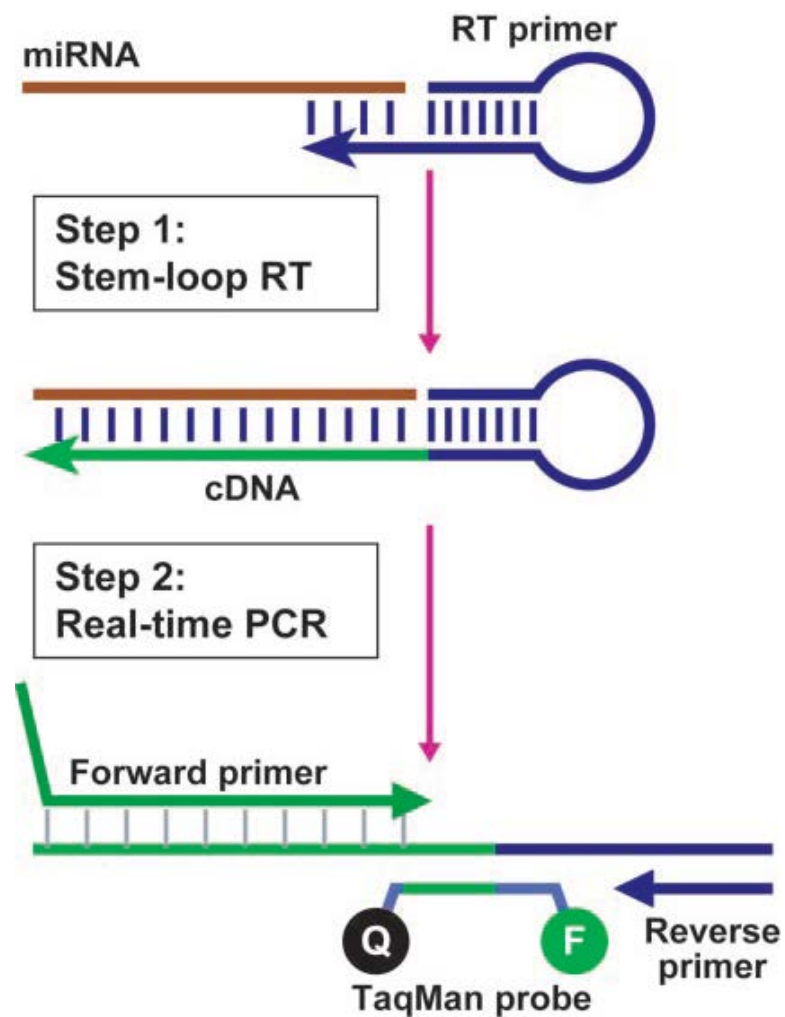


Foto de fonte própria.

### **2.3.1 A amplificação de miRNAs por RT-PCR**

A detecção de miRNAs por RT-PCR é desafiador, visto que o alvo inteiro possui aproximadamente 22 pares de base, e este é o tamanho de um primer convencional, dos métodos mais descritos para a utilização da técnica, os mais utilizados são, o método determinado Poli(A), é considerado menos específico, consiste na poliadenilação dos miRNAs por uma poli(A) polimerase que antecede a síntese do cDNA por *primers* universais, seguido pela utilização de um “*primer forward*” específico para o alvo em estudo e um “*reverse*” universal na reação do RT-PCR. E o método denominado “*stem-loop*” que utiliza *primers* com estrutura “*stem-loop*” específico para cada miRNA a ser estudado durante a etapa de síntese de cDNA e um segundo primer específico para a etapa de RT-PCR, utilizando sondas TaqMan, (figura 6) possuindo uma maior especificidade, porém cada alvo a ser estudado requer um cDNA específico, tornando oneroso a técnica (59-61).

Figura 6: RT-PCR utilizando o método TaqMan.



Primeiro passo: *primers* específicos “*stem- loop*” se ligam ao alvo. Segundo passo: detecção por RT-PCR utilizando sondas TaqMan, incluindo um *primer* “*forward*” específico (62).

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Geral**

Avaliar a transcrição e expressão gênica de miRNAs em tecido renal, sangue periférico e em células do sedimento urinário de pacientes transplantados renais com diferentes causas de disfunção do enxerto para a avaliação diagnóstica não-invasiva da rejeição aguda de rins transplantados.

#### **3.2 Específicos**

Avaliar os parâmetros diagnósticos resultantes da avaliação da expressão genética dos miRNA-155, miRNA-210, miR-142-3p em tecido renal, células mononucleares sanguíneas e células do sedimento urinário de rins transplantados com diferentes causas de disfunção do enxerto renal.

#### **4. Referências bibliográficas da revisão**

1. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Port FK, Arndorfer JA, Cibrik DM, Kaplan B. Survival improvement among patients with end-stage renal disease: trends over time for transplant recipients and wait-listed patients. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(6):1293-6.
2. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med*. 2010;363(15):1451-62.
3. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med*. 2005;353(22):2342-51.
4. ABTO. RIM. Edição Comemorativa 10 anos do Registro Brasileiro de Transplante, análise quantitativa. 2007.
5. Girlanda R, Kirk AD. Frontiers in nephrology: immune tolerance to allografts in humans. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(8):2242-51.
6. Recipients SROt. OPTN/SRTR 2011 Annual Data Report: Kidney [http://srtr.transplant.hrsa.gov/annual\\_reports/2011/pdf/01\\_kidney\\_12.pdf2011](http://srtr.transplant.hrsa.gov/annual_reports/2011/pdf/01_kidney_12.pdf2011) [cited 2013 06 de novembro].
7. Geddes CC, Woo YM, Jardine AG. The impact of delayed graft function on the long-term outcome of renal transplantation. *J Nephrol*. 2002;15(1):17-21.
8. Nield GN, Rudge CJ. Acute and chronic rejection. In: G TAaC, editor. *Immunology of Renal Transplantation*. 1 ed. London: Edward Arnold; 1993. p. 221-34.
9. Suthanthiran M. Human renal allograft rejection: molecular characterization. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13 Suppl 1:21-4.
10. Serón D, Alexopoulos E, Raftery MJ, Hartley RB, Cameron JS. Diagnosis of rejection in renal allograft biopsies using the presence of activated and proliferating cells. *Transplantation*. 1989;47(5):811-6.
11. Hamilton D. Kidney transplantation: A history. In: Morris P, Knechtle SJ, editors. *Kidney Transplantation: Principles and Practice*. Philadelphia: Souders Eselvier; 2008.

12. Garcia VD, Pestana JOM, Ianhez LE. História dos transplantes no Brasil. In: Garcia VD, Abbud-Filho M, Neumann J, Pestana JOM, editors. Transplante de órgãos e tecidos 2ed. São Paulo Segmento Pharma 2006. p. 27-42.
13. Gorbacheva V, Fan R, Li X, Valujskikh A. Interleukin-17 promotes early allograft inflammation. *Am J Pathol.* 2010;177(3):1265-73.
14. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med.* 2011;17(11):1391-401.
15. Feitoza CQ, Câmara NO, Pinheiro HS, Gonçalves GM, Cenedeze MA, Pacheco-Silva A, et al. Cyclooxygenase 1 and/or 2 blockade ameliorates the renal tissue damage triggered by ischemia and reperfusion injury. *Int Immunopharmacol.* 2005;5(1):79-84.
16. Lemos FB, Ijzermans JN, Zondervan PE, Peeters AM, van den Engel S, Mol WM, et al. Differential expression of heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in cadaveric and living donor kidneys after ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(12):3278-87.
17. Carroll MC, Holers VM. Innate autoimmunity. *Adv Immunol.* 2005;86:137-57.
18. Jang HR, Ko GJ, Wasowska BA, Rabb H. The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney. *J Mol Med (Berl).* 2009;87(9):859-64.
19. Spiegel JC, Lorenzen JM, Thum T. Role of microRNAs in immunity and organ transplantation. *Expert Rev Mol Med.* 2011;13:e37.
20. Shankarkumar U. The Human Leukocyte Antigen (HLA) System. *International Journal of Human Genetics*2004. p. 91-103.
21. Csencsits K, Wood SC, Lu G, Magee JC, Eichwald EJ, Chang CH, et al. Graft rejection mediated by CD4+ T cells via indirect recognition of alloantigen is associated with a dominant Th2 response. *Eur J Immunol.* 2005;35(3):843-51.
22. Carter LL, Zhang X, Dubey C, Rogers P, Tsui L, Swain SL. Regulation of T cell subsets from naive to memory. *J Immunother.* 1998;21(3):181-7.
23. Gupta G, Womer KL. Profile of belatacept and its potential role in prevention of graft rejection following renal transplantation. *Drug Des Devel Ther.* 2010;4:375-82.

24. Gwinner W. Renal transplant rejection markers. *World J Urol.* 2007;25(5):445-55.
25. Walsh PT, Strom TB, Turka LA. Routes to transplant tolerance versus rejection; the role of cytokines. *Immunity.* 2004;20(2):121-31.
26. Heidt S, San Segundo D, Shankar S, Mittal S, Muthusamy AS, Friend PJ, et al. Peripheral blood sampling for the detection of allograft rejection: biomarker identification and validation. *Transplantation.* 2011;92(1):1-9.
27. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2007;8(4):345-50.
28. Moll S, Pascual M. Humoral rejection of organ allografts. *Am J Transplant.* 2005;5(11):2611-8.
29. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant.* 2008;8(4):753-60.
30. Vongwiwatana A, Tasanarong A, Hidalgo LG, Halloran PF. The role of B cells and alloantibody in the host response to human organ allografts. *Immunol Rev.* 2003;196:197-218.
31. Colvin RB, Cohen AH, Saiontz C, Bonsib S, Buick M, Burke B, et al. Evaluation of pathologic criteria for acute renal allograft rejection: reproducibility, sensitivity, and clinical correlation. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8(12):1930-41.
32. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.
33. Liu J. Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20(2):214-21.
34. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvié AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000;403(6772):901-6.
35. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.
36. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009;136(2):215-33.

37. Li JY, Yong TY, Michael MZ, Gleadle JM. Review: The role of microRNAs in kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. 2010;15(6):599-608.
38. Harris A, Krams SM, Martinez OM. MicroRNAs as immune regulators: implications for transplantation. *Am J Transplant*. 2010;10(4):713-9.
39. Sarma NJ, Tiriveedhi V, Ramachandran S, Crippin J, Chapman W, Mohanakumar T. Modulation of immune responses following solid organ transplantation by microRNA. *Exp Mol Pathol*. 2012;93(3):378-85.
40. Huang X, Le QT, Giaccia AJ. MiR-210--micromanager of the hypoxia pathway. *Trends Mol Med*. 2010;16(5):230-7.
41. Anglicheau D, Sharma VK, Ding R, Hummel A, Snopkowski C, Dadhania D, et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(13):5330-5.
42. Hartono C, Muthukumar T, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of acute rejection of renal allografts. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15(1):35-41.
43. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(5):1604-9.
44. Lorenzen JM, Volkman I, Fiedler J, Schmidt M, Scheffner I, Haller H, et al. Urinary miR-210 as a mediator of acute T-cell mediated rejection in renal allograft recipients. *Am J Transplant*. 2011;11(10):2221-7.
45. Huang B, Zhao J, Lei Z, Shen S, Li D, Shen GX, et al. miR-142-3p restricts cAMP production in CD4+CD25- T cells and CD4+CD25+ TREG cells by targeting AC9 mRNA. *EMBO Rep*. 2009;10(2):180-5.
46. Risøe PK, Ryg U, Wang YY, Rutkovskiy A, Smedsrød B, Valen G, et al. Cecal ligation and puncture sepsis is associated with attenuated expression of adenylyl cyclase 9 and increased miR142-3p. *Shock*. 2011;36(4):390-5.
47. Danger R, Pallier A, Giral M, Martínez-Llordella M, Lozano JJ, Degauque N, et al. Upregulation of miR-142-3p in peripheral blood mononuclear cells of operationally tolerant patients with a renal transplant. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(4):597-606.
48. Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*. 2007;316(5824):604-8.



49. Calame K. MicroRNA-155 function in B Cells. *Immunity*. 2007;27(6):825-7.
50. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*. 2007;316(5824):608-11.
51. Luft FC. Merely miR210 in mesenchymal stem cells--one size fits all. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90(9):983-5.
52. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006;27(2-3):95-125.
53. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol*. 2005;34(3):597-601.
54. Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem*. 2000;285(2):194-204.
55. Almeida PSR, Saddi VA. Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2007. p. 382-6.
56. Dorak T. Real-time PCR. 1, editor. *Bios Advanced Methods*: Taylor and Francis group; 2006.
57. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol*. 2002;30(6):503-12.
58. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
59. Balcells I, Cirera S, Busk PK. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol*. 2011;11:70.
60. Shi R, Chiang VL. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques*. 2005;39(4):519-25.
61. Jensen SG, Lamy P, Rasmussen MH, Ostenfeld MS, Dyrskjøt L, Orntoft TF, et al. Evaluation of two commercial global miRNA expression profiling platforms for detection of less abundant miRNAs. *BMC Genomics*. 2011;12:435.

62. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(20):e179.

**5. Artigo Avaliação de miRNAs como biomarcadores não invasivos de rejeição aguda em transplante renal**

**Formatação para American Journal of Transplantation**

**Assessment of miRNAs as noninvasive biomarkers of acute rejection in renal transplantation**

Domenico, TD<sup>1</sup>, Joelsons, G<sup>1</sup>, Manfro, RC<sup>1,2,3</sup>

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

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

<sup>3</sup> Corresponding author

**Running title:** MicroRNAs as noninvasive biomarkers of acute renal transplant rejection

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

**Corresponding author**

Roberto Ceratti Manfro,

Unidade de Transplante Renal, Serviço de Nefrologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

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

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

E-mail: rmanfro@hcpa.ufrgs.br

**Abbreviations:**

**AUC** – Area under the curve

**BL** – Borderline changes

**cDNA** - complementary DNA

**IF/TA** – interstitial fibrosis and tubular atrophy

**miRNAs** – micro-RNAs

**ATN** – acute tubular necrosis

**AR** – acute rejection

**CR** – chronic rejection

**ROC** – receiver operating characteristics

**RT-PCR** – real-time polymerase chain reaction

**TLR** – toll-like receptors

**Treg** – regulatory T cells

## **Abstract**

Acute rejection is a major complication of the post-transplant period, and the gold-standard method for its diagnosis is graft biopsy, a procedure fraught with limitations and hazards. There are no known noninvasive biomarkers capable of accurately identifying graft dysfunction. MicroRNAs are small molecules of non-coding RNA that act as post-transcriptional regulators of the expression of several genes, including those involved in immune response. In the present study, the microRNAs miR-142-3p, miR-155, and miR-210 were analyzed in peripheral blood, urine, and renal tissue samples collected from transplant recipients who developed graft dysfunction and from a group of stable patients. Analyses were carried out by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). In peripheral blood samples, we found a statistically significant reduction in miR-142-3p expression in the acute rejection group (n=23) versus patients with other causes of graft dysfunction (n=68) (P = 0.01). There were no between-group differences in miR-155 and miR-210 expression, nor in miR142-3p expression in samples from other sources. We conclude that miR-142-3p expression has a distinct pattern in the setting of acute renal graft rejection, and may have potential as a biomarker for renal graft dysfunction.

## Introduction

Renal transplantation is still the treatment of choice for many patients with chronic kidney disease, and provides a significant increase in life expectancy and quality of life in this population (1-3). Despite advances in the field, acute rejection (AR) remains one of the main causes of renal graft damage, and can lead to graft failure (4-6). With current immunosuppressant therapy practices, AR occurs in 10 to 15% of patients in the first year after transplantation, and is a cause of significant morbidity due to loss of graft function and the need for exposure to greater immunosuppression (3, 7, 8). The main targets of cellular rejection are the tubular epithelial cells and their adjacent structures, the glomerular capillaries and vessels in the allograft (9, 10). It is largely characterized by T-cell infiltration, and may also involve B cells, macrophages, and granulocytes. Antibody-mediated rejection involves activation of B cells, which differentiate into plasma cells via stimulation by soluble mediators (interleukins) produced by CD4+ T cells (9, 11).

Graft dysfunction is usually first detected by changes in kidney function tests or markers of damage and then classified by histological appearance. Its natural history is difficult to predict, and the histological findings observed in renal biopsy specimens are considered the best predictors of progression (3, 5, 12-14), even though renal biopsy is costly, carries a high potential for complications, and is subject to representativeness and interpretation bias. Histopathological evidence of damage is assessed using the so-called Banff 07

Classification of Renal Allograft Pathology, developed in a consensus meeting of pathologists (15).

Discovered in the last two decades, microRNAs (miRNAs) are small fragments of non-coding DNA that are highly conserved across species (16). A single miRNA may negatively regulate hundreds of mRNAs with distinct roles; in turn, the expression of one mRNA may be regulated by a series of distinct miRNAs acting in tandem. These small RNA fragments control such processes as cell development, proliferation, and differentiation; apoptosis; metabolism; and oncogenesis. Their deregulation may lead to derangement and suppression of genes that play a role in intracellular cascade signaling, and thus lead to disease onset or progression (17-20).

Studies suggest that miRNAs are actively involved in the regulation and development of immune cells (17-19). Research has identified specific miRNAs having a significant impact on B- and T-cell differentiation and on a variety of cell processes related to innate and adaptive immunity, including inflammation, T-cell receptor and toll-like receptor (TLR) signaling, cytokine production, regulatory T-cell (Treg) function, and antigen presentation (17, 21).

The present study will analyze three specific targets. The first is miR-142-3p, a marker restricted to peripheral blood mononuclear cells that is directly involved in immune system suppression functions, particularly the differentiation and suppression of CD4+CD25+ Tregs (18, 22, 23), and plays a role in the tolerance process, stimulating certain genes – such as transforming growth factor- $\beta$  (24) – and acting as a cAMP regulator (23, 24). The second is miR-155, a target of protein Foxp3 (Forkhead box P3), which binds to the promoter of its

gene, *Bic* (B-cell integration cluster). It is related to mature B and T cells, immunoglobulin production, and stimulation of macrophage and dendritic cell TLRs (17, 20, 25, 26). Finally, the third is miR-210, which is involved in the regulation of low-oxygenation states and is related to cell growth arrest, regulation of mitochondrial metabolism, DNA repair, and cellular differentiation (27, 28).

## **Materials and methods**

### **Patients**

The study sample comprised 91 renal biopsy specimens obtained from 69 renal transplant recipients with graft dysfunction. These biopsies had been performed for clinical indications or for monitoring purposes. Seven biopsies obtained per clinical protocol in seven patients with stable graft function on month 3 post-transplantation were used as a control group for gene expression. The study was conducted at the Renal Transplantation Unit of the Department of Nephrology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, from March 2012 to July 2013. All patients provided written informed consent for their participation in the study.

All patients were on immunosuppression consisting of a combination of corticosteroids, mycophenolic acid derivatives, and calcineurin inhibitors. Basiliximab or rabbit anti-thymocyte globulin induction therapy was used in all deceased-donor graft recipients and all living-donor graft recipients considered at increased risk of rejection.



The ethical and methodological aspects of this study were approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Ethics Committee with judgment number 120011 and accredited by the National Research Council of the Brazilian Ministry of Health.

### **Samples**

Biopsies were performed percutaneously, under real-time ultrasound guidance, using a semi-automatic biopsy gun with a 16G needle. At the time of biopsy, all patients had well-controlled blood pressure and all parameters of a coagulation panel (obtained no more than 24 hours before) within normal limits. Before renal biopsy, a comprehensive workup was performed to rule out obstructive or vascular issues, urinary fistula, infection, or drug toxicity as causes of graft dysfunction. Among the patients with graft dysfunction, 51 underwent one biopsy, 14 underwent two biopsies, and four underwent three biopsies. Of the seven patients who underwent per-protocol biopsies, three had already undergone renal biopsy for clinical indications or monitoring purposes at an earlier time after transplantation.

### **Specimen collection and preparation**

Two renal cortex fragments were collected during each biopsy procedure. One-third of one of these fragments was placed in a microtube, flash-frozen by submerging in liquid nitrogen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Peripheral blood samples (5 mL collected into EDTA-containing tubes) and urine samples (50 mL collected into sterile vials) were obtained immediately before renal

biopsy. For cell separation, both sample types were rinsed and processed so as to concentrate the cells of interest (blood) or obtain sediment (urine). In the case of blood samples, 2-mL aliquots were transferred to sterile, 12-mL Falcon tubes to which 10 mL of erythrocyte-lysing Buffer EL (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) were added, followed by 21 minutes of incubation on ice with intermittent vortexing every 7 minutes. After this step, the samples were centrifuged at 1800 rpm for 10 minutes, leaving a pellet that contains the cells of interest at the bottom of the tube. The pellet was preserved and the supernatant discarded. The pellet was then resuspended in 1.5 mL of Buffer EL, transferred to microtubes, further centrifuged for 10 minutes at 10000 rpm, the supernatant discarded, and the resulting cell concentrate frozen at -80°C. For urine samples, the entire volume was distributed across sterile 12-mL Falcon tubes, which were then centrifuged at 1800 rpm for 10 minutes to concentrate the sediment at the bottom of the tubes. The supernatant was discarded and the sediment of one of the tubes resuspended in 750 µL of phosphate-buffered saline. The resulting homogenate was transferred to the remaining tubes and stirred with a pipette so as to resuspend all sediment, which was then concentrated into a single microtube. This tube was then centrifuged for 10 minutes at 10000 rpm, the supernatant discarded, and the sediment frozen at -80°C.

### **miRNA processing**

The miRNAs were extracted from samples using the *mirVana*<sup>™</sup> PARIS<sup>™</sup> commercial kit (Ambion®, Life Technologies Corporation). Briefly, cell concentrate/ sediment was dissolved or tissue fragmented with 500 µL of buffer

in a dispersing machine (ULTRA-TURRAX T 10 basic – IKA, Campinas, SP, Brazil) and eluted in 60  $\mu$ L of water for injection preheated to 95°C, in accordance with manufacturer instructions.

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

injection heated to 95°C. The eluate is then centrifuged at 10000 rpm for 50 seconds and stored at -80°C until the next stage.

To remove any residual DNA that may have contaminated the sample during the extraction stage, we used the DNA-free™ kit (Applied Biosystems®, Life Technologies Corporation, Foster City, CA, USA) for purification of 50 µL of each sample in accordance with manufacturer instructions. Briefly, a 50-µL aliquot of sample was transferred to a 0.5-mL microtube to which 5 µL of 10X DNase I Buffer and 1 µL of rDNase I enzyme was added. This material was homogenized and incubated at 37°C for 30 minutes to enable rDNase I activity. The enzyme was then inactivated by adding 5 µL of DNase Inactivation Reagent and incubating at room temperature for 2 minutes. Finally, to remove any remaining reagents, the samples were centrifuged at 10000 rpm for 90 seconds, the supernatant transferred to a fresh microtube, and the purified samples stored at -80°C until the next stage.

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

### **Amplification and detection**

The following specific TaqMan primers (Applied Biosystems®) were used for real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR): miR-142-3p 4427975/000464; miR-155 4427975/002623; miR-210 4427975/000512; and Cel-miR-39 4427975/000200. The endogenous control used for sample normalization was synthetic exogenous control Cel-miR-39 from *C. elegans* (Qiagen, catalog number MSY0000010), which was spiked into samples before the reverse transcription stage in a 0.5 µL volume at a 50 pM concentration.

The complementary DNA (cDNA) formation stage was carried out with the TaqMan MicroRNA RT kit (Applied Biosystems®) as per manufacturer instructions, using 10 µL of reaction mix: 0.15 µL of 100mM dNTPs, 1.0 µL of MultiScribe™ reverse transcriptase (50 U/µL), 1.5 µL of enzyme buffer, 0.19 µL of RNase inhibitor (20 U/µL), 4.16 µL of nuclease-free water, and 3.0 µL of target-specific primer, to which 5 µL of miRNA were added. For synthesis, the samples were incubated at 16°C for 30 minutes, at 42°C for 30 minutes, and at 85°C for 5 minutes, then stored at -20°C until the time of RT-PCR, which consisted of the amplification of 2 µL cDNA using 5 µL of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®), 0.5 µL of specific primers, and 2.5 µL of nuclease-free water, in a final reaction volume of 10 µL. The reaction was run on an ABI Prism 7000 system (Applied Biosystems®). Samples were incubated for 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute.

The cycle threshold (Ct) was calculated automatically using software. miRNAs expression was normalized using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method described by Livak and Schmittgen (29).

### **Statistical analyses**

Asymmetrically distributed variables were expressed as medians and interquartile ranges, whereas symmetrically distributed variables were expressed as means  $\pm$  standard deviations. The Kruskal–Wallis and Mann–Whitney *U* tests were used for paired-samples analysis of variance and for between-group analysis. Qualitative data were expressed as absolute and relative counts, and the chi-square or Fisher's exact tests were used for between-group analyses. All tests were two-tailed, and a P-value  $<0.05$  was defined as statistically significant. All analyses were carried out in PASW Statistics 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### **Results**

A total of 91 biopsy specimens obtained from patients with renal allograft dysfunction and seven per-protocol biopsies obtained from patients with stable allograft function were assessed. The gold-standard for diagnostic classification of dysfunction was the combination of clinical assessment and biopsy findings, as interpreted per the Banff 07 Classification (29), and response to specific therapy. Patients were divided between two groups in accordance with the established diagnosis. One group included all cases of acute rejection (group

AR), with 23 biopsies, whereas the other group included all other causes of graft dysfunction (group OD, other dysfunction), with 68 biopsies. Diagnoses in the OD group included borderline changes (BL, n=18), acute tubular necrosis (ATN, n=18), ATN+BL (n=11), chronic rejection (CR, n=7), calcineurin inhibitor nephropathy (n=7), polyomavirus-associated nephropathy (n=2), and one case each of the following: interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA), focal segmental glomerulosclerosis, acute tubulointerstitial nephritis, malignant nephrosclerosis, and unspecified chronic kidney disease. Demographic data are shown in Table 1. There was a significant age difference between the two groups, with a lower mean age in the AR group ( $P<0.05$ ). Time from transplantation to biopsy was also shorter in this group ( $P<0.05$ ).

### **Table 1**

Seven patients who underwent per-protocol biopsy on month 3 after transplantation and agreed to take part in this study were used as controls for calculation of  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . The levels of three miRNAs with potential for involvement in renal allograft dysfunction (miR-142-3p, miR-155, and miR-210) were measured in renal tissue, peripheral blood, and urine (Table 2 and Figure 1). In patients, expression of the miRNAs 142-3p and 210 was greater than in controls in all tested compartments, but the difference was not statistically significant. There was, however, a significant difference in miR142-3p expression in blood, which was higher in group OD (median target expression = 2.39) than in group AR (median expression = 1.30) ( $P<0.05$ ). Although

expression in the AR group was 22% higher than in controls, the difference was not statistically significant (median [IQR], 1.31 [0.48–1.84] in AR vs. 1.08 [0.35–2.40] in controls;  $P=0.666$ ).

## **Table 2**

## **Figure 1**

Receiver operating characteristic (ROC) curves were plotted for assessment of diagnostic parameters of miRNA gene expression. The area under the curve (AUC) for miR142-3p was 0.68 (95%CI 0.56–0.80). Using a cutoff point of 1.57 on the ROC curve, i.e., a 57% increase in gene expression relative to controls, we obtained the following parameters: sensitivity, 64.9%; specificity, 60.9%; positive predictive value, 84%; and negative predictive value, 41% ( $P=0.037$ , Pearson's chi-square test) (Figure 2).

## **Figure 2**

No correlations were found between expression levels of different miRNAs in different compartments. Likewise, no correlations were found among the expression levels of the same miRNA in different compartments.



## Discussion

A critical issue in renal transplantation is the mechanical basis for the key changes in gene expression that occur during an episode of rejection. Within this context, in addition to their direct influence in homeostasis settings, miRNAs are tissue-specific, stable in a variety of bodily fluids, and less susceptible to degradation by endogenous RNases. These characteristics have prompted researchers to search for miRNA-based biomarker profiles of graft dysfunction (30). The search for noninvasive biomarkers that reflect events occurring within the graft opens important new avenues for diagnosis and, particularly, prognostication. The present study assessed three miRNAs that, according to the literature, have potential as diagnostic markers of AR after renal transplantation.

miR-210 is directly involved in situations featuring tissue hypoxia, a phenomenon that may occur during episodes of tissue inflammation, such as in acute rejection of transplanted organs (18, 28, 31). In the present study, there was no significant difference in expression of this miRNA in any of the three compartments assessed. These findings are consistent with those reported by Sui et al., who performed miRNA microarray screening and compared three biopsy specimens from patients with AR vs. biopsy specimens of normal kidney tissue. The study identified 71 miRNAs, of which 20 were expressed differently in AR (12 increased and eight reduced) than in the setting of normal renal function (32). Of the miRNAs identified, only miR-210 exhibited increased expression in the tissues of patients with AR, but the magnitude of this increase,

which was similar to that observed in the present study, did not reach statistical significance. Lorenzen et al. analyzed miR-210 as a potential urinary biomarker of T cell-mediated AR, finding that levels of this miRNA were significantly lower in patients with AR as compared with stable patients and returned to baseline levels after treatment of rejection (33). The authors speculated that hypoxia during AR could lead to retention of miRNA in tissues, with increased expression and, consequently, decreased clearance into urine. This hypothesis is consistent with the behavior observed in the present study (a trend toward increased expression in tissue and decreased recovery from urine in the AR group than in patients with other causes of dysfunction).

Furthermore, the differences between the compartments tested in this study bear stressing. Research has shown that miRNAs can exit cells through exosomes and be transported in body fluids to other compartments, where they may act as local regulators (34, 35). In the Lorenzen et al. study (33), it is unclear whether miR-210 levels were measured after extraction from urine or in urinary sediment. This might explain why the present study reached similar but statistically nonsignificant results.

miRNA 155 is involved in the differentiation of T cells into the Th1 and Th2 phenotype subpopulations and, consequently, in the production of interferon- $\gamma$  and IL-2; a decrease in miR-155 expression correlates with a reduction in IL-2 production (36, 37) The present study found increased transcription of this miRNA in the renal tissue of patients in the AR group, and a decrease in its expression in noninvasive compartments. Anglicheau et al. investigated the association between AR and changes in miRNA expression in

renal graft samples and evaluated whether patterns of intra-graft miRNA expression were sufficient to diagnose AR and predict renal function. The authors reported that, of 365 miRNAs initially screened, 17 exhibited significant differences between the AR and normal groups, including the miRNAs miR-142-3p and miR-155 (18). Furthermore, Wilflingseder et al. investigated miR-155 in patients with AR and found that its expression distinguishes patients with antibody-mediated AR from those with early graft dysfunction (38). These findings differ from those of the present study. The reasons for this discrepancy are not entirely clear; however, concomitant occurrence of cell-mediated and antibody-mediated rejection in the AR group of the present study may have influenced outcomes, as a previous study demonstrated that no differential expression of this miRNA is observed in antibody-mediated rejection. Another possibility is that different immunosuppressant therapy schemes may interfere with the molecular expression of this miRNA. This is an essential aspect of validation of any biomarker in organ transplant recipients. Another potential confounder was the use of medications for blood pressure control. As miR-155 plays a regulatory role in expression of the angiotensin II receptor type 1, the use of antihypertensive medications that act on the angiotensin pathway may influence expression of this marker (39).

miR-142-3p exhibits substantial specificity for the hematopoietic cell lineages whose components infiltrate graft tissue both during rejection and in regulatory processes. Therefore, an increase in local expression of this miRNA is to be expected (40). The transcription factor FoxP3 has been established as one of the mediators of transcriptional repression of miR-142-3p, and increases

in the expression of this gene are associated with AR, potentially leading to decreased expression of miR142-3p (3, 32, 41). In the present study, expression of this miRNA in peripheral blood was significantly reduced among AR patients as compared with the OD group. miR142-3p has been assessed in other studies of renal transplant recipients. Danger et al. assessed the miRNA expression profile in peripheral blood mononuclear cells in patients with antibody-mediated chronic rejection, and found that expression of 142-5p (the 5' arm of miR-142) was significantly increased in the chronic rejection group, whereas in the AR group, its expression was no different from that seen in patients with stable graft function. The authors also found that expression in the AR group was similar to that observed in a control group of non-immunosuppressed patients, thus suggesting that this marker is not influenced by immunosuppressant therapy (24). In the present study, patients with chronic rejection were included in a mixed group of patients with non-AR causes of graft dysfunction. In view of the findings of Danger et al., in which only the diagnoses of chronic rejection and acute rejection were included, this miRNA could not be assessed as a potential biomarker of chronic rejection; however, the results presented herein reinforce the finding that its expression is not significantly altered during episodes of AR.

Ben-Dov et al. analyzed miR142-3p in renal tissue in an attempt to distinguish patients with IF/TA. They found that expression of this miRNA was higher in this population than among normal patients (42). Scian et al. analyzed urinary and tissue markers and found a significant increase in miR-142-3p expression in patients with CR (43). These results are consistent with the

findings of the present study. Although we did not observe any significant increase in miR-142-3p in peripheral compartments in the OD group (which included patients with IF/TA and those with CR) on comparison with the control group, we did find a statistically significant increase in the intensity of its transcription on comparison with the AR group and – highlighting the specificity of this marker for hematopoietic lineage cells – in compartments other than peripheral blood, suggesting a prior increase in its expression in blood (43).

Although a miRNA panel capable of distinguishing among the various etiologies of dysfunction that can affect renal allografts has yet to be established, we identified miR-142-3p as a potential biomarker for distinguishing between AR and other types of dysfunction. Despite substantial divergence in the literature, miR-155 and miR-210 have established importance and known involvement in graft maintenance. Further studies are required to elucidate the mechanisms of these biomarkers and the potential influence of immunosuppressant agents on their transcription. Furthermore, technical aspects such as the absence of a validated endogenous control for miRNAs have hindered advancement in this field.

**Acknowledgements:**

Financial support for this study was provided by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) through universal grant MCTI/CNPQ No. 14/2012, the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research and Event Incentive Fund (FIPE-HCPA), and the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Nephrology Research Fund. TD was the recipient of a Master's

grant from the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). RCM is a CNPq Research Productivity Fellow.

**Conflict of Interest Statement:**

The authors declare they have no conflicts of interest.

## References

1. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Port FK, Arndorfer JA, Cibrik DM, Kaplan B. Survival improvement among patients with end-stage renal disease: trends over time for transplant recipients and wait-listed patients. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(6):1293-6.
2. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med.* 2010;363(15):1451-62.
3. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med.* 2005;353(22):2342-51.
4. Gupta G, Womer KL. Profile of belatacept and its potential role in prevention of graft rejection following renal transplantation. *Drug Des Devel Ther.* 2010;4:375-82.
5. Geddes CC, Woo YM, Jardine AG. The impact of delayed graft function on the long-term outcome of renal transplantation. *J Nephrol.* 2002;15(1):17-21.
6. Spiegel JC, Lorenzen JM, Thum T. Role of microRNAs in immunity and organ transplantation. *Expert Rev Mol Med.* 2011;13:e37.
7. Recipients SRoT. OPTN/SRTR 2011 Annual Data Report: Kidney [http://srtr.transplant.hrsa.gov/annual\\_reports/2011/pdf/01\\_kidney\\_12.pdf2011](http://srtr.transplant.hrsa.gov/annual_reports/2011/pdf/01_kidney_12.pdf2011) [cited 2013 06 de novembro].
8. Girlanda R, Kirk AD. Frontiers in nephrology: immune tolerance to allografts in humans. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(8):2242-51.
9. Gwinner W. Renal transplant rejection markers. *World J Urol.* 2007;25(5):445-55.
10. Walsh PT, Strom TB, Turka LA. Routes to transplant tolerance versus rejection; the role of cytokines. *Immunity.* 2004;20(2):121-31.
11. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2007;8(4):345-50.
12. Suthanthiran M. Human renal allograft rejection: molecular characterization. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13 Suppl 1:21-4.

13. Nield GN, Rudge CJ. Acute and chronic rejection. In: G TAAc, editor. *Immunology of Renal Transplantation*. 1 ed. London: Edward Arnold; 1993. p. 221-34.
14. Serón D, Alexopoulos E, Raftery MJ, Hartley RB, Cameron JS. Diagnosis of rejection in renal allograft biopsies using the presence of activated and proliferating cells. *Transplantation*. 1989;47(5):811-6.
15. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant*. 2008;8(4):753-60.
16. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-6.
17. Harris A, Krams SM, Martinez OM. MicroRNAs as immune regulators: implications for transplantation. *Am J Transplant*. 2010;10(4):713-9.
18. Anglicheau D, Sharma VK, Ding R, Hummel A, Snopkowski C, Dadhania D, et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(13):5330-5.
19. Hartono C, Muthukumar T, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of acute rejection of renal allografts. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15(1):35-41.
20. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(5):1604-9.
21. Sarma NJ, Tiriveedhi V, Ramachandran S, Crippin J, Chapman W, Mohanakumar T. Modulation of immune responses following solid organ transplantation by microRNA. *Exp Mol Pathol*. 2012;93(3):378-85.
22. Huang B, Zhao J, Lei Z, Shen S, Li D, Shen GX, et al. miR-142-3p restricts cAMP production in CD4+CD25- T cells and CD4+CD25+ TREG cells by targeting AC9 mRNA. *EMBO Rep*. 2009;10(2):180-5.
23. Risøe PK, Ryg U, Wang YY, Rutkovskiy A, Smedsrød B, Valen G, et al. Cecal ligation and puncture sepsis is associated with attenuated expression of adenylyl cyclase 9 and increased miR142-3p. *Shock*. 2011;36(4):390-5.
24. Danger R, Pallier A, Giral M, Martínez-Llordella M, Lozano JJ, Degauque N, et al. Upregulation of miR-142-3p in peripheral blood mononuclear cells of



operationally tolerant patients with a renal transplant. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(4):597-606.

25. Calame K. MicroRNA-155 function in B Cells. *Immunity*. 2007;27(6):825-7.

26. Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*. 2007;316(5824):604-8.

27. Huang X, Le QT, Giaccia AJ. MiR-210--micromanager of the hypoxia pathway. *Trends Mol Med*. 2010;16(5):230-7.

28. Luft FC. Merely miR210 in mesenchymal stem cells--one size fits all. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90(9):983-5.

29. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

30. Li JY, Yong TY, Michael MZ, Gleadle JM. Review: The role of microRNAs in kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. 2010;15(6):599-608.

31. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem*. 2008;283(23):15878-83.

32. Sui W, Dai Y, Huang Y, Lan H, Yan Q, Huang H. Microarray analysis of MicroRNA expression in acute rejection after renal transplantation. *Transpl Immunol*. 2008;19(1):81-5.

33. Lorenzen JM, Volkmann I, Fiedler J, Schmidt M, Scheffner I, Haller H, et al. Urinary miR-210 as a mediator of acute T-cell mediated rejection in renal allograft recipients. *Am J Transplant*. 2011;11(10):2221-7.

34. Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol*. 2009;11(9):1143-9.

35. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2010;31(22):2765-73.

36. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*. 2007;316(5824):608-11.
37. Banerjee A, Schambach F, DeJong CS, Hammond SM, Reiner SL. Micro-RNA-155 inhibits IFN-gamma signaling in CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. 2010;40(1):225-31.
38. Wilflingseder J, Regele H, Perco P, Kainz A, Soleiman A, Mühlbacher F, et al. miRNA profiling discriminates types of rejection and injury in human renal allografts. *Transplantation*. 2013;95(6):835-41.
39. Martin MM, Lee EJ, Buckenberger JA, Schmittgen TD, Elton TS. MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblasts. *J Biol Chem*. 2006;281(27):18277-84.
40. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*. 2004;303(5654):83-6.
41. Aquino-Dias EC, Joelsons G, da Silva DM, Berdichevski RH, Berdichewski RH, Ribeiro AR, et al. Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney Int*. 2008;73(7):877-84.
42. Ben-Dov IZ, Muthukumar T, Morozov P, Mueller FB, Tuschl T, Suthanthiran M. MicroRNA sequence profiles of human kidney allografts with or without tubulointerstitial fibrosis. *Transplantation*. 2012;94(11):1086-94.
43. Scian MJ, Maluf DG, David KG, Archer KJ, Suh JL, Wolen AR, et al. MicroRNA profiles in allograft tissues and paired urines associate with chronic allograft dysfunction with IF/TA. *Am J Transplant*. 2011;11(10):2110-22.

**Table 1.** Demographic profile of the sample.

	<b>AR (23)</b>	<b>OD (68)</b>	<b>P</b>
Age (years; mean $\pm$ SD)	41 $\pm$ 16	49 $\pm$ 13	0.024 <sup>a</sup>
Sex (male/female)	11/12	40/28	0.467 <sup>b</sup>
Race (white/nonwhite)	14/9	54/14	0.098 <sup>b</sup>
Donor (deceased/living)	17/6	56/12	0.152 <sup>b</sup>
Donor age (years; mean $\pm$ SD)	39 $\pm$ 18	45 $\pm$ 13	0.164 <sup>a</sup>
Donor sex (male/female)	11/12	39/29	0.474 <sup>b</sup>
Early graft dysfunction (yes/no)	19/4	49/18	0.415 <sup>b</sup>
HLA mismatches (A, B, DR; mean $\pm$ SD)	3.5 $\pm$ 1.4	3.3 $\pm$ 1.4	0.475 <sup>a</sup>
Last PRA (%; median [IQR])			
Class I	2.0 [0.0–11.0]	9.0 [0.0–27.7]	0.300 <sup>a</sup>
Class II	3.0 [0.0–22.0]	1.5 [0.0–24.0]	0.843 <sup>a</sup>
Initial immunosuppression (n)			0.483 <sup>b</sup>
No induction	5	8	
Rabbit anti-thymocyte globulin	7	26	
Basiliximab	11	34	
Cold ischemia time (h; mean $\pm$ SD)	17 $\pm$ 12	18 $\pm$ 10	0.900 <sup>a</sup>
Creatinine at biopsy (mg/dL; mean $\pm$ SD)	4.0 $\pm$ 1.8	4.0 $\pm$ 1.7	0.970 <sup>a</sup>
Time to biopsy (days; median [IQR])	15 [9–36]	25 [13–225]	0.030 <sup>a</sup>
Underlying renal disease			0.084 <sup>b</sup>
Unknown	6	12	
HTN	3	24	
HTN + DM	1	3	
DM	2	10	
ADPKD	3	2	
Other	8	16	

SD = standard deviation; HLA = human leukocyte antigen; HTN = hypertension; DM = diabetes mellitus;  
ADPKD = autosomal dominant polycystic kidney disease

a - Mann-Whitney *U* test for independent samples

b – Pearson's chi-square/Fisher's exact test

**Table 2.** miRNA expression\*.

	AR (n=23)	OD (n=66)	P-value
<b>Tissue</b>			
miR-142-3p	17.90 [1.50–43.76]	8.66 [1.12–40.80]	0.137
miR-155	1.36 [0.57–2.94]	0.65 [0.26–2.50]	0.270
miR-210	2.30 [0.31–10.84]	1.28 [0.36–6.07]	0.819
	AR (n=23)	OD (n=67)	
<b>Blood</b>			
miR-142-3p	1.30 [0.47–1.84]	2.39 [1.06–5.82]	0.010
miR-155	0.61 [0.43–1.04]	1.03 [0.51–2.06]	0.109
miR-210	1.30 [0.71–3.42]	2.94 [0.78–13.21]	0.207
	AR (n=22)	OD (n=53)	
<b>Urine</b>			
miR-142-3p	8.95 [0.30–38.15]	8.00 [0.46–80.28]	0.292
miR-155	1.45 [0.37–15.97]	2.46 [0.30–7.65]	0.722
miR-210	2.56 [0.61–20.19]	3.24 [0.61–14.89]	0.430

\*Median [IQR]

P-values determined by Kruskal–Wallis/Mann–Whitney *U* test

Figure 1.

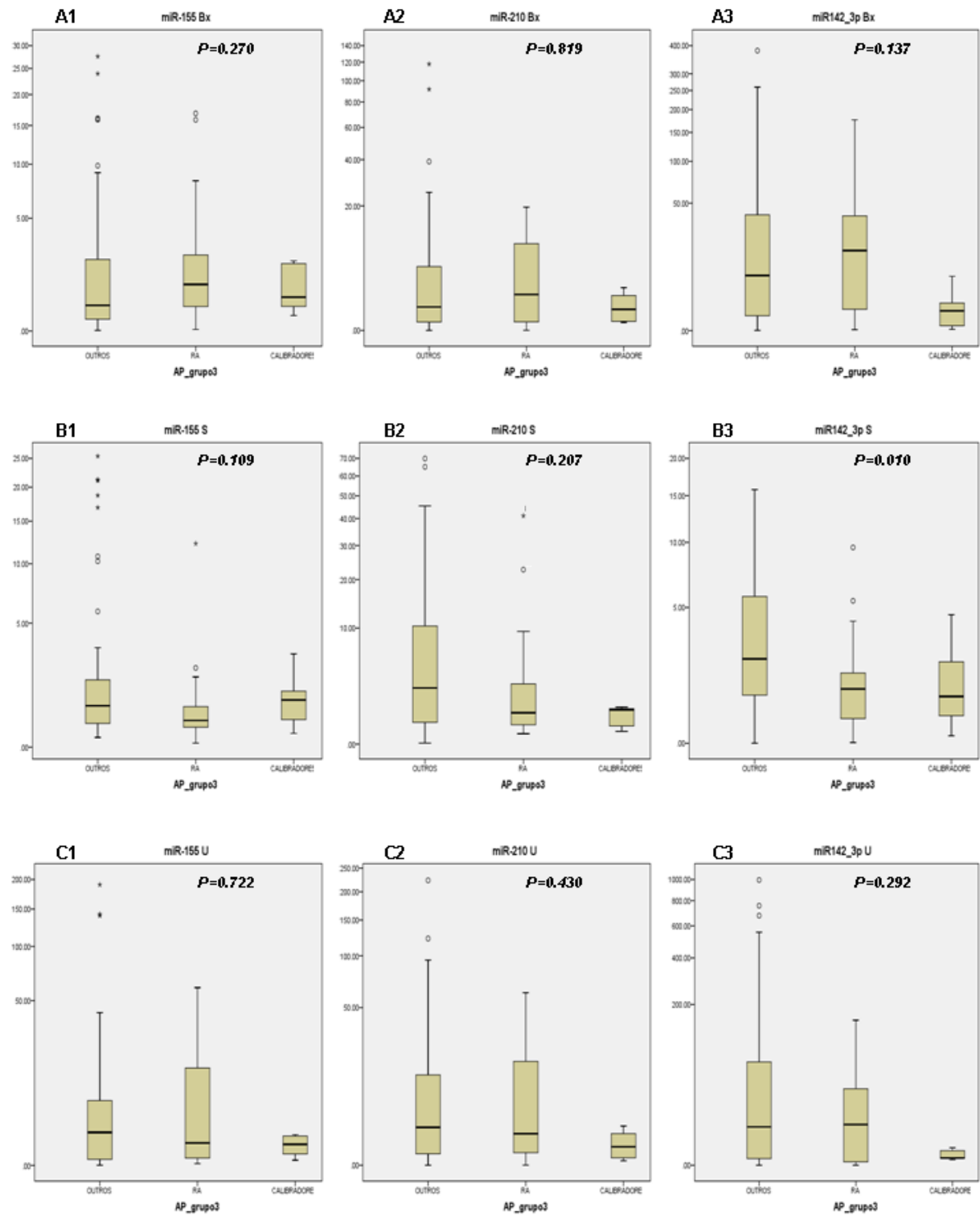
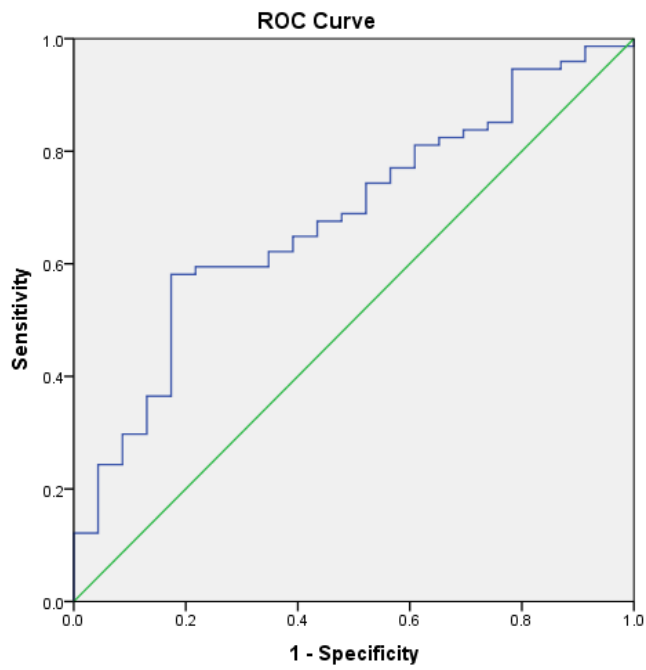


Figure 2.



## Figure legends

### Figure 1. Expression of target miRNAs.

Expression of the miRNAs miR-155, miR-210, and miR-142-3p in the different study groups. **A:** expression in tissue; **B:** expression in blood; **C:** expression in urinary sediment.

### Figure 2. ROC curve of miR142-3p in peripheral blood.

ROC curve plotted from miR-142-3p expression values in peripheral blood.

## **6. Considerações finais**

A pesquisa por biomarcadores não invasivos que reflitam os eventos intra-enxerto abre importantes oportunidades diagnósticas e prognósticas, principalmente. No presente estudo avaliamos três miRNAs que, de acordo com dados da literatura, poderiam ser marcadores diagnósticos para a RA de transplantes renais.

Para esta avaliação dividiu-se os pacientes em dois grupos, de acordo com o diagnóstico estabelecido, um grupo incluiu os casos de rejeição aguda e o outro grupo incluiu todas as outras causas de disfunção do enxerto. Avaliou-se os alvos miR-142-3p, miR-155 e miR-210 no sangue periférico, sedimento urinário e tecido de enxerto renal, dos alvos analisados, observou-se uma diferença estatisticamente significativa na expressão do miR142-3p no sangue, estando este mais expresso no grupo de pacientes com outras disfunções do que no grupo com rejeição aguda ( $P < 0,05$ ). A partir desse marcador foi gerada a curva ROC sendo observada uma área sob a curva de 0,68 (IC 95%: 0,56 - 0,80).

Este marcador apresenta considerável especificidade para as linhagens hematopoiéticas cujos componentes infiltram os enxertos tanto nos processos de rejeição quanto nos processos regulatórios e seu aumento em compartimentos que não o sangue periférico reflete a influência de células hematopoiéticas nesses locais.

Apesar de ainda não ter sido estabelecido um perfil de miRNAs capaz de diferenciar as diversas disfunções que possam acometer os enxertos renais nós identificamos o miR-142-3p como um biomarcador em potencial para diferenciar pacientes com outras disfunções de pacientes com rejeição aguda. Os demais alvos testados, miR-155 e miR-210 não apresentaram resultados estatisticamente relevantes porém, apesar da considerável divergência na literatura, tem reconhecida sua importância na manutenção dos enxertos. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos desses marcadores e a influência de fármacos imunossupressores sobre sua transcrição. Além disso,



aspectos técnicos como a ausência de um controle endógeno validado para miRNAs tem dificultado o avanço nessa área.

## 7. Anexos

### Ficha de coleta de dados:

<b>Nome do Receptor:</b>	Prontuário: _____	
HLA: A: __, __ B: __, __ DR: __, __ DQ: __, __		
Idade no transplante:	Doença Básica:	
Data do início da diálise:	Data do transplante:	Data da Bx:
Co-morbidades ( ) Hepatite ( ) HAS ( ) Vasculopatia		
Esquema imunossupressor no inicial:		
PRA última: _____	PRA pico: _____	CMV: _____ EBV: _____ HTLV I: _____
DM pré-Tx: ( ) sim ( ) não	DM pós-Tx: ( ) sim ( ) não	
<b>No momento da coleta dos materiais biológicos/biópsia:</b>		
Esquema imunossupressor na data da biópsia:		
Uréia:	Creatinina:	MDRD:
IPC: ___ ou proteinúria de 24h: ___		
Níveis séricos: ( ) CyA: ___ ( ) Tacrolimus: ___ ( ) Rapamicina ___		
Colesterol total: ___ HDL: ___ LDL: ___ Triglicerídeos: ___ Glicose: ___		
Cálcio: ___ Fósforo: ___ PTH: ___		
Ht: ___ Hb: ___	Leucócitos totais: ___	Plaquetas: ___
AST: ___	ALT: ___	
DSA: ( ) Sim ( ) Não	C4d+: ( ) Sim ( ) Não	
Rejeição aguda: ( ) Sim ( ) Não; Banff _____ (acrescentar verso se RA > 1 episódio)		

<b>Doador:</b>		
<input type="checkbox"/> Vivo <input type="checkbox"/> Falecido <b>Critérios Espandidos:</b> <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Idade do doador:	Raça: ____	Causa do óbito:
Co-morbidades	<input type="checkbox"/> Hepatite	<input type="checkbox"/> HAS <input type="checkbox"/> Vasculopatia
Creatinina inicial: ____ Creatinina na retirada dos órgãos: ____		
HLA: __, __ __, __ __, __ __, __, __		Biópsia: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Resultado: _____
CMV: ____ EBV: ____ HTLV I: ____		
<b>Expressão Gênica:</b>		
	Tecido Renal	Sangue      Urina
miRNA-155		
miRNA-210		
miR-142-3p		
<b>Observações:</b>		
1.		
2.		
3.		

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:****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 será elaborado com o objetivo de identificar alterações renais relacionadas ao seu transplante renal de forma a propiciar que no futuro se possa evitar a necessidade de realizar biópsias renais. Os procedimentos a que o (a) Sr (a) será submetido são uma coleta de sangue e uma coleta de urina. Adicionalmente em um pequeno fragmento de uma biópsia renal, indicada para o manejo do seu transplante, será examinada por técnicas utilizadas neste estudo. Estes materiais serão analisados no laboratório de biologia molecular do serviço de Nefrologia. As 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. A biópsia renal pode ter complicações (hematomas, sangramentos, necessidade de cirurgia e até mesmo a perda do rim transplantado) mas as biópsias só serão feitas por indicação clínica, ou seja, são as biópsias necessárias ao atendimento do seu transplante. Nenhum benefício financeiro será obtido na participação do presente estudo tanto para a unidade de transplante renal, quanto para o (a) Sr (a), mas sua ajuda será importante na pesquisa de tratamentos melhores para complicações associadas ao transplante renal 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 3359-8295, 3359-8121. Ainda em caso de urgências com o plantão da Nefrologia e Transplante do HCPA telefone 3359-8000.

Eu, \_\_\_\_\_ aceito 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;
- De que não terei despesas por participar do estudo.
- E que recebi uma cópia assinada deste termo.

Nome do pesquisador: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador  
que aplicou o termo