



**Mariana  
Ferreira  
Falcão**

**A urina como uma ferramenta para diagnóstico  
molecular de rejeição crónica mediada por  
anticorpos no transplante renal**

## **DECLARAÇÃO**

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos académicos.



**Mariana  
Ferreira  
Falcão**

**A urina como uma ferramenta para diagnóstico  
molecular de rejeição crónica mediada por  
anticorpos no transplante renal**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Rui Manuel Batista Alves e do Professor Doutor Luís Manuel Souto de Miranda do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho à minha família, em especial à minha mãe, Nídia Rodrigues Ferreira, por ser uma mãe excepcional e uma mulher incrível, cheia de vida, força, coragem, carácter e sabedoria, que sempre esteve ao meu lado e me ensinou a ser o melhor de mim.

## **O júri**

Presidente

Professor Doutor António José de Brito Fonseca Mendes Calado  
professor auxiliar da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira  
professora associada c/ agregação da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Luís Manuel Souto de Miranda  
professor auxiliar em regime laboral da Universidade de Aveiro

## **Agradecimentos**

Quero começar por agradecer ao Conselho Diretivo do Instituto Português do Sangue e da Transplantação de Coimbra pela oportunidade da realização do trabalho laboratorial.

Agradeço ao meu orientador Professor Doutor Rui Alves por toda a disponibilidade ao longo do ano. Agradeço também ao Professor Doutor Luís Souto por ter aceitado ser o meu orientador interno e pela ajuda ao longo do ano.

Sou profundamente grata a todos os colegas de laboratório com os quais tive o prazer de trabalhar e aprender, mas principalmente à Olívia Simões, Maria Jesus, Ana Sofia, José Manuel, Jeanette Braz, Rosário Mateus e à Doutora Albertina Freitas pelo conhecimento, gentileza e amizade.

Um especial e sincero agradecimento ao Doutor António Martinho pelo apoio, paciência e incentivo durante todo o projeto.

Agradeço também a toda a restante equipa do CSTC, bem como aos funcionários do Serviço de Patologia Clínica do CHUC e a todos os doentes transplantados que aceitaram fazer parte deste projeto.

Além disso, também quero agradecer a todos os meus amigos, em especial à minha colega de licenciatura, Joana Carvalho, pela amizade excepcional e apoio, bem como a duas outras pessoas que se tornaram parte crucial neste ano de mestrado, Bárbara Bastos e Vera Martinho, pela amizade, paciência e aventuras vividas.

Um agradecimento especial ao meu namorado, Tiago Alves, por todos os bons momentos, companheirismo e boa disposição ao longo de todo o ano.

Por fim, um enorme agradecimento aos meus familiares e parentes, em especial, à minha mãe, Nídia Ferreira, irmão, Daniel Falcão e madrinha, Sónia Ferreira, por toda a paciência e incentivo a nunca desistir ao longo de todo o projeto e ao longo da minha vida.

Um muito obrigado a todos os que contribuíram para a concretização deste projeto.

**Palavras-chave**

Transplantação renal, Rejeição crónica, Tolerância.

## Resumo

O transplante renal é o tratamento de eleição para doentes com insuficiência renal terminal. Geralmente, os pacientes que foram sujeitos a um transplante renal são capazes de viver mais do que aqueles que são tratados com diálise. Desde o nascimento do campo do transplante de órgãos, os avanços nas técnicas cirúrgicas e a introdução de novos agentes imunossupressores levaram a melhorias sustentadas nos resultados a curto e médio prazos.

No entanto, apesar dos progressos, o resultado a longo prazo dos órgãos transplantados permanece limitado pela rejeição crónica. A rejeição crónica é responsável pela deterioração lenta e gradual da função do enxerto.

Atualmente, a monitorização dos enxertos renais é realizada pela determinação da creatinina sanguínea, cujas variações não são específicas para rejeição, e pela análise da biópsia renal, que é um procedimento invasivo e só deteta a rejeição depois de instalada. Portanto, o desenvolvimento de testes não invasivos que possibilitem a identificação de biomarcadores moleculares de rejeição, pode levar, a uma identificação de um perfil de pré-rejeição que permita a intervenção precoce antes da disfunção do enxerto.

O objetivo deste trabalho foi identificar diferenças imunológicas significativas, a nível genético e celular, de doentes com rejeição crónica diagnosticada quando comparados com doentes que possuem uma função estável e normal do enxerto. Assim, numa avaliação prospetiva, constituíram parte integrante do estudo dois grupos de doentes: um com uma função normal do enxerto e outro com rejeição crónica mediada por anticorpos. Foram avaliadas as compatibilidades HLA de doentes e dadores, o perfil humoral e celular de doentes em amostras de sangue periférico e de urina.

Os dois grupos em estudo não apresentam diferenças nas incompatibilidades HLA, porém verifica-se uma relação positiva entre a presença de incompatibilidades HLA e a presença de anticorpos anti-HLA no soro, bem como presença destes anticorpos na urina.

Também a nível celular, foram encontradas diferenças, apesar de não significativas, ao nível da expressão de quatro genes, TGF- $\beta$ 1, IL-10, FoxP3 e IFN- $\alpha$ 1, nas cinco subpopulações celulares isoladas, quando comparada a sua expressão no sedimento urinário. Assim, este estudo permite concluir que a utilização da urina poderá constituir uma abordagem para avaliar a presença de anticorpos anti-HLA e de mediadores da resposta imune, não substituído, todavia, as avaliações séricas e histológicas usadas na monitorização funcional do transplante renal.



**Keywords**

Renal transplant, Chronic rejection, Tolerance.

## Abstract

Renal transplantation is the election treatment for patients with end-stage renal failure. Usually, patients who underwent a kidney transplantations are able to live longer than those who are treated with dialysis. Since the birth of the field of organ transplantation, the advances in surgical techniques and new immunosuppressive agents made improvements in the results in short and medium terms.

Although despite progress, the results in long term remain limited by chronic rejection. Chronic rejection is responsible for the slow graft deterioration.

Nowadays, monitoring of renal grafts is currently performed by determining the blood creatinine, whose variations are not specific for rejection, and renal biopsy, which is a invasive procedure and only detects rejection after becoming irreversible. So, the development of non-invasive tests that enable the identification of molecular rejection biomarkers may lead to the identification of pre-rejection profile that allow early intervention before the installation of graft dysfunction.

The objective of this study was to identify significant genetic and cellular immunological differences in patients with diagnosed chronic rejection compared with patients who have stable and normal graft function. Thus, in a prospective assessment, two patient groups were an integral part of the study: one with normal graft function and one with chronic antibody-mediated rejection. HLA compatibilities of patients and donors, humoral and cellular profile of patients in peripheral blood and urine samples were evaluated.

The two groups under study don't have differences in HLA incompatibilities, however there is a positive relation between the presence of HLA incompatibilities and the presence of antibodies anti-HLA in serum, as well as the presence of these antibodies in urine.

Also, at the cellular level, differences were found, although not significant, in the expression of four genes, TGF- $\beta$ 1, IL-10, FoxP3 and IFN- $\alpha$ 1, in the five isolated cell subpopulations, when compared to their expression in the urinary sediment. Thus, this study concludes that the use of urine may be an approach to evaluate the presence of anti-HLA antibodies and immune response mediators, but not the serum and histological evaluations used in the functional monitoring of renal transplantation.

## Índice

Índice de Figuras .....	I
Índice de Tabelas.....	II
Lista de Abreviaturas .....	III
1. Introdução .....	1
1.1. Sistema imunológico e transplantação .....	1
1.1.1. Tipos de transplante.....	2
1.1.2. Transplante renal.....	2
1.1.3. Rejeição do enxerto renal .....	3
1.1.4. Monitorização do enxerto renal.....	3
1.2. Complexo Major de Histocompatibilidade.....	4
1.3. Sistema imunológico .....	7
1.3.1. Papel das células T na rejeição.....	8
1.3.2. Vias direta e indireta de alorreconhecimento .....	9
1.3.3. Papel das células B na rejeição.....	12
1.4. Rejeição hiperaguda.....	13
1.5. Rejeição aguda.....	13
1.5.1. Rejeição aguda celular (mediada por linfócitos).....	13
1.5.2. Rejeição aguda humoral (mediada por anticorpos).....	14
1.6. Rejeição crónica .....	14
1.7. Tolerância.....	16
1.7.1. Acomodação .....	17
1.7.2. Imunossupressão.....	17
1.8. Biomarcadores .....	18
2. Objetivo .....	21
3. Métodos .....	23
3.1. Populações em estudo .....	23
3.2. Distribuição e tratamento das amostras de sangue periférico e urina.....	24
3.3. Processamento das amostras de sangue periférico .....	25
3.3.1. Extração de DNA.....	25
3.3.2. Separação de cinco subpopulações celulares no <i>cell sorter</i> FACS Aria II.....	26

3.3.3.	Extração de RNA das frações celulares .....	28
3.3.4.	Isolamento de soro das amostras de sangue.....	28
3.4.	Processamento das amostras de urina .....	28
3.4.1.	Extração de DNA de células do sedimento urinário .....	28
3.4.2.	Extração de RNA de células do sedimento urinário .....	29
3.5.	Avaliação da mistura celular e avaliação semi-quantitativa da proveniência das células no sedimento urinário.....	29
3.5.1.	Reação de amplificação .....	30
3.6.	Identificação de anticorpos anti-HLA de classe I e de classe II (LABscreen®) no soro	31
3.7.	Pesquisa de anticorpos anti-HLA de classe I e II (LABscreen®) na urina.....	32
3.8.	Quantificação relativa dos transcritos (mRNA) TGF-β1, IL-10, FoxP3 e IFN-α1 ....	33
3.8.1.	Síntese de cDNA a partir do mRNA total .....	33
3.8.2.	PCR em tempo real .....	34
3.8.3.	Normalização .....	36
3.9.	Análise estatística .....	37
4.	Resultados.....	39
4.1.	Aspetos demográficos e clínicos da população em estudo .....	39
4.2.	Incompatibilidades entre dador e recetor.....	40
4.3.	Pesquisa de anticorpos anti-HLA.....	41
4.3.1.	Pesquisa de anticorpos anti-HLA no soro .....	41
4.3.2.	Anticorpos anti-HLA vs. Incompatibilidades HLA .....	41
4.3.3.	Pesquisa de anticorpos anti-HLA na urina.....	43
4.3.4.	Comparação entre a pesquisa de anticorpos anti-HLA no soro e na urina	44
4.4.	Avaliação da mistura celular e avaliação semi-quantitativa da proveniência das células no sedimento urinário .....	45
4.5.	Quantificação relativa dos transcritos (mRNA) TGF-β1, IL-10, FoxP3 e IFN-α1	46
4.5.1.	Expressão génica nas subpopulações celulares .....	46
Gene TGF-β1 .....	46	

Gene IL-10.....	49
Gene FoxP3 .....	51
Gene IFN- $\alpha$ 1 .....	53
4.5.2. Expressão g�nica no sedimento urinário.....	54
Gene TGF- $\beta$ 1 .....	54
Gene IL-10.....	55
Gene FoxP3 .....	56
Gene IFN- $\alpha$ 1 .....	57
4.6. Expressão g�nica nas subpopula�es celulares vs. no sedimento urinário .....	58
5. Discussão .....	61
6. Conclusão .....	67
7. Referências .....	69

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Localização do complexo MHC no cromossoma 6 nos humanos (A) .....	5
<b>Figura 2:</b> Diagrama esquemático das moléculas MHC I e MHC II.....	6
<b>Figura 3:</b> Mecanismos envolvidos na ativação das células T.....	9
<b>Figura 4:</b> As três vias de aloreconhecimento por células T.....	10
<b>Figura 5:</b> Estádios da rejeição crônica.....	15
<b>Figura 6:</b> Esquema-resumo do processamento das amostras de sangue periférico e de urina .....	25
<b>Figura 7:</b> Imagem ilustrativa da detecção de anticorpos anti-HLA por fluorescência no LABScan™ 100 (Luminex®) .....	33
<b>Figura 8:</b> Imagem ilustrativa da homogeneidade da população.....	39
<b>Figura 9:</b> Boxplot da percentagem das células do dador (quimerismo celular) no sedimento urinário .....	46
<b>Figura 10:</b> Boxplot dos níveis de mRNA do TGF- $\beta$ 1 nas subpopulações celulares CD19 <sup>+</sup> /27 <sup>+</sup> (esquerda) e CD19 <sup>+</sup> /27 <sup>-</sup> (direita) .....	47
<b>Figura 11:</b> Boxplot dos níveis de mRNA do TGF- $\beta$ 1 nas subpopulações celulares CD4 <sup>+</sup> /25 <sup>+</sup> (esquerda), CD4 <sup>+</sup> /25 <sup>-</sup> (direita) e CD8 <sup>+</sup> (baixo).....	48
<b>Figura 12:</b> Boxplot dos níveis de mRNA da IL-10 nas subpopulações celulares CD19 <sup>+</sup> /27 <sup>+</sup> (esquerda) e CD19 <sup>+</sup> /27 <sup>-</sup> (direita).....	49
<b>Figura 13:</b> Boxplot dos níveis de mRNA da IL-10 nas subpopulações celulares nas subpopulações celulares CD4 <sup>+</sup> /25 <sup>+</sup> (esquerda), CD4 <sup>+</sup> /25 <sup>-</sup> (direita) e CD8 <sup>+</sup> (baixo) .....	50
<b>Figura 14:</b> Boxplot dos níveis de mRNA do FoxP3 nas subpopulações celulares CD4 <sup>+</sup> /25 <sup>+</sup> (esquerda), CD4 <sup>+</sup> /25 <sup>-</sup> (direita) e CD8 <sup>+</sup> (baixo) .....	52
<b>Figura 15:</b> Boxplot dos níveis de mRNA do FoxP3 nas subpopulações celulares CD4 <sup>+</sup> /25 <sup>+</sup> (esquerda), CD4 <sup>+</sup> /25 <sup>-</sup> (direita) e CD8 <sup>+</sup> (baixo) .....	53
<b>Figura 16:</b> Boxplot dos níveis de mRNA do TGF- $\beta$ 1 no sedimento urinário .....	55
<b>Figura 17:</b> Boxplot dos níveis de mRNA da IL-10 no sedimento urinário .....	56
<b>Figura 18:</b> Boxplot dos níveis de mRNA do FoxP3 no sedimento urinário .....	57
<b>Figura 19:</b> Boxplot dos níveis de mRNA do IFN- $\alpha$ 1 no sedimento urinário.....	58

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Resumo dos dados dos doentes estudados. Aspectos demográficos e clínicos de doentes de ambos os grupos de transplantados. ....	24
<b>Tabela 2:</b> <i>Primers</i> e respetivas sequências utilizadas na amplificação dos STRs e da amelogenina.....	30
<b>Tabela 3:</b> Programa de PCR utilizado na amplificação da amelogenina (55° C) e dos STRs (60° C).....	31
<b>Tabela 4:</b> Programa de RT-PCR usado na síntese de cDNA utilizando o kit <i>iScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription Supermix</i> (Bio-Rad). ....	34
<b>Tabela 5:</b> Lista dos genes de referência para cada um dos tipos de amostra, bem como dos genes de interesse estudados.....	35
<b>Tabela 6:</b> Programa de amplificação do PCR em tempo real.....	36
<b>Tabela 7:</b> Média e desvio-padrão das incompatibilidades entre dador e recetor para HLA de classe I e HLA de classe II.....	40
<b>Tabela 8:</b> Percentagem de anticorpos anti-HLA de classe I e de classe II obtida no soro dos dois grupos de transplantados estudados. ....	41
<b>Tabela 9:</b> Relação entre o número de doentes com incompatibilidades HLA de classe I e o número de doentes com anticorpos anti-HLA de classe I, bem como das respetivas percentagens, para cada um dos grupos de transplantados estudados.....	42
<b>Tabela 10:</b> Relação entre o número de doentes com incompatibilidades HLA de classe II e o número de doentes com anticorpos anti-HLA de classe II, bem como das respetivas percentagens, para cada um dos grupos de transplantados estudados.....	43
<b>Tabela 11:</b> Percentagem de anticorpos anti-HLA de classe I e de classe II obtida na urina dos dois grupos de transplantados estudados. ....	44
<b>Tabela 12:</b> Comparação da percentagem de anticorpos anti-HLA no soro e na urina. ....	45
<b>Tabela 13:</b> Tabela-resumo do aumento ou diminuição da expressão génica nas subpopulações celulares e no sedimento urinário para o grupo de rejeição crónica para cada um dos genes estudados, quando comparado com o valor dos níveis de expressão génica obtidos no grupo de função normal. ....	59

## Lista de Abreviaturas

% - Percentagem

18S rRNA - Subunidade ribossomal 18S

ACT $\beta$  -  $\beta$ -Actina

APC - *Allophycocyanin*

APCs - Células apresentadoras de antígenos

Bcl-2 - Proteína *B-cell lymphoma-leukemia 2*

Bcl-x1 - Proteína *B-cell lymphoma-extra large*

BCR - Recetor de células B

C4d - Produto da degradação do componente 4 (C4)

CCL3 - Quimiocina (motivo C-C) ligando 3

CCL5 - Quimiocina (motivo C-C) ligando 5

CCR2 - Recetor de quimiocina (motivo C-C) tipo 2

CCR3 - Recetor de quimiocina (motivo C-C) tipo 3

CCR5 - Recetor de quimiocina (motivo C-C) tipo 5

CCR7 - Recetor de quimiocina (motivo C-C) tipo 7

CD3 - *Cluster* de diferenciação 3

CD4 - *Cluster* de diferenciação 4

CD8 - *Cluster* de diferenciação 8

CD19 - *Cluster* de diferenciação 19

CD25 - *Cluster* de diferenciação 25

CD27 - *Cluster* de diferenciação 27

CD28 - *Cluster* de diferenciação 28

CD40 - *Cluster* de diferenciação 40

CD40L - Ligando do CD40

CD45 - *Cluster* de diferenciação 45

CD55 - *Cluster* de diferenciação 55

CD59 - *Cluster* de diferenciação 59

CD80 - *Cluster* de diferenciação 80

CD86 - *Cluster* de diferenciação 86

CD95 - *Cluster* de diferenciação 95

CD152 - *Cluster* de diferenciação 152



cDNA - DNA complementar  
CHUC - Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra  
CMV - Citomegalovírus  
CMVab - Anticorpo contra citomegalovírus  
Cp - *Crossing point*  
CsA - Ciclosporina  
CTL - Célula T citotóxica  
CTLA4 - Linfócito T citotóxico associado ao antígeno 4  
CXCL9 - Quimiocina (motivo C-X-C) ligando 9  
CXCL10 - Quimiocina (motivo C-X-C) ligando 10  
CXCL11 - Quimiocina (motivo C-X-C) ligando 11  
CxCR3 - Recetor de quimiocina (motivo C-X-C) tipo 3  
CYC - Citocromo C-1  
CYP3A4 - Citocromo P430 34A  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
dp - Desvio-padrão  
DSA - Antígeno específico do dador  
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético  
EVL - Everolimus  
FACS - Separação de células ativadas por fluorescência  
FasL - Ligando da proteína Fas  
FITC - *Fluorescein Isothiocyanate*  
FK506 - Tacrolimus  
FoxP3 - Fator de transcrição *forkhead box P3*  
GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase  
HLA - Antígenos leucocitários humanos  
HO-1 - Heme-oxigenase 1  
IFNA1 - Interferão alpha-1/13  
IL-2 - Interleucina 2  
IL-4 - Interleucina 4  
IL-10 - Interleucina 10  
IL-13 - Interleucina 13

IL-17 - Interleucina 17  
IL-18 - Interleucina 18  
IL-21 - Interleucina 21  
IL-22 - Interleucina 22  
IL-26 - Interleucina 26  
INF- $\gamma$  - Interferão gamma  
kD - Kilodalton  
mAb - Anticorpos monoclonais  
MHC - Complexo Major de Histocompatibilidade  
mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro  
mTOR - *Mammalian target of rapamycin*  
NGE - Expressão génica normalizada  
NH<sub>4</sub>Cl - Cloreto de amónio  
NK - Célula *natural killer*  
PB - *Pacific Blue*  
PBS - Tampão fostato salino  
PC5 - *Phycoerythrin Cyanin 5.1*  
PC7 - *Phycoerythrin Cyanin 7*  
PCR - Reação de polimerase em cadeia  
PE - *Phycoerythrin*  
PO/KRO - *Pacific Orange/Krome Orange*  
qPCR - PCR quantitativo  
QR - Quantidade relativa  
RNA - Ácido ribonucleico  
RT-PCR - *Reverse transcriptase PCR*  
SF3A1 - Subunidade 1 do fator de *splicing* 3a  
STRs - *Short Tandem Repeats*  
Tc - Célula T citotóxica  
TCR - Recetor de células T  
Tfh - Célula T auxiliadora folicular  
TGF- $\beta$ 1 - Fator de crescimento tumoral 1  
Th - Célula T auxiliadora

T<sub>m</sub> - Temperatura de *melting*

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral  $\alpha$

TNF- $\beta$  - Fator de necrose tumoral  $\beta$

Treg - Célula T reguladora

Tris-Cl - Hidrocloro 2-amino-2- (hidroximetil) propano-1,3-diol

## 1. Introdução

### 1.1. Sistema imunológico e transplantação

O sistema imunitário é um sistema de defesa que evoluiu no sentido de proteger o organismo de agentes infecciosos e microrganismos invasores. Em condições normais é capaz de recrutar uma enorme variedade de células, que apresentam a capacidade molecular de reconhecer e eliminar especificamente uma variedade aparentemente ilimitada de microrganismos. O sistema imunológico é capaz de distinguir entre moléculas estranhas e, as células e proteínas do próprio organismo, produzindo uma resposta imunológica, dividida em duas fases – reconhecimento e resposta. Destas fases é de realçar a especificidade característica do sistema reconhecimento, devido à sua capacidade de identificar diferenças químicas subtis, que lhe permite distinguir um patogénico estranho de outro (Kuby, Kindt, Osborne, & Goldsby, 2003).

Em imunologia, o termo transplantação refere-se ao ato de transferir órgãos, tecidos ou células de um local para outro, tendo como objetivo o tratamento de diversas doenças através da implantação de um órgão, tecido ou células saudáveis de um indivíduo (o dador) noutra que necessite de um transplante (o recetor). Os órgãos, tecidos ou células transplantados são designados de enxertos (Kuby et al., 2003).

Em 1902, Emerich Ullmann e Carrell realizaram, com sucesso, o primeiro transplante renal experimental em animais. Uma década após este experimento, Carrell afirmou que os esforços futuros no campo da transplantação devem ser "... direcionados para os métodos biológicos que impedirão a reação adversa do organismo contra o tecido estranho..." (Somasundaran & Quiroga, 2011). Somente em 1954, Joseph Murray, Jonh P. Merrill e J. Hartwell Harrison, realizaram com sucesso o primeiro transplante renal, em humanos, entre dois gémeos monozigóticos. Desde então, o número de descobertas e avanços na área têm vindo a progredir gradualmente (Dias & Camara, 2005).

O sucesso de um transplante está primeiramente relacionado com o desenvolvimento de técnicas cirúrgicas que permitem uma fácil e eficaz implantação dos órgãos, tecidos ou células num recetor. No entanto, ainda existem outras barreiras que precisam de ser ultrapassadas, nomeadamente a desproporção entre o número de pacientes que aguardam um transplante e o número de órgãos disponíveis para a transplantação, bem como a eficácia do

sistema imunológico, dado que este reconhece o enxerto como estranho e inicia uma série de eventos que poderão culminar na rejeição do mesmo em indivíduos que não são geneticamente idênticos (Kasiske, 1998; Kuby et al., 2003).

### **1.1.1. Tipos de transplante**

Existem diversos tipos de transplantes, sendo estes classificados de acordo com a origem e o destino dos enxertos. Os diferentes tipos de transplantes denominam-se de: a) autotransplante, no qual um enxerto do próprio é transferido de uma parte do corpo para outra; b) isotransplante, no qual o enxerto é transferido entre indivíduos geneticamente semelhantes (singénicos), como por exemplo, gémeos monozigóticos; c) alotransplante, no qual o enxerto é transferido entre indivíduos da mesma espécie mas geneticamente diferentes (alogénicos); d) xenotransplante no qual o enxerto é transferido entre indivíduos de espécies diferentes (xenogénicos) (Kuby et al., 2003).

O transplante provoca uma resposta imunológica que irá variar de acordo com a origem e o destino dos enxertos. Assim, no caso dos autotransplantes e isotransplantes (transplantes mais bem-sucedidos) a resposta imunológica é quase inexistente; no alotransplante, o enxerto pode ser reconhecido como estranho pelo recetor, levando à rejeição do mesmo; no caso dos xenotransplantes, há uma resposta imunológica de grande magnitude uma vez que existe uma grande diferença genética. Os dois últimos tipos de transplantes mencionados, provocam uma forte resposta imunológica dado que se encontram presentes no organismo do recetor, células do dador consideradas estranhas (Kuby et al., 2003; Male, Roth, & Roitt, 2006).

### **1.1.2. Transplante renal**

Os pacientes com insuficiência renal crónica terminal encontram-se perpetuamente dependentes de diálise. A fim de se ultrapassar esta condição, o transplante renal tornou-se o procedimento de eleição para o tratamento destes pacientes, oferecendo-lhes, deste modo, maior sobrevida e uma melhor qualidade de vida. A maior parte dos transplantes realizados são os alotransplantes, do qual, geralmente, se parte de um dador cadáver (Dias & Camara, 2005).

### **1.1.3. Rejeição do enxerto renal**

O processo de rejeição na transplantação pode ser definido como o tempo pós-transplante no qual a rejeição do enxerto ocorre, determinada com base nas características histopatológicas visíveis na biópsia do órgão transplantado. Desta forma, podem-se distinguir três tipos de rejeições: a rejeição hiperaguda, a rejeição aguda e a rejeição crónica (Arosa, Cardoso, & Pacheco, 2007).

A rejeição hiperaguda é a forma mais dramática de rejeição e, normalmente, ocorre minutos após a transplantação, de tal modo que o tecido transplantado nunca se torna vascularizado. A rejeição aguda pode subdividir-se em dois tipos – a rejeição aguda precoce e a rejeição aguda tardia. A rejeição aguda precoce, pode ocorrer até dez dias após o transplante; relativamente à rejeição aguda tardia, esta pode ocorrer até seis meses após o transplante, contudo, ambas se manifestam por inflamação do enxerto renal. Não existindo até à presente data nenhum tratamento para os tipos de rejeição aguda referidos, existem, no entanto, fármacos imunossuppressores que aumentam consideravelmente a sobrevivência do enxerto. No que respeita à rejeição crónica, esta pode ocorrer meses ou anos após o transplante e é o termo utilizado para a deterioração lenta do enxerto com conseqüente perda de função (Arosa et al., 2007; Kuby et al., 2003; Male et al., 2006).

### **1.1.4. Monitorização do enxerto renal**

Atualmente, a monitorização e avaliação da função dos enxertos renais é realizada pela medição dos níveis de creatinina sérica ou através de procedimentos invasivos, tais como as biópsias. Verifica-se que, em ambos os procedimentos, existem limitações. No caso da medição dos níveis de creatinina, estes níveis não são específicos da rejeição. A biópsia para além de ser um procedimento invasivo e doloroso, é dispendioso e pode ser sujeita a erros de amostragem, uma vez que neste procedimento se examina apenas um pequeno fragmento de tecido renal e os processos inflamatórios podem ser focais, podendo identificar, assim, apenas alterações patológicas em estados já avançados ou num estado de rejeição irreversível do enxerto renal. Desta forma, a utilização de métodos não invasivos, sensíveis e úteis na prática clínica, designados por biomarcadores, tem sido objeto de extensos estudos (Dias & Camara, 2005; Roedder, Vitalone, Khatri, & Sarwal, 2011).

A identificação de biomarcadores permite a compreensão dos mecanismos subjacentes, possibilitando a detecção de alterações patológicas a nível molecular, indicando precocemente possíveis danos no pós-transplante, sendo legítimo inferir que os biomarcadores possibilitam uma melhor previsão da probabilidade de sobrevivência do enxerto, bem como auxiliam no desenvolvimento de tratamentos da rejeição (Dias & Camara, 2005).

A importância de abordagens baseadas na melhoria da prática do transplante surge da necessidade de desenvolver metodologias mais sensíveis e específicas baseadas no perfil genotípico, transcripcional e proteómico dos dadores e dos recetores, de forma a detetar e diferenciar os estádios iniciais de rejeição (Roedder et al., 2011).

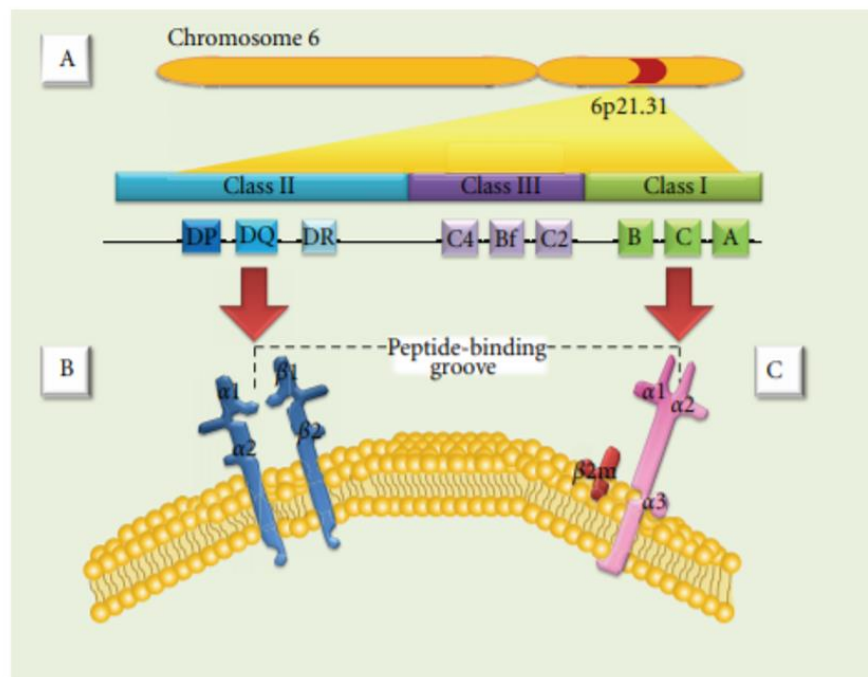
## **1.2. Complexo Major de Histocompatibilidade**

O Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC) é um *cluster* de genes organizados numa longa e contínua cadeia de ácido desoxirribonucleico (DNA), localizado no braço curto do cromossoma 6 (6p21.3). Em humanos, o MHC é referido como o sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*), tendo sido primeiramente descrito em 1940, quando se concluiu que um transplante resultava na criação de anticorpos contra antígenos leucocitários do dador (Batal et al., 2010; Chinen & Buckley, 2010; Kuby et al., 2003).

O Complexo Major de Histocompatibilidade tem um papel central no desenvolvimento da resposta imune, sendo responsável pelas reações mais vigorosas contra os órgãos transplantados. Os diversos antígenos que determinam a compatibilidade de órgãos, tecidos ou células são codificados por mais de 200 *loci*, dos quais, mais de 40 *loci* encontram-se no MHC (Ho et al., 2008; Kuby et al., 2003).

Estes genes do MHC encontram-se divididos em 3 classes – I, II e III, com base na sua distribuição, estrutura e função. Os genes do MHC de classe I e II codificam codominantemente os antígenos do sistema HLA. As moléculas do HLA são glicoproteínas membranares que formam complexos estáveis com péptidos antígenos. Os genes HLA de classe I encontram-se expressos na superfície da maior parte das células nucleadas. As proteínas por eles codificadas ligam péptidos processados pela célula e apresenta-os na superfície desta para reconhecimento por células T. Os genes HLA-A, HLA-B e HLA-C codificam uma única cadeia polipeptídica, a cadeia pesada  $\alpha$ , à qual está associada, na proteína

funcional, a  $\beta$ 2-microglobulina, codificada no cromossoma 15. As proteínas codificadas pelos genes HLA de classe II encontram-se expressas na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs), como é o caso dos macrófagos, dos linfócitos B e das células dendríticas, no entanto, estes também podem ser expressos e apresentados à superfície de outras células após um estímulo. Têm como função a apresentação de antígenos a células T auxiliaadoras (Th). Estas proteínas são constituídas por uma cadeia polipeptídica  $\alpha$  e uma  $\beta$ , codificadas, respetivamente, pelos genes A e B (DRA, DRB; DQA, DQB e DPA, DPB). Estas cadeias não estão ligadas covalentemente e formam heterodímeros estáveis com capacidade de apresentar péptidos processados às células T auxiliaadoras. Os genes MHC de classe III codificam vários componentes do sistema complemento, como proteínas, com funções imunológicas importantes e envolvidas no processo de inflamação (Figura 1) (Ayala García, González Yebra, López Flores, & Guaní Guerra, 2012; Chinen & Buckley, 2010).

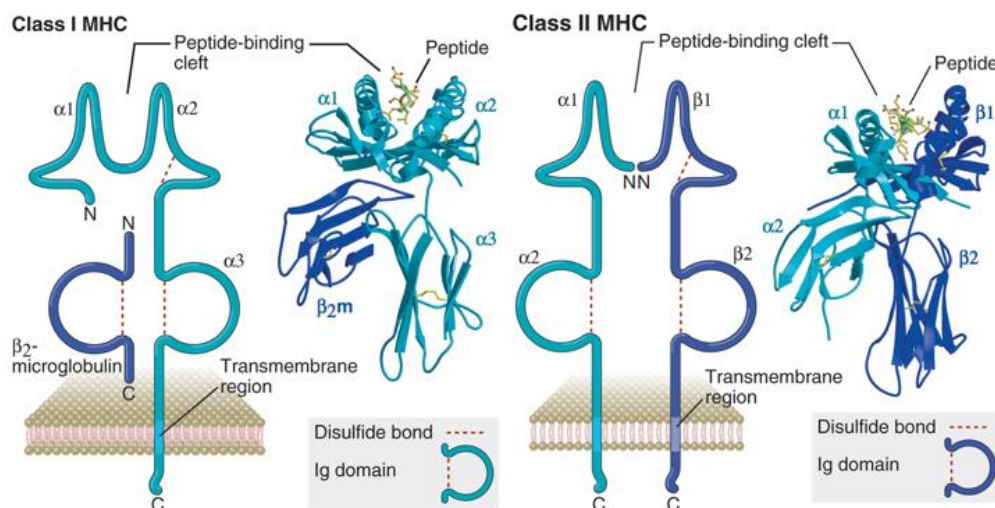


**Figura 1:** Localização do complexo MHC no cromossoma 6 nos humanos (A). Estes genes de classe I (C) e de classe II (B) encontram-se divididos de acordo com a estrutura, expressão e função que as moléculas por eles expressas desempenham. Imagem e legenda adaptadas de Ayala García et al., 2012.



A herança genética dos genes MHC segue as Lei de Mendel, sendo que cada indivíduo herda um grupo de alelos de cada progenitor, designado por haplótipo e, em virtude da sua proximidade, a probabilidade de ocorrer *crossing over* é reduzida. Para além disto, estes genes são codominantes, isto é, cada indivíduo expressa ambos os alelos herdados dos progenitores, maximizando o número de moléculas MHC disponíveis à superfície da célula (Kuby et al., 2003).

O MHC é altamente polimórfico, isto é, apresenta múltiplos alelos num *locus* genético específico. O elevado polimorfismo reflete-se na variabilidade estrutural das moléculas MHC, deste modo, a ligação de um péptido à molécula MHC depende, apenas, da natureza das cadeias laterais desse péptido e da complementaridade destas com a fenda de ligação da molécula MHC. As moléculas MHC I e MHC II apresentam uma única fenda de ligação, ou seja, são as variações na sequência de aminoácidos que fornecem a base estrutural para as diferenças na afinidade da ligação do péptido. Nas moléculas de classe I, o polimorfismo ocorre nos domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , enquanto nas moléculas de classe II este ocorre no domínio  $\beta 1$  do terminal amino do DR  $\beta 1$ , DQ  $\beta 1$  e DP  $\beta 1$  (Figura 2) (Ayala García et al., 2012; Marsh et al., 2010).



**Figura 2:** Diagrama esquemático das moléculas MHC I e MHC II. Representação dos domínios transmembranares, dos segmentos plasmáticos e da cauda citoplasmática, bem como a fenda de ligação formada pelos domínios mais distantes da membrana. Nas moléculas de classe I a fenda é formada pelos domínios  $\alpha 1$  e

$\alpha 2$ , enquanto que nas moléculas de classe II esta é formada pelos domínios  $\alpha 1$  e  $\beta 1$ . Imagem e legenda adaptadas de Abbas, Lichtman, & Pillai, 2011.

O sistema HLA e o seu polimorfismo permite a existência da identidade imunológica individual e um correto reconhecimento e apresentação de antígenos a células T. Assim, o sistema imune consegue, de forma eficaz, distinguir o próprio do não próprio. As moléculas HLA constituem a base da imunologia da transplantação visto que o elevado polimorfismo nas moléculas HLA contribui para as diferenças entre dador e recetor (Feucht & Opelz, 1996).

A expansão dos conhecimentos e o surgimento de novas técnicas e procedimentos, permitem, cada vez mais, alcançar uma maior compatibilidade entre dador e recetor (Sayegh & Carpenter, 2004).

### **1.3. Sistema imunológico**

O sistema imunitário pode ser dividido em dois tipos, de acordo com o padrão de resposta: a imunidade inata e a imunidade adaptativa. A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo e gera uma resposta rápida, não específica e sem memória. É representada pelas barreiras físicas, nomeadamente a pele, o muco, a saliva e o ácido do estômago, que param a infeção antes de entrar no organismo; e pelas barreiras celulares que incluem os monócitos, macrófagos, leucócitos granulócitos (neutrófilos) e as *natural killer cells* (NK), com capacidade de fagocitar organismos estranhos (Akira, Uematsu, & Takeuchi, 2006; Mason, 1998).

Ao contrário da imunidade inata, a imunidade adaptativa apresenta memória imunológica e uma resposta específica, é representada pelas células T (que medeiam a imunidade celular) e pelas células B (que medeiam a imunidade humoral). As células T diferenciam-se em células T supressoras, células T citotóxicas e células T auxiliadoras. As células B diferenciam-se em células B de memória e plasmócitos, os quais produzem anticorpos (Liaskou, Wilson, & Oo, 2012; Vivier & Malissen, 2005).

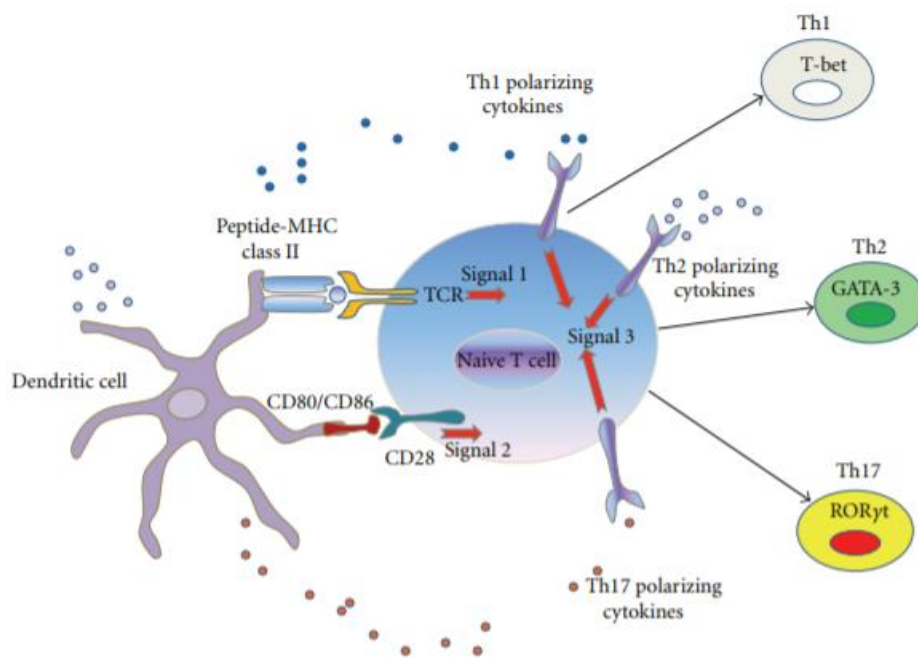
### 1.3.1. Papel das células T na rejeição

As células T são consideradas as células principais envolvidas na rejeição dos enxertos. As moléculas HLA expressas na superfície de células apresentadoras de antígenos ligam os péptidos antígenos, apresentando-os às células T e geram respostas policlonais das células T. Os antígenos expressos pelo dador, são denominados de aloantígenos e as diferenças entre dador e recetor são promotoras de aloreconhecimento e, conseqüentemente, da rejeição do enxerto (Huang et al., 2013).

A reação de rejeição consiste em duas fases: a fase de sensibilização e a fase efetora com segregação de citocinas. A fase de sensibilização inicia-se com o reconhecimento dos antígenos ligados às APCs, pelos recetores de células T (TCR), expressos na superfície das células T, iniciando, assim, a resposta imune mediada por células T (Dunkelberger & Song, 2010; Jr et al., 2001). O TCR é um heterodímero constituído por duas cadeias polipeptídicas  $\alpha$  e  $\beta$  ligadas por uma ponte dissulfeto que permite a formação do local de reconhecimento dos antígenos apresentados pelas moléculas HLA e que está associada com o complexo CD3. Assim, os recetores TCR-CD3 encontram-se divididos em duas populações distintas, uma que possui o marcador CD4 (células T CD4<sup>+</sup>), o qual induz respostas via células T auxiliadora (Th) e outra que possui o marcador CD8 (células T CD8<sup>+</sup>), o qual é predominantemente citotóxico (Tc). As células T CD4<sup>+</sup> reconhecem os antígenos associados a moléculas MHC II, enquanto que as células T CD8<sup>+</sup> reconhecem os antígenos associadas a moléculas MHC I. Considerando o exposto, a presença de CD4 ou CD8 restringe o tipo de células com as quais as células T podem interagir mas, normalmente, coexistem os dois tipos de resposta (Davis et al., 1998; Gujar & Lee, 2014).

Para ativar as células T e permitir a sua proliferação, é necessária a fase efetora seguida da segregação de citocinas. O segundo sinal co-estimulatório não é específico do antígeno, uma vez que várias moléculas das células T podem servir como recetores para sinais co-estimulatórios, como é o caso da molécula CD28, expressa em ambas as células T CD4 e T CD8. Este recetor é capaz de se ligar a duas moléculas: CD80 e CD86, expressas na superfície de APCs ativadas. A estimulação das células T por estas moléculas induz a expressão de uma molécula de superfície, o ligando CD40 (CD40L), que ao ligar ao CD40 induz a sobre expressão de CD80 e CD86, aumentando, deste modo, a eficácia da ativação das células T.

Por outro lado, existem moléculas que podem servir como recetores co-inibidores, como é o caso da CTLA4 (CD152), que, por ser estruturalmente semelhante ao CD28, liga CD80 e CD86, transmitindo um sinal inibitório, cessando, assim, a resposta imune (Huang et al., 2013; Manz, Jackson, Petit, Dustin, & Groves, 2011). Para além destes sinais, um último sinal é necessário para a ativação das células T, este consiste na segregação de citocinas inflamatórias, tais como a interleucina 2 (IL-2) e o interferão (INF)  $\alpha\beta$ , mais direcionado à ativação das células T CD4<sup>+</sup> (Figura 3) (Chakraborty & Weiss, 2014).



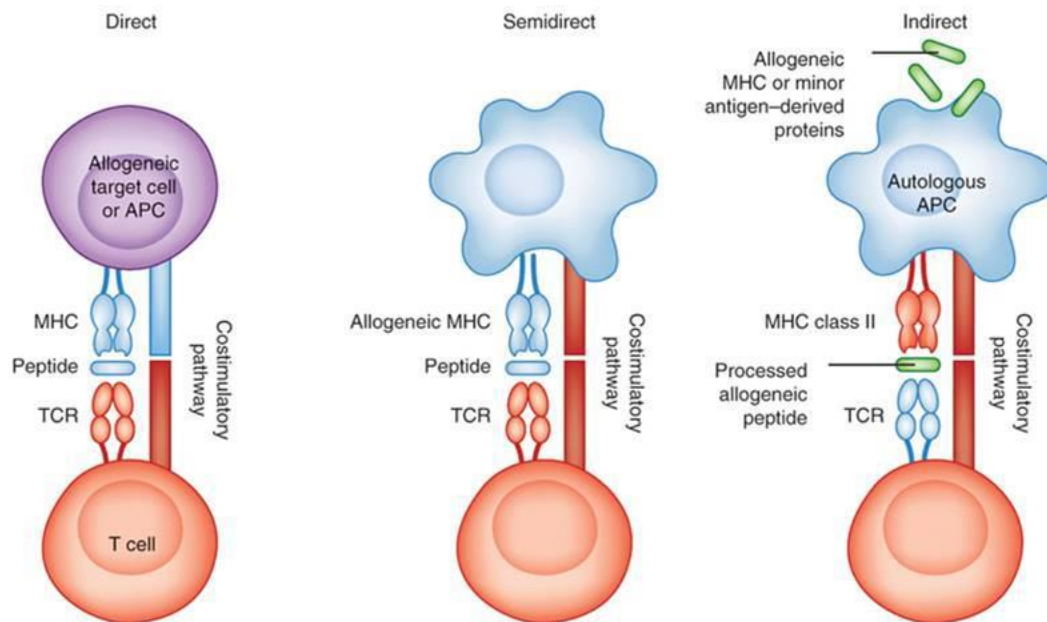
**Figura 3:** Mecanismos envolvidos na ativação das células T. Representação dos três sinais, a apresentação de antígenos pelas respetivas moléculas MHC e reconhecimento pelo TCR-CD3; a co-estimulação através da ligação de CD80 e CD86 ao CD28 das células T e a segregação de citocinas inflamatórias. Imagem e legenda adaptadas de Liaskou et al., 2012.

### 1.3.2. Vias direta e indireta de alorreconhecimento

O alorreconhecimento refere-se ao fenómeno pelo qual o sistema imune do recetor reage contra antígenos do dador, constituindo as células T o seu principal efetor. Estas células T aloreativas reconhecem os aloantígenos através de duas vias (não mutualmente exclusivas),

a via direta e a via indireta, levando a diferentes tipos de rejeição, à rejeição aguda e à rejeição crónica, respetivamente (Bharat & Mohanakumar, 2007).

A via direta envolve o reconhecimento de moléculas MHC, intactas, expressas nas APCs do dador. Estas são capazes de estimular diretamente as células T do recetor. As células apresentadoras de antígeno do dador (as células dendríticas, por exemplo) são capazes de estimular diretamente as células do doente. Por outro lado, a via indireta envolve a apresentação de antígenos do dador pelas APCs do recetor às células T. Para além destas duas vias, pode-se considerar uma terceira via, designada por via semidirecta e que se encontra interligada às vias anteriormente referidas. Nesta via as APCs do recetor adquirem as moléculas HLA do dador e apresentam-nas, intactas, às células T do recetor, desencadeando uma via que irá ao encontro da via direta (Figura 4) (Kamoun, 2001; Zakrzewski, van den Brink, & Hubbell, 2014).



**Figura 4:** As três vias de aloconhecimento por células T. Na via direta, as APCs do dador apresentam os aloantígenos a células T; na semi direta, as APCs do recetor apresentam os aloantígenos, sem modificação, às células T do recetor; e na via indireta, os péptidos antígenos das moléculas HLA do dador são apresentados por APCs do próprio às suas células T. Imagem e legenda adaptadas de Zakrzewski et al., 2014

As células T CD4<sup>+</sup> são alorreativas aos aloantígenos de classe II e as células T CD8<sup>+</sup> respondem aos aloantígenos de classe I. Deste modo, a via indireta ativa células CD4<sup>+</sup> naïve (Th) uma vez que o aloantígeno é apresentado por moléculas MHC de classe II. Por outro lado, a via direta pode ativar as células Th naïve ou as células T CD8<sup>+</sup> naïve, dependendo das moléculas de MHC que apresentam os péptidos antigénios (Hennecke & Wiley, 2001). Após o reconhecimento e interação das células Th com o complexo formado entre o MHC II e o péptido antigénio, a célula é ativada, tornando-se uma célula efetora, segregando, assim, diversas moléculas, como as citocinas, que apresentam um papel importante na ativação de outras células (Sayegh & Turka, 1998).

As células T CD8<sup>+</sup> naïve, após a apresentação de antigénios pelas moléculas MHC I, proliferam e diferenciam-se em células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas (CTLs), as quais libertam citocinas, principalmente IL2. A ativação das CTLs leva à formação de grânulos. Estes grânulos contêm enzimas proteolíticas, tais como as perforinas e as granzimas, que permitem, as primeiras, a formação de um poro na membrana da célula alvo, o que permite a entrada das granzimas, indutoras da morte celular por apoptose e necrose. Estes mecanismos de morte celular programada podem ser dependentes da ativação da via das caspases, principalmente da procaspase-3 ou da sobre expressão de recetor FasL (CD95) que interage com a molécula Fas nas células alvo (Jiang, Herrera, & Lechler, 2004; Lindahl & Wilson, 1977).

As células T CD4<sup>+</sup> naïve (Th), após a apresentação de antigénios pelas moléculas MHC, proliferam e diferenciam-se em diferentes tipos celulares da linhagem das células T auxiliaadoras, consoante o padrão de citocinas segregadas e com conseqüente resposta efetora distinta. Deste modo, podem diferenciar-se em células T 1 auxiliaadoras (Th1), T 2 auxiliaadoras (Th2), T 17 auxiliaadoras (Th17) ou T reguladoras (Treg). As células Th1 produzem o interferão gama (INF- $\gamma$ ), o fator de necrose tumoral  $\beta$  (TNF- $\beta$ ) e também elevadas quantidades de IL-2, que aumentam a capacidade citotóxicas das células T CD8<sup>+</sup>, conduzindo a uma resposta imune celular. As células Th2, que levam a uma resposta imune humoral, produzem diversos tipos de interleucinas, como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, favorecendo a produção de anticorpos, no entanto, as células Th1 e Th2 são geralmente definidas de acordo com a produção de INF- $\gamma$  e IL-4, respetivamente, visto que a síntese de IL-2, IL-6 e IL-10 não é específica de apenas uma dessas células (Brusselle, Joos, & Bracke, 2011; Talaat, Mohamed,

Bassyouni, & Raouf, 2015; Vukmanovic-Stejic, Vyas, Gorak-Stolinska, Noble, & Kemeny, 2000). Para além dos dois subtipos de células referidos anteriormente, as células T CD4<sup>+</sup> naïve podem diferenciar-se em células Th17, caracterizadas pela expressão do fator de transcrição ROR $\gamma$ t. Estas células produzem um conjunto de citocinas pró-inflamatórias potentes, tais como IL-21, IL-22, IL-26 e citocinas da família da IL-17, que são fortes indutores de inflamação, promovendo, assim, a infiltração celular e a produção de outras citocinas pró-inflamatórias. Por último, as células Treg apresentam a capacidade de produzir citocinas imunossupressoras, como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ 1, atuando numa rede complexa de mecanismos reguladores destinados a assegurar a modulação das respostas imunológicas frente a diversos antígenos e relacionadas, também, com o conceito de tolerância (Bradley, 2003; Brusselle et al., 2011; Talaat et al., 2015). Outros estudos têm revelado que o fator de transcrição *forkhead box P3* (FoxP3) parece ser crucial no desenvolvimento e função das células Treg CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>, este fator de crescimento é requerido por estas células para o seu desenvolvimento (Lima, 2006).

### **1.3.3. Papel das células B na rejeição**

A ativação das células B processa-se quando o antígeno liga ao recetor de células B (BCR) gerando um sinal que culminará na apresentação deste antígeno, pelas moléculas MHC II, às células T CD4<sup>+</sup>. A célula T auxiliadora folicular (Tfh) é um dos subtipos de células T auxiliaadoras necessárias para assistir na maturação das células B. As Tfh através da secreção de IL-21, promovem a proliferação e diferenciação das células B em células B de memória e em células produtoras de anticorpos, designadas por plasmócitos (Kuchen et al., 2007). Estes, produzem anticorpos específicos contra os antígenos do dador, condicionando, deste modo, a sobrevivência do enxerto (Gray, Gray, & Barr, 2007). Para além da produção de anticorpos, as células B influenciam a resposta das células T por vários mecanismos, tais como a apresentação de antígenos, a produção de citocinas e a co estimulação (Zeng et al., 2014).

## **1.4. Rejeição hiperaguda**

A rejeição hiperaguda ocorre minutos ou horas após o transplante. Este tipo de rejeição deve-se ao facto do doente se encontrar pré-sensibilizado, por possuir anticorpos contra os antígenos presentes no enxerto, estes são denominados de anticorpos específicos do dador (DSA) (Colvin, 2007). A ligação dos DSAs ao órgão transplantado, ativa o sistema complemento e bloqueia o fornecimento de sangue, contribuindo, significativamente, para a perda do órgão (Wood & Goto, 2012). Quando o paciente é exposto a células de outros indivíduos, como é o caso de uma gravidez, de um transplante anterior ou até de uma transfusão sanguínea, ocorre sensibilização pela formação de anticorpos anti-HLA de classe I e de classe II (Valenzuela & Reed, 2013).

## **1.5. Rejeição aguda**

### **1.5.1. Rejeição aguda celular (mediada por linfócitos)**

A rejeição aguda celular é mediada por linfócitos ativados pelo contacto com os antígenos do dador, estes antígenos estão presentes nas células dendríticas imaturas do órgão transplantado e migram para os gânglios linfáticos do recetor, sofrendo maturação. O reconhecimento destes antígenos, por parte do sistema imune do recetor, leva à ativação das células T naïve, com consequente diferenciação destas em células T CD4<sup>+</sup> e em células T CD8<sup>+</sup> (Franzese et al., 2013). Estas células mononucleares infiltram-se à volta dos túbulos e no espaço intersticial, libertam o conteúdo dos seus grânulos citotóxicos, tais como as granzimas e as perforinas, causando a morte celular do órgão transplantado. Outras citocinas e quimiocinas expressas na rejeição aguda compreendem o IFN- $\gamma$ , o TNF- $\alpha$ , o TNF- $\beta$  e o ligando da quimiocina 5 (CCL5) (Cornell, Smith, & Colvin, 2008).

A infiltração no epitélio tubular, de células T e macrófagos, também designada de tubulite, é uma característica da rejeição aguda que pode levar à rutura da membrana basal tubular, provocando disfunção do enxerto e perda tubular progressiva (Einecke et al., 2006). A presença de um grande número de transcritos de quimiocinas inflamatórias como CCL3, CCL5, CXCL9, CXCL10 e CXCL11, bem como os recetores de quimiocinas CCR5, CCR7 e CXCR3 nos enxertos, indica uma forte polarização em direção ao fenótipo Th1 das células T sobre o fenótipo Th2 (Lo et al., 2011).



A incidência da rejeição aguda é de aproximadamente 5-10% no primeiro ano, em pacientes não sensibilizados, uma vez que a maior parte da terapia se encontra dirigida às células T. Os pacientes com este tipo de rejeição desenvolvem um aumento abrupto de creatinina sérica, retenção de líquidos e, por vezes, febre e sensibilidade ao enxerto (Cornell et al., 2008).

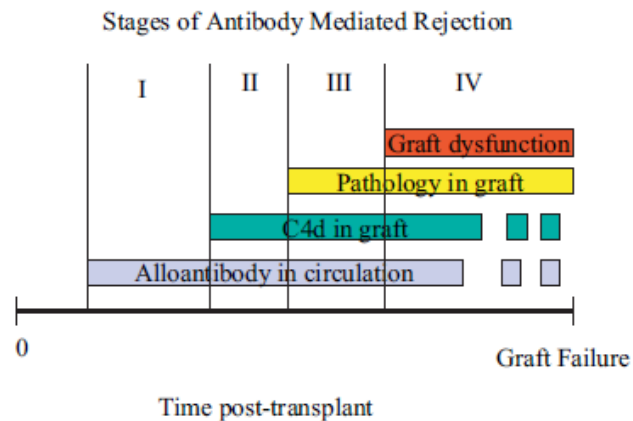
### **1.5.2. Rejeição aguda humoral (mediada por anticorpos)**

Na rejeição mediada por anticorpos ou rejeição humoral, 25% dos episódios devem-se à presença de anticorpos contra antígenos HLA do dador, sendo que os fatores de risco associados a esta rejeição incluem a pré-sensibilização e a diminuição da imunossupressão (Lorenz et al., 2004). A rejeição mediada por anticorpos ocorre mesmo sob condições de forte terapia de inibição de células T, o que pressupõe que pode haver rejeição humoral, com ou sem a componente da rejeição mediada pelas células T. Este tipo de rejeição é caracterizado pela presença de uma infiltração de anticorpos no rim transplantado, tendo como alvo as moléculas HLA do dador, o que resulta na ativação da cascata do complemento com libertação de citocinas e quimiocinas, assim como, a indução de moléculas de adesão. Esta resposta inflamatória provoca a agregação plaquetária, a infiltração e a acumulação de linfócitos, essencialmente neutrófilos e monócitos, no endotélio capilar peritubular e glomerular, contribuindo, deste modo, para lesões agudas como glomerulite e necrose dos vasos. Clinicamente, pacientes com este tipo de rejeição apresentam um rápido aumento dos níveis de creatinina (Colvin, 2007). Os episódios de rejeição aguda celular e de rejeição aguda humoral são mais frequentes em pacientes pré-sensibilizados contra antígenos HLA, comparativamente a pacientes não sensibilizados (Zachary & Leffell, 2010).

### **1.6. Rejeição crónica**

A rejeição crónica de aloenxertos renais pode ocorrer por mecanismos celulares, humorais ou ambos. A rejeição crónica mediada por anticorpos é um fator importante na perda de função tardia do enxerto e, por consequente, torna-se essencial a identificação dos anticorpos associados ao dano do enxerto, de forma a assegurar um tratamento apropriado (Lee, Park, Suh, Kim, & Moon, 2014). Assim, podem-se definir quatro estádios de rejeição

crónica, os quais compreendem a produção de aloanticorpos (estádio I), seguida da interação do aloanticorpo com o aloantígeno resultando na deposição do componente do complemento 4 (C4d) nos capilares peritubulares e possivelmente nos glomérulos (estádio II), o leva a alterações patológicas (estádio III), que, conseqüentemente, culminam na disfunção do enxerto (estádio IV) (Figura 5) (Colvin & Smith, 2005).



**Figura 5:** Estádios da rejeição crónica. Os estádios I e II compreendem a acomodação, o estágio III compreende a rejeição humoral subclínica e o estágio IV consiste na rejeição crónica com perda tardia da função renal. Imagem e legenda adaptadas de Colvin, 2007.

O C4d é um produto formado a partir da degradação do componente 4 (C4) da cascata do complemento durante a ativação da via clássica e da via da lectina do sistema complemento. Devido às ligações covalente fortes, que este produto estabelece em contacto com tecidos, pode ser considerado um bom biomarcador da resposta mediada por anticorpos e da ativação do complemento (Cohen et al., 2012). A acumulação de C4d no capilares peritubulares, identificado por imunohistoquímica ou imunofluorescência nas biópsias, é amplamente aceite como um marcador da rejeição crónica em doentes renais transplantados (Kurian et al., 2009).

As alterações crónicas podem ser vistas nos vasos dos glomérulos, túbulos e no interstício, o que provoca alterações histológicas, tais como distúrbios nos glomérulos, nas artérias e nos capilares peritubulares, bem como fibrose intersticial e atrofia tubular (Colvin, 2007).

## 1.7. Tolerância

A tolerância imunológica ocorre quando não se verifica uma resposta imune após transplante de um órgão ou tecido entre seres geneticamente distintos e na ausência de imunossupressão inespecífica (Manfro, Gonçalves, & Saitovitch, 1999; Rossini, Greiner, & Mordes, 1999).

Um dos objetivos centrais dos imunologistas tem sido a exploração de diversos mecanismos de *self-tolerance*, com a finalidade de induzir a tolerância específica a tecidos alogênicos, aquando a realização de um transplante (Priyadharshini, Greiner, & Brehm, 2012). A indução de tolerância a um largo número de antígenos pode ocorrer através de um mecanismo que pode ser central ou periférico. O mecanismo de tolerância central consiste na remoção das células T aloreativas, no timo, através da deleção clonal, impedindo a sua migração para os tecidos periféricos (Jones, Fluck, Mellor, Morris, & Wood, 1998). O mecanismo de tolerância periférica consiste na remoção das células T aloreativas maduras, que se encontram na periferia. Isto pode ocorrer através de três processos: deleção, anergia e regulação (Trivedi, 2007). A deleção das células T aloreativas, por apoptose, é desencadeada por ligandos, tais como TNF e FasL (CD95L) e também por diversas citocinas, tais como IL-4 e IL-10 (deleção das células T CD8<sup>+</sup> aloreativas) (Krammer, Arnold, & Lavrik, 2007). A anergia é um estado em que as células T se encontram refratárias à ativação, isto é, estas células não ligam antígenos, como consequência da ausência de co-estimulação. São também caracterizadas por não responderem a sinais de IL-2, tendo, por isso, uma produção residual desta citocina, e por apresentarem baixa expressão de TCR na membrana (Rossini et al., 1999). A regulação pelas células Treg CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>, mantém a homeostase imune e previne o desenvolvimento de autoimunidade, pela supressão das células T e do seu efeito nas APCs (Priyadharshini et al., 2012).

Tem-se demonstrado que o TGF-β1, a IL-10 e a IL-2 apresentam uma função crítica na regulação da ativação e da manutenção das funções imunossupressoras das células Treg (Franzese et al., 2013). A presença do TGF-β1, acompanhado por um aumento na expressão de FoxP3, promove a indução das células Treg, enquanto que a IL-10 está envolvida no aumento numérico e manutenção destas células através da redução da apresentação de antígenos, bem como da redução da expressão das moléculas estimulatórias CD80 e CD86

(Adalid-Peralta, Fragoso, Fleury, & Sciutto, 2011). As citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$  são críticas para se alcançar a sobrevivência do enxerto a longo prazo, sugerindo também que a indução da tolerância depende da estimulação dos linfócitos por aloantígenos (Konieczny et al., 1998). Deste modo, as células Treg exercem a sua ação supressora na proliferação e ativação das células T CD4<sup>+</sup> e das células T CD8<sup>+</sup>, por contacto célula-célula e secreção de citocinas, tais como IL-10 e TGF- $\beta$ 1 (Wood & Sakaguchi, 2003).

### **1.7.1. Acomodação**

A acomodação refere-se à condição sobre a qual um transplante apresenta uma função normal, com poucos ou nenhuns danos, apesar da presença de anticorpos anti-dador em circulação (Thaunat, 2012). Assim, a acomodação é vista como a aquisição de resistência, por parte do enxerto, ao dano humoral (Chang & Platt, 2009).

Os anticorpos anti-HLA reconhecem os péptidos antigénios e provocam respostas dependentes das células T, em contaste, os antigénios determinantes do sistema AB0 e a produção de anticorpos são mecanismos independentes das células T. Num transplante com incompatibilidade AB0, a acomodação é sugerida pela ausência de lesões no enxerto embora se verifique a deposição de C4d, o que indica a ativação da cascata do complemento (Hourmant, Figueres, Gicquel, Kimmel, & Garandeanu, 2019). Assim, a presença de C4d pode representar um marcador endotelial de regulação humoral (Thaunat, 2012).

O desenvolvimento e manutenção da acomodação ocorre através de dois mecanismos principais. O primeiro mecanismo compreende a expressão, através das células endoteliais, das moléculas anti-complemento CD55 e CD59, que diminuem a ativação de C5 e a formação do complexo de ataque à membrana. O segundo mecanismo consiste na expressão, pelas células endoteliais, dos genes protetores do endotélio, tais como o Bcl-2, o Bcl-x1 e a heme-oxigenase 1 (HO-1) (Hourmant et al., 2019).

### **1.7.2. Imunossupressão**

O atual sucesso da transplantação é, em grande parte, atribuído aos avanços na imunossupressão (M. A. Lim, Kohli, & Bloom, 2017). Esta pode ser alcançada através de métodos não específicos, como a redução do número total de linfócitos ou de métodos

específicos, como o bloqueio de vias de resposta linfocitária. Deste modo, o objetivo principal na imunossupressão assenta no efeito terapêutico com supressão da rejeição, ultrapassando as consequências da imunodeficiência e da toxicidade não imune (Halloran, 2004).

A Ciclosporina (CsA), um inibidor de calcineurina (ICN), bloqueia a produção de citocinas e INF- $\gamma$  pelas células T ativadas e inibe o citocromo P450 3A4 (CYP3A4) (Konieczny et al., 1998). O Tacrolimus (FK506) é também um inibidor de calcineurina muito semelhante à CsA, porém, com maior influência no desenvolvimento de diabetes pós-transplante (Halloran, 2004). Os inibidores de calcineurina bloqueiam a sinalização a jusante, iniciada pelo TCR no reconhecimento de antigénios. Isto resulta na supressão da produção de citocinas, maioritariamente IL-2 e num consequente enfraquecimento da resposta imune (Crane, Eltemamy, & Shoskes, 2019).

A quinase serina/treonina *mammalian target of rapamycin* (mTOR) é o regulador principal da síntese de proteínas, da proliferação e do metabolismo celular, apresentando um papel importante na regulação da homeostase e autofagia das células renais (Liu et al., 2018). O uso de inibidores de mTOR (ISP) nas células T, tais como o Everolimus (EVL), impede a diferenciação em Th1, Th2 e Th17, preservando apenas a diferenciação celular das Treg. Relativamente às células B, este inibidor tem a capacidade de diminuir drasticamente a produção de anticorpos (Fantus, Rogers, Grahammer, Huber, & Thomson, 2016).

A imunossupressão é baseada na interferência com o sistema imune, deste modo, um melhor entendimento dos processos imunológicos permite um redireccionamento da resposta imune a favor da aceitação do enxerto (Rossini et al., 1999).

## **1.8. Biomarcadores**

De entre os diversos biomarcadores encontram-se as citocinas e as quimiocinas. As citocinas são proteínas solúveis, de baixo peso molecular, produzidas em resposta a estímulos antigénicos, funcionando, assim, como mensageiros químicos na regulação do sistema imune. A designação de interleucina (IL) de algumas citocinas, deve-se ao facto de estas serem produzidas por linfócitos e atuarem nestes, ligando-se a recetores específicos de membrana nas células-alvo, desencadeando diversas vias de tradução de sinais, induzindo ou reprimindo a expressão génica (Pereira, Rezende, Teixeira Junior, Teixeira, & Simões e Silva, 2009). As

quimiocinas são polipéptidos de 8 a 12 kD, classificadas em CC, quando apresentam resíduos de cisteína adjacentes e como CXC, quando os resíduos de cisteína se encontram separados por um outro aminoácido (Abbas et al., 2011). As quimiocinas são citocinas com capacidade de exercer quimiotaxia nos outros linfócitos e células inflamatórias, desempenhando, desta forma um papel central na fisiologia leucocitária ao controlar o tráfego basal e inflamatório (Pereira et al., 2009).

Na indução da resposta inflamatória as APCs, os linfócitos T ativados e as NK, na presença de IL-2, IL-18 e TNF- $\alpha$ , levam ao aumento da produção de células Th1, no entanto, se estiverem presentes IL-4, IL-10 e IL-13, promovem um aumento da produção de Th2 (Cardoni, Prigoshin, Tambutti, & Ferraris, 2005). As células Th1 produzem IFN- $\gamma$ , que desencadeia a produção de CXCL10, por diversos tipos de células, provocando um *feedback* positivo, uma vez que este atrai e recruta outras células Th1. O CXCL10, ao ligar ao recetor CXCR3, induz a produção de citocinas pelas Th1 e reprime a produção de citocinas pelas Th2, assim, o IFN- $\gamma$ , ao induzir a produção das quimiocinas CXCL10, CXCL9 e CXCL11, desempenha um papel essencial no recrutamento de células T efectoras (Desvaux et al., 2004; Romagnani & Crescioli, 2012).

Deste modo, o TGF- $\beta$ 1, a IL-10, o FoxP3 e o IFN representam bons biomarcadores da função renal, bem como dos diversos tipos de rejeição (Sawitzki, Schlickeiser, Reinke, & Volk, 2011).



## 2. Objetivo

A rejeição crónica está entre as principais causas de disfunção e consequente perda do enxerto renal a longo prazo. Deste modo, o objetivo central deste trabalho assenta numa avaliação genética, genómica, celular e humoral de transplantados renais com função renal estável e transplantados com rejeição crónica renal.

Assim, avaliou-se, nos dois grupos em estudo:

- A presença de anticorpos anti-HLA no soro e na urina;
- O impacto das incompatibilidades HLA entre o dador e o doente transplantado;
- A proveniência das células e a sua quantificação relativa (do doente ou do dador) no sedimento urinário;
- A expressão diferencial de alguns genes, mediadores da resposta imune, em cinco subpopulações celulares separadas por *cell sorter* e nas células do sedimento urinário.





### **3. Métodos**

#### **3.1. Populações em estudo**

As amostras de urina e sangue necessárias à realização deste trabalho foram recolhidas, de forma prospetiva, de transplantados renais acompanhados periodicamente na Unidade de Transplantação Renal do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) que, de acordo com a função renal, foram, posteriormente, divididos em dois grupos: doentes com função renal estável e doentes com rejeição crónica.

Um total de 76 amostras de urina e sangue foram colhidas entre janeiro de 2019 e abril de 2019, com a colaboração da Unidade de Transplantação Renal (Tabela 1). O projeto foi submetido e aprovado pela comissão de ética do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

**Tabela 1:** Resumo dos dados dos doentes estudados. Aspetos demográficos e clínicos de doentes de ambos os grupos de transplantados.

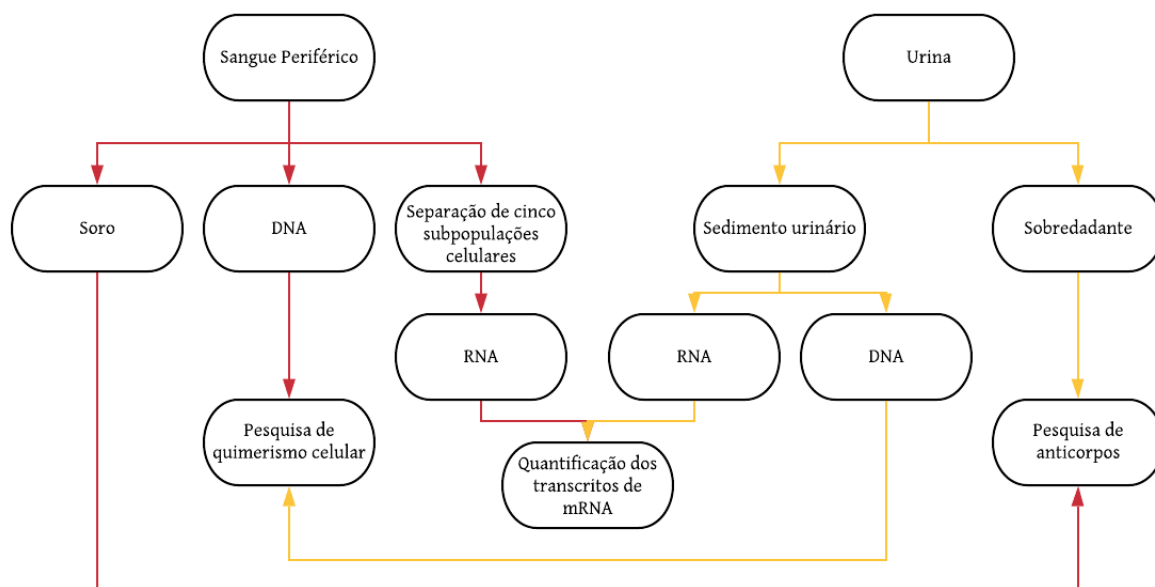
<b>Dados</b>	<b>Grupo FN (Função Normal) N=26</b>	<b>Grupo RC (Rejeição Crónica) N=50</b>
<b>Idade (anos; média ± dp)</b>	53,81±10,88	52,58±13,07
<b>Género (M/F)</b>	21/5	39/11
<b>PRA (%)</b>	[0-20%] – 15,38 [21-50%] – 84,38	[0-20%] – 92 [21-50%] – 8
<b>Imunossupressão ICN/ISP (%)</b>	ICN – 92,31 ISP – 7,69	ICN – 84 ISP – 16
<b>Creatinina (%)</b>	[<1,5 mg/dL] - 100 [>1,5 mg/dL] – 0	[<1,5 mg/dL] - 40 [>1,5 mg/dL] - 60
<b>Proteinúria (%)</b>	[<1,5 mg/dL] - 100 [>1,5 mg/dL] – 0	[<1,5 mg/dL] - 92 [>1,5 mg/dL] - 8
<b>Infeções-Positivo para CMVab (%)</b>	15,38	4
<b>Diabetes pós-transplante (%)</b>	3,85	18
<b>Episódio de rejeição aguda (%)</b>	0	16

**Legenda:** M – masculino; F – feminino; dp – desvio-padrão; PRA – *panel-reactive antibody*; ICN – inibidores de calcineurina; ISP – inibidores do sinal de proliferação/mTOR; CMVab – anticorpo contra citomegalovírus; mg – miligrama; dL – decilitro.

### 3.2. Distribuição e tratamento das amostras de sangue periférico e urina

As amostras de sangue periférico e de urina, recolhidas aos doentes aquando da vinda à consulta de avaliação periódica, foram tratadas, separadas e conservadas para, posteriormente, serem avaliadas em conjunto. Conforma se ilustra no esquema abaixo (Figura

6), a separação adequada do material biológico permitiu realizar: a pesquisa de anticorpos anti-HLA, a proveniência das células do sedimento urinário (doente e dador) e a quantificação dos transcritos de mRNA.



**Figura 6:** Esquema-resumo do processamento das amostras de sangue periférico e de urina. O esquema compreende o destino das amostras de soro, do DNA obtido a partir do sangue periférico, das frações celulares, do sedimento urinário e do sobrenadante da urina.

### 3.3. Processamento das amostras de sangue periférico

#### 3.3.1. Extração de DNA

O sangue periférico foi recolhido em tubos *vacuette*® EDTA, revestidos internamente por  $K_3EDTA$ , que atua como anticoagulante, quelando os íons de  $Ca^{2+}$ , interrompendo a cascata de coagulação, uma vez que esta necessita de  $Ca^{2+}$  para a sua ativação.

Procedeu-se à extração manual de DNA a partir de 200  $\mu L$  da amostra de sangue, de acordo com o protocolo do *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen®). Este protocolo baseia-se na extração e purificação do DNA presente nos leucócitos, através de colunas *QIAamp Mini*, constituídas por uma membrana de sílica, conjuntamente com a adição de proteases que irão digerir enzimaticamente as proteínas. O processo é composto por quatro passos básicos, a

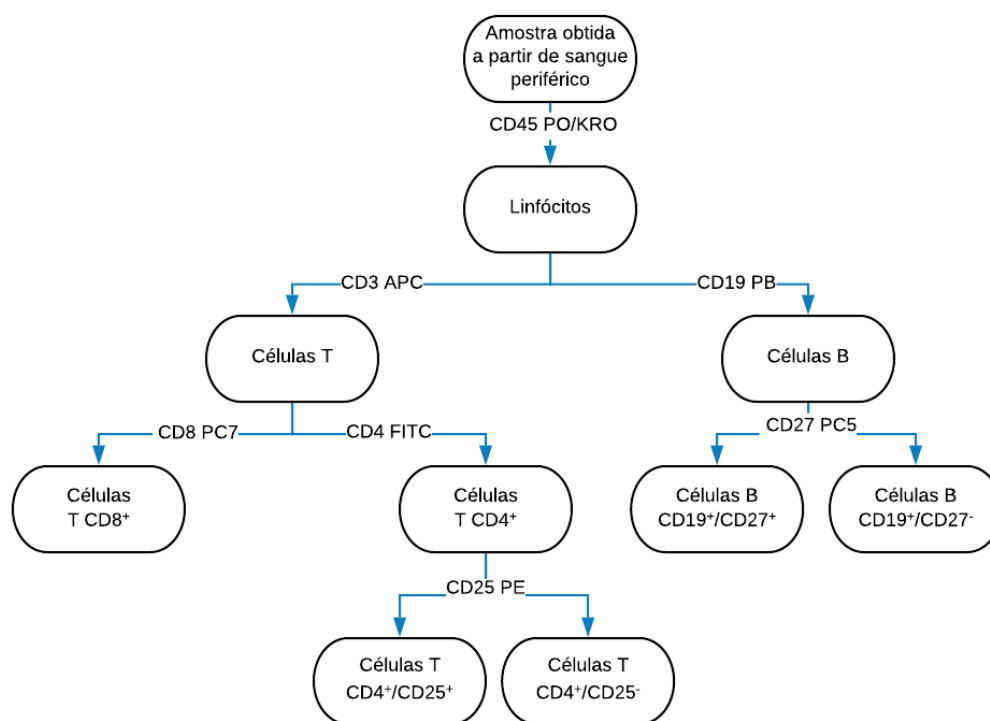
adição da proteinase K e do respetivo tampão de lise (AL), prosseguindo-se a uma breve incubação a 60° C, de modo a ativar a digestão enzimática. As condições de sais e de pH do tampão de lise asseguram a ligação do DNA à sílica da membrana e impedem a ligação de proteínas e outros contaminantes. Seguem-se duas centrifugações, com dois tampões de lavagem AW1 e AW2, de modo a eliminar os restantes contaminantes, aumentando assim a pureza do DNA. Por fim, o DNA é eluído em 100 µL de tampão AE (10 mM Tris-Cl; 0,5 mM EDTA; pH 9,0), quantificado e armazenado a 4 °C até utilização.

### **3.3.2. Separação de cinco subpopulações celulares no *cell sorter* FACS Aria II**

O sangue remanescente foi utilizado para a separação de cinco frações celulares: células B memória (CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>), células B naïve (CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>), células T reguladoras (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>), células T CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>-</sup>) e células T CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>).

A fim de separar estas populações, utilizou-se o separador celular FACS Aria II (Becton Dickinson, Bioscience). Esta abordagem permite a separação de células individuais com base nas suas propriedades físicas, tamanho e complexidade, e na fluorescência emitida após ligação específica com anticorpos monoclonais. A fim de purificar as células de interesse, estas são primeiramente expostas a anticorpos monoclonais (mAb), marcados com fluorocromos, que reconhecem e ligam marcadores de superfície específicos presentes na população desejada. Assim, as células em suspensão, marcadas, são separadas, através da incidência de um feixe de laser, com base na dispersão da luz e com base na emissão de fluorescência pela qual se encontram marcadas. Deste modo, o aparelho aplica uma carga para cada gota, contendo as células de uma subpopulação específica, separando-as em tubos de recolha apropriados. Para tal, a amostra de sangue foi centrifugada a 2 000 rpm por 5 minutos, de forma a se colher o *buffy coat*, rico em leucócitos, ao qual foi adicionado o lisante NH<sub>4</sub>Cl e incubou por 20 minutos, com agitação. De seguida, centrifugou-se a amostra a 1 500 rpm por 5 minutos, desprezou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* em 0,2 mL de PBS 1x e adicionaram-se os anticorpos monoclonais de interesse. Ao fim de 20 minutos de incubação, ao escuro, adicionou-se 2 mL de PBS 1x, centrifugou-se novamente a amostra a 1 500 rpm por 5 minutos, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 0,5 mL de PBS 1x.

A separação celular das populações marcadas foi realizada no citômetro de fluxo/cell sorter FACS Aria II (Becton Dickinson, Bioscience), usando o software de aquisição BD FACSDiva v6.1.3. Os anticorpos monoclonais usados, bem como os respectivos fluorocromos foram os seguintes: CD45 PO/KRO (*Pacific Orange/Krome Orange*) para isolar os linfócitos dos restantes componentes existentes; CD19 PB (*Pacific Blue*) para a separação das células B e CD27 PC5 (*Phycoerythrin Cyanin 5.1*) para isolar as subpopulações de células B de memória CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup> das células B naïve CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>; CD3 APC (*Allophycocyanin*) para a separação das células T, CD8 PC7 (*Phycoerythrin Cyanin 7*) para isolar a subpopulação de células T CD8<sup>+</sup>, CD4 FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*) para isolar as células T CD4<sup>+</sup> e CD25 PE (*Phycoerythrin*) para a separação das células T reguladoras CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> das células T CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>-</sup>. A sequência de marcação e separação celular está ilustrada no esquema seguinte:



Após a separação celular, cada fração celular foi centrifugada a 5 000 rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante e ressuspensão-se o *pellet* em 350 µL de tampão RLT com 10% de β-mercaptoetanol. O β-mercaptoetanol, por ser um agente redutor, quebra as pontes de dissulfeto das RNases, impedindo a degradação enzimática do RNA, agindo,

também, como um poderoso desnaturante de proteínas, devido à presença de tiocianato de guanidina. As amostras foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3.3. Extração de RNA das frações celulares**

As frações celulares congeladas em RLT foram previamente descongeladas em gelo e centrifugadas durante 3 minutos à velocidade máxima. Após a centrifugação, o sobrenadante (350  $\mu\text{L}$ ) foi colocado num tubo de 2 mL de forma a proceder à extração automatizada de RNA no equipamento *QIACube* (Qiagen®), de acordo com o protocolo de extração *RNeasy® Micro Kit* (Qiagen®). Este protocolo utiliza colunas *RNeasy MinElute* para extrair e purificar o RNA, eluindo-o em 14  $\mu\text{L}$  de água isenta de RNAses. As amostras foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3.4. Isolamento de soro das amostras de sangue**

O sangue foi recolhido em tubos *vacuette®* com gel e com revestimento de sílica, por fim de ativar a coagulação, que após uma centrifugação de 3 000 rpm por 10 minutos, permite a formação de uma barreira estável entre o soro e os restantes componentes sanguíneos. O soro foi posteriormente colocado em tubos de 1,5 mL e armazenados a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

## **3.4. Processamento das amostras de urina**

Retiraram-se cerca de 7 mL de urina recolhida em frascos coletores e centrifugaram-se a 3 500 rpm durante 25 minutos. Guardou-se o sobrenadante a  $-20^{\circ}\text{C}$ , em tubos de 2 mL. Ao *pellet* (sedimento urinário), foram adicionados 420  $\mu\text{L}$  de PBS 1x, dividindo-se por três tubos para diferentes análises futuras: 100  $\mu\text{L}$  para extração de DNA, 250  $\mu\text{L}$  para extração de RNA e 50  $\mu\text{L}$  para pesquisa de anticorpos anti-HLA. Todos os produtos foram armazenados até ao processamento a  $4^{\circ}\text{C}$  e  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4.1. Extração de DNA de células do sedimento urinário**

Procedeu-se à extração manual de DNA de acordo com o protocolo do *QIAamp DNA Investigator* (Qiagen®). Os tubos foram colocados a incubar, com agitação, durante 1 hora a  $65^{\circ}\text{C}$ , após a adição de proteinase K. Depois da adição de etanol absoluto, o conteúdo foi

transferido para a coluna *QIAamp Mini* de modo a promover a ligação do DNA à membrana de sílica. Seguiram-se três centrifugações, com dois tampões de lavagem AW1 e AW2 e etanol absoluto, de modo a eliminar os restantes contaminantes, aumentando assim a pureza do DNA. Por fim, o DNA foi eluído em 100 µL de tampão ATE (10 mM Tris-Cl; 0,1 mM EDTA; 0,04% NaN<sub>3</sub>; pH 8,3), quantificado e armazenado a 4 °C.

### **3.4.2. Extração de RNA de células do sedimento urinário**

As amostras de sedimento urinário, congeladas em RLT, foram previamente descongeladas a -4° C, seguindo-se de uma centrifugação à velocidade máxima por 3 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante (600 µL) foi colocado num tubo de 2 mL para se proceder à extração automatizada de RNA no *QIACube* (Qiagen®), de acordo com o protocolo de extração *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen®). Este protocolo utiliza colunas *RNeasy Mini* para extrair e purificar o RNA, eluindo-o em 50 µL de água livre de RNAses. As amostras foram armazenadas a -20° C.

### **3.5. Avaliação da mistura celular e avaliação semi-quantitativa da proveniência das células no sedimento urinário**

Os microssatélites ou *Short Tandem Repeats* (STRs) são regiões repetitivas de DNA que contêm sequências de 2 a 7 nucleótidos. Estes *loci* apresentam um elevado grau de polimorfismo que pode residir no número de repetições, no tamanho da unidade de repetição, ou ainda, na composição da unidade de repetição. Deste modo, cada indivíduo tem alelos específicos que diferem no número de pares de bases de comprimento (pb).

Para além destes STRs, o gene amelogenina permite a distinguir entre diferentes sexos uma vez que os indivíduos do sexo masculino apresentam o gene AMELY e os do sexo feminino apresentam o gene AMELX, cuja diferença reside numa deleção de 6 a 12 pb do AMELY. Assim os dois sistemas acima descritos podem ser utilizados como marcadores de individualidade.



### 3.5.1. Reação de amplificação

De forma a proceder à discriminação alélica, isto é, à identificação da proveniência das células no sedimento urinário (se pertencem ao dador ou ao recetor) e à apreciação, semi-quantitativa, da relação doente/dador, recorreu-se à amplificação de três STRs: FES, F13 e TH01, para pares dador/receptor do mesmo sexo, bem como do marcador dos cromossomas X e Y, a amelogenina, para pares dador/receptor de sexos diferentes (Tabela 2).

**Tabela 2:** *Primers* e respetivas sequências utilizadas na amplificação dos STRs e da amelogenina.

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>
<b>FES marcado</b>	5'- [6FAM] GGG ATT TCC CTA TGG ATT GGG -3'
<b>FES não marcado</b>	5'- GCG AAA GAA TGA GAC TAC AT -3'
<b>F13 marcado</b>	5'- [6FAM] ATG CCA TGC AGA TTA GAA A -3'
<b>F13 não marcado</b>	5'- GAG GTT GCA CTC CAG CCT TT -3'
<b>TH01 marcado</b>	5'- [6FAM] GTG GGC TGA GCT CCC GAT TAT G -3'
<b>TH01 não marcado</b>	5'- GTG ATT CCC ATT GGC GTG TTG CTG -3'
<b>AMEL marcado</b>	5'- [6FAM] CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG -3'
<b>AMEL não marcado</b>	5'- ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CTG -3'

A mistura de amplificação foi feita para um volume final de 50 µL, na qual se utilizou: tampão da GoTaq® Flexi DNA Polymerase 1x (Promega®), cada dNTP a uma concentração final de 1 mM, MgCl<sub>2</sub> a 2,5 mM, os *primers* não marcados a 2 nM e os *primers* marcados a 3 nM, 4 µL de DNA e 0,42 U da GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega®). As reações foram levadas a cabo num termociclador com o programa apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3:** Programa de PCR utilizado na amplificação da amelogenina (55° C) e dos STRs (60° C).

Passos	Temperatura	Tempo	Nº Ciclos
1	96° C	2 minutos	1
2	96° C	1 minuto	35
	55° C/60° C	1 minuto	
	72° C	1 minuto	
3	4° C	∞	1

Finda a amplificação, as amostras foram colocadas numa placa de 96 poços e submetidas a eletroforese capilar, num sequenciador de 4 capilares 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®). Deste modo, cada poço da placa contém 19 µL de formamida, 0,5 µL do padrão de pesos moleculares GeneScan™ 500 *size standart* e 0,5 µL de produto de amplificação. Os resultados gerados foram analisados no programa GeneMapper® v4.0, e apresentados na forma de eletroforectogramas, no qual, cada pico continha a indicação do respetivo peso molecular. A proveniência das células, bem como a respetiva área, foram usadas para avaliação quantitativa da participação do dador/recetor nas células recolhidas do sedimento urinário.

### 3.6. Identificação de anticorpos anti-HLA de classe I e de classe II (LABscreen®) no soro

A identificação de anticorpos anti-HLA presentes no soro foi realizada recorrendo ao uso de esferas latéx revestidas por um único antigénio de classe I e também de esferas latéx revestidas por um único antigénio de classe II, adsorvido à superfície. Cada antigénio é específico para um único anticorpo, permitindo, assim, a sua identificação. A aquisição de dados e a análise foi feita no equipamento LABScan™ 100 (Luminex®).

As amostras de soro, previamente separadas, foram centrifugadas a 10 000 g por 10 minutos e retirou-se o sobrenadante para dois tubos. Foram diluídas na proporção de 1:2 com água. De seguida, adicionaram-se 2,5 µL de esferas LABScreen® - Single Antigen Classe I a um dos tubos e 2,5 µL de esferas LABScreen® - Single Antigen Classe II ao outro tubo, com a finalidade de se estabelecer a ligação entre os vários antigénios HLA adsorvidos à superfície

de cada uma das esferas de látex e eventuais anticorpos existentes na amostra. Ao fim de 20 minutos de incubação, ao escuro, as amostras foram sujeitas a duas lavagens com tampão de lavagem 1x, centrifugando-se a 1 200 g por 10 minutos e decantando-se o sobrenadante entre cada lavagem.

Visto que a análise é baseada em fluorescência, é necessária a adição de um fluorocromo, o R-Ficoeritrina (PE), conjugado com anti-IgG, que irá reconhecer os anticorpos que se encontram ligados aos antígenos presentes nas esferas. Assim, adicionou-se 100 µL de conjugado, a cada um dos tubos e incubou-se durante 30 minutos, ao escuro, com agitação. Ao final desse tempo, centrifugaram-se novamente as amostras a 1 200g por 5 minutos, seguindo-se de duas lavagens com tampão de lavagem 1x. Descantou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 80 µL de PBS. Por último, colocou-se cada amostra num poço de uma placa de 96 poços por forma a se efetuar a aquisição de dados de fluorescência no LABScan™ 100 (Luminex®). A análise dos resultados foi realizada no programa HLA fusion (One Lambda®).

### **3.7. Pesquisa de anticorpos anti-HLA de classe I e II (LABScreen®) na urina**

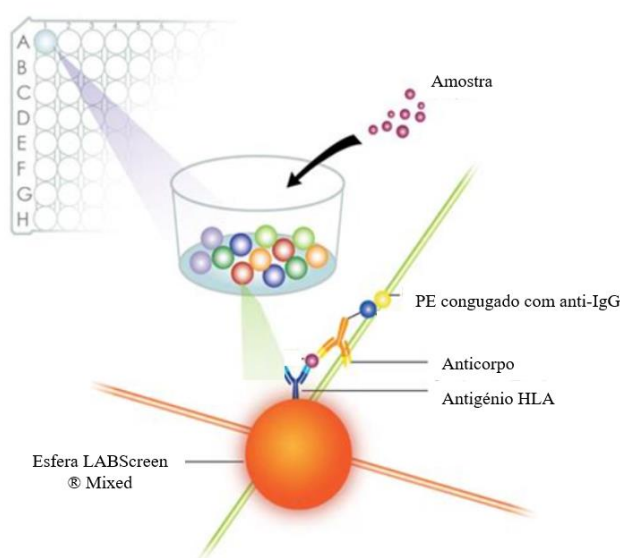
A pesquisa de anticorpos anti-HLA presentes na urina foi realizada recorrendo ao uso de esferas látex contendo anticorpos contra antígenos de HLA de classe I e de classe II purificados, adsorvidos à superfície.

Serviram como controlo negativo, amostras de urina recolhidas de indivíduos saudáveis e de controlo positivo essa mesma urina à qual foram adicionados 5 µl de soro de um doente com anticorpos anti-HLA de classe I e II.

As amostras de sedimento urinário foram descongeladas a 4° C, e incubaram-se a 56° C por 30 minutos. Após esta incubação, centrifugaram-se a 10 000 g por 10 minutos e retirou-se o sobrenadante para um tubo novo (em gelo), onde se deixou repousar cerca de 10 minutos. De seguida, adicionaram-se 215 µL de PBS 1x e 5 µL de esferas LABScreen® Mixed a fim de se estabelecer a ligação entre os antígenos HLA adsorvidos à superfície das esferas de látex e eventuais anticorpos existentes na amostra, incubou-se a mistura *overnight*, ao escuro, com agitação. Finda a incubação, a amostra foi sujeita a três lavagens com tampão de lavagem

1x, centrifugando-se a 10 000 g por 10 minutos e decantando-se o sobrenadante entre cada lavagem.

Adicionou-se 100  $\mu$ L de fluorocromo R-Ficoeritrina (PE), conjugado com anti-IgG e incubou-se durante 1 hora, com agitação. Ao final desse tempo, efetuou-se mais duas lavagens, sendo que no fim se ressuspendeu o *pellet* em 80  $\mu$ L de PBS 1x e colocou-se as amostras numa placa de 96 poços por forma a se efetuar a aquisição de dados de fluorescência no LABScan™ 100 (Luminex®) (Figura 7). Os resultados foram posteriormente analisados no programa HLA fusion (One Lambda®).



**Figura 7:** Imagem ilustrativa da detecção de anticorpos anti-HLA por fluorescência no LABScan™ 100 (Luminex®). Os anticorpos anti-HLA presentes na amostra ligam os antígenos HLA adsorvidos na superfície da esfera LABScreen® Mixed, com consequente ligação do fluorocromo PE conjugado com o anticorpo anti-IgG. Detecção feita por dois lasers, vermelho e verde, que discriminam as esferas e quantificam a fluorescência da molécula marcada, respetivamente. Imagem e legenda adaptadas de <https://www.visualizepicture.com/c/luminex>.

### 3.8. Quantificação relativa dos transcritos (mRNA) TGF- $\beta$ 1, IL-10, FoxP3 e IFN- $\alpha$ 1

#### 3.8.1. Síntese de cDNA a partir do mRNA total

A técnica de RT-PCR combina a síntese de cDNA com a amplificação por PCR, para posterior avaliação das quantidades relativas de cada transcrito. Deste modo, recorre-se ao uso

de uma transcriptase reversa que converte o RNA extraído, das frações celulares das células do sedimento urinário, em cDNA.

Foi utilizado o kit *iScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription Supermix* (Bio-Rad). Assim, de acordo com o protocolo pré-estabelecido, adicionaram-se 4  $\mu$ L de 5x *iScript RT Supermix*, com 8  $\mu$ L de água livre de RNAses e 8  $\mu$ L de RNA extraído. As reações foram levadas a cabo num termociclador com o programa elucidado na Tabela 4.

**Tabela 4:** Programa de RT-PCR usado na síntese de cDNA utilizando o kit *iScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription Supermix* (Bio-Rad).

<b>Passos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
<b>1</b>	25° C	5 minutos
<b>2</b>	46° C	20 minutos
<b>3</b>	95° C	1 minuto
<b>4</b>	4° C	$\infty$

### 3.8.2. PCR em tempo real

O PCR em tempo real, uma variante do PCR, permite a visualização da amplificação à medida que ela ocorre, sendo esta determinada ao longo do processo, na fase exponencial, e não apenas no final. Neste tipo de PCR quantitativo (qPCR), é necessária a utilização de uma sonda fluorescente, cujo sinal é diretamente proporcional à quantidade de cDNA amplificada. Quanto maior for a quantidade de DNA de cadeia dupla inicial, mais cedo se dá o aumento exponencial da curva.

Para o caso em estudo foi utilizada, como molécula fluorescente, o SYBER® Green I (Bio-Rad), esta molécula intercala-se entre as cadeias de dupla hélice formadas e, após excitação, emite fluorescência a um determinado comprimento de onda. À medida que a reação decorre a intensidade do sinal vai aumentando devido à acumulação de produtos PCR.

No entanto, o uso da sonda SYBER® Green I (Bio-Rad) apresenta algumas desvantagens visto que esta se liga de forma homogénea a qualquer tipo de dupla cadeia, podendo, assim, ligar produtos PCR inespecíficos ou dímeros de *primers*.

Para a realização das reações de qPCR preparou-se uma mistura com um volume final de 10  $\mu\text{L}$  contendo 5  $\mu\text{L}$  de 2x QuantiTect SYBRGreen PCR Master, 2  $\mu\text{L}$  de água livre de RNAses, 2  $\mu\text{L}$  de cDNA e 1  $\mu\text{L}$  de 10x QuantiTect Primer Assay (Quiagen) para cada um dos genes de referência e dos genes de interesse (Tabela 5). Os *primers*, que se encontravam liofilizados, foram reconstituídos com 1,1 mL de água isenta de RNAses. Por fim, as misturas de reação foram colocadas numa placa Light Cycler® 480 Multiwell e a realização das reações de amplificação decorreu no equipamento Light Cycler® 480 (Roche), cujo programa consiste em três passos que compreendem a ativação da enzima, a amplificação e a curva de *melting* (Tabela 6).

**Tabela 5:** Lista dos genes de referência para cada um dos tipos de amostra, bem como dos genes de interesse estudados.

	<b>RNA extraído do sedimento urinário</b>	<b>RNA extraído das frações celulares</b>
<b>Genes de referência</b>	ACTB (QT00095431)	CYC1 (QT00209454)
	SF3A1 (QT00061257)	GAPDH (QT00079247)
<b>Genes de interesse</b>	TGFB1 (QT00000728)	TGFB1 (QT00000728)
	FoxP3 (QT00048286)	FoxP3 (QT00048286)
	IFNA1 (QT00201964)	IFNA1 (QT00201964)
	IL-10 (QT00041685)	IL10 (QT00041685)

**Tabela 6:** Programa de amplificação do PCR em tempo real.

Passos	Temperatura	Tempo	Nº Ciclos
1	95° C	15 minutos	1
2	95° C	15 segundos	50
	55° C	30 segundos	
	72° C	30 segundos	
3	65° C – 95° C	-	1

A análise dos resultados foi realizada no Light Cycler® 480 (Roche). Esta análise em dois aspetos principais, a curva de *melting*, que reflete a especificidade da amplificação com base nos desvios da temperatura de *melting* ( $T_m$ ); e os valores de *crossing point* ( $C_p$ ) obtidos, que são utilizados para calcular a quantidade relativa (QR) com base na expressão matemática  $QR=2^{-\Delta C_p}$ . A determinação destes últimos permitirá a obtenção dos valores normalizados da expressão génica (NGE) através do quociente entre o valor de QR do gene de interesse e o fator de normalização para cada amostra.

### 3.8.3. Normalização

A normalização no PCR em tempo real é um passo fulcral à obtenção de resultados fidedignos, relativos à análise da quantificação génica. Assim, é necessário encontrar pelo menos dois genes de referência para se prosseguir à normalização dos valores obtidos, sendo que se assume que os genes de referência são genes expressos por todas as células e com expressão de acordo com o estadio celular. Por forma a escolher estes dois genes de referência para cada um dos dois tipos de análise efetuadas, a partir do RNA extraído das frações celulares e a partir do RNA extraído de células do sedimento urinário, utilizaram-se amostras aleatórias, de ambos, nas reações de PCR em tempo real com cada um dos cinco genes: ACTB (codifica a  $\beta$ -Actina), CYC1 (codifica o Citocromo C-1), 18S rRNA (codifica a subunidade ribossomal 18S), GAPDH (codifica o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e SF3A1 (codifica a subunidade 1 do fator de *splicing* 3a).

Os resultados obtidos foram analisados com o programa GeNorm (PrimerDesign) que escolheu os dois melhores genes para a normalização de cada um dos dois grupos de

amostras. As reações de PCR em tempo real dos respectivos genes de referência foram realizadas para cada grupo de doentes a fim de se obter o Fator de Normalização para cada uma das amostras, através do programa GeNorm (PrimerDesign). Este valor é essencial para determinar o valor de expressão génica normalizado (NGE) aquando a análise dos resultados dos genes de interesse.

### **3.9. Análise estatística**

Utilizou-se o *software* R Studio 1.2.1335 para compilar e uniformizar os dados recolhidos. A apresentação dos resultados é realizada através da média  $\pm$  desvio-padrão para cada um dos grupos. A nível estatístico, visto tratar-se de amostras independentes, os resultados foram submetidos ao teste não paramétrico de U de *Mann-Whitney* e considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ . O *software* usado foi o IBM® SPSS® Statistics 24.



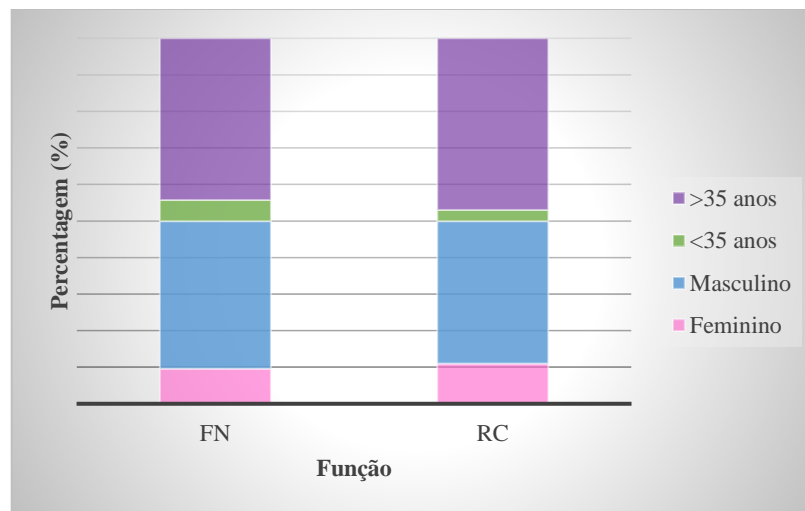


## 4. Resultados

### 4.1. Aspetos demográficos e clínicos da população em estudo

Os dados demográficos apresentados na Tabela 1 demonstram uma enorme similaridade entre ambos os grupos. Como resultado desta homogeneidade as características tais como a idade e o sexo dos doentes, não apresentam grande influência (Figura 8).

A distribuição dos doentes pelos grupos de FN e RC foi feita, posteriormente, com base no diagnóstico clínico. Verifica-se que a maior percentagem dos doentes pertencentes ao grupo de rejeição crónica apresenta níveis de creatinina acima de 1,5 mg/dL. Em comparação com o grupo de rejeição crónica, os doentes do grupo de função normal apresentam um maior número de infeções por CMV, no entanto, só 8% dos doentes do grupo da RC apresentam valores de proteinúria acima de 1,5 mg/dL. Tal como esperado, o grupo de doentes com rejeição crónica apresenta uma maior percentagem de episódios de rejeição aguda quando comparado com o grupo de função normal, o que confirma a importância da rejeição aguda no desenvolvimento da rejeição crónica.



**Figura 8:** Imagem ilustrativa da homogeneidade da população. Comparação entre o sexo (feminino/masculino) e a idade (abaixo de 35 anos/acima de 35 anos) dos doentes com função normal (FN) com os doentes com rejeição crónica (RC).

## 4.2. Incompatibilidades entre dador e recetor

Com base na tipagem HLA do par dador-recetor, foi possível a avaliação da qualidade de *matching* HLA, expressa em termos de incompatibilidade ou *mismatches* tanto para o MHC de classe I como para o MHC de classe II. Desta forma, foram analisados dois *loci* de classe I (*locus* A e *locus* B) e um *locus* para a classe II (*locus* DR). Para cada *locus*, podem existir, no máximo, duas incompatibilidades, sendo um total de quatro incompatibilidades para os *loci* da classe I e de duas incompatibilidades para o *locus* da classe II (Tabela 7).

**Tabela 7:** Média e desvio-padrão das incompatibilidades entre dador e recetor para HLA de classe I e HLA de classe II.

	<b>Incompatibilidades HLA classe I (A/B) (média ± dp)</b>	<b>Incompatibilidades HLA classe II (DR) (média ± dp)</b>
<b>Grupo função normal (FN) N=26</b>	2,69 ± 1,05	1,27 ± 0,67
<b>Grupo rejeição crónica (RC) N=50</b>	3,00 ± 0,85	1,39 ± 0,68

**Legenda:** FN – função normal; RC – rejeição crónica; dp – desvio-padrão.

Relativamente às incompatibilidades HLA de classe I, o grupo de função normal apresenta uma média de 2,69 e o grupo de rejeição crónica apresentam uma média de 3,00 num total de quatro possíveis incompatibilidades. Em relação às incompatibilidades HLA de classe II, o grupo de função normal apresenta uma média de 1,27 enquanto que o grupo de rejeição crónica apresenta uma média de 1,39, num total de duas possíveis incompatibilidades. Os valores médios de incompatibilidades dos dois grupos são muito semelhantes, havendo, porém, um ligeiro aumento das incompatibilidades no grupo de rejeição crónica em relação ao grupo de função normal. O mesmo se verifica com as incompatibilidades HLA de classe I quando comparado com as incompatibilidades HLA de classe II, entre os dois grupos.

### 4.3. Pesquisa de anticorpos anti-HLA

#### 4.3.1. Pesquisa de anticorpos anti-HLA no soro

Na pesquisa de anticorpos anti-HLA no soro, para a classe I HLA não se verificaram diferenças entre os dois grupos estudados. Relativamente à classe II, é evidenciada uma ligeira diferença entre os dois grupos, isto é, no grupo de função normal, mais de metade dos doentes são negativos, enquanto que, no grupo de rejeição crónica mais de metade destes são positivos, para os anticorpos anti-HLA de classe II (Tabela 8).

**Tabela 8:** Percentagem de anticorpos anti-HLA de classe I e de classe II obtida no soro dos dois grupos de transplantados estudados.

	Anticorpos anti-HLA de classe I		Anticorpos anti-HLA de classe II	
	Positivo (%)	Negativo (%)	Positivo (%)	Negativo (%)
<b>Grupo função normal (FN) N=26</b>	54	46	46	54
<b>Grupo rejeição crónica (RC) N=50</b>	56	44	60	40

**Legenda:** FN – função normal; RC – rejeição crónica; % – percentagem.

#### 4.3.2. Anticorpos anti-HLA vs. Incompatibilidades HLA

A associação entre o número de doentes com incompatibilidades HLA de classe I e o número de anticorpos anti-HLA de classe I, presentes no soro, bem como das respetivas percentagens, encontra-se representado na Tabela 9. No grupo de rejeição crónica, é notória a ligação entre o número mais elevado de incompatibilidades e a presença de anticorpos anti-HLA em circulação. Relativamente ao grupo de função normal, verifica-se que, a um menor número de doentes com incompatibilidades de classe I corresponde uma maior percentagem de doentes com anticorpos anti-HLA de classe I.

**Tabela 9:** Relação entre o número de doentes com incompatibilidades HLA de classe I e o número de doentes com anticorpos anti-HLA de classe I, bem como das respetivas percentagens, para cada um dos grupos de transplantados estudados.

	<b>Grupo função normal (FN) N=26</b>				<b>Grupo rejeição crónica (RC) N=50</b>			
	Nº doentes com incompatibilidades de classe I		Nº doentes com anticorpos anti-HLA de classe I		Nº doentes com incompatibilidades de classe I		Nº doentes com anticorpos anti-HLA de classe I	
<b>0</b>	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
<b>1</b>	4	15%	3	75%	4	8%	2	50%
<b>2</b>	8	31%	6	75%	12	24%	8	67%
<b>3</b>	7	27%	2	29%	20	40%	10	50%
<b>4</b>	7	27%	3	43%	14	28%	6	43%

**Legenda:** FN – função normal; RC – rejeição crónica.

Na Tabela 10 encontra-se a associação entre o número de doentes com incompatibilidades HLA de classe II e a presença de anticorpos anti-HLA de classe II. Neste caso, em ambos os grupos de transplantados estudados, verifica-se uma relação positiva entre as incompatibilidades e o número de anticorpos anti-HLA no soro.

**Tabela 10:** Relação entre o número de doentes com incompatibilidades HLA de classe II e o número de doentes com anticorpos anti-HLA de classe II, bem como das respetivas percentagens, para cada um dos grupos de transplantados estudados.

	<b>Grupo função normal (FN) N=26</b>				<b>Grupo rejeição crónica (RC) N=50</b>			
	Nº doentes com incompatibilidades de classe II		Nº doentes com anticorpos anti-HLA de classe II		Nº doentes com incompatibilidades de classe II		Nº doentes com anticorpos anti-HLA de classe II	
<b>0</b>	7	27%	5	71%	2	4%	2	100%
<b>1</b>	13	50%	4	31%	23	46%	10	43%
<b>2</b>	6	23%	3	50%	25	50%	16	64%

**Legenda:** FN – função normal; RC – rejeição crónica.

Tendo em conta a Tabela 9 e a Tabela 10, constata-se que, a percentagem de doentes com anticorpos anti-HLA é maior, em ambos os grupos estudados, para a classe II.

#### 4.3.3. Pesquisa de anticorpos anti-HLA na urina

Na pesquisa de anticorpos anti-HLA na urina, tanto para a classe I como para a classe II verifica-se que mais de metade dos doentes apresentam anticorpos anti-HLA, no grupo com rejeição crónica, enquanto que, no grupo dos doentes com função normal, mais de metade destes são negativos para ambas as classes de HLA (Tabela 11).

**Tabela 11:** Percentagem de anticorpos anti-HLA de classe I e de classe II obtida na urina dos dois grupos de transplantados estudados.

	<b>Anticorpos anti-HLA de classe I</b>		<b>Anticorpos anti-HLA de classe II</b>	
	Positivo (%)	Negativo (%)	Positivo (%)	Negativo (%)
<b>Grupo função normal (FN) N=26</b>	42	58	48	62
<b>Grupo rejeição crónica (RC) N=50</b>	56	44	58	42

**Legenda:** FN – função normal; RC – rejeição crónica; % – percentagem.

#### **4.3.4. Comparação entre a pesquisa de anticorpos anti-HLA no soro e na urina**

Na Tabela 12 estão representadas as percentagens dos doentes que apresentam anticorpos anti-HLA no soro e na urina, evidenciando, assim, as eventuais diferenças entre cada, bem como entre os dois grupos estudados. Verifica-se que não existe diferença significativa entre os dois grupos de doentes no que respeita à presença de anticorpos anti-HLA de classe I e de classe II.

**Tabela 12:** Comparação da percentagem de anticorpos anti-HLA no soro e na urina.

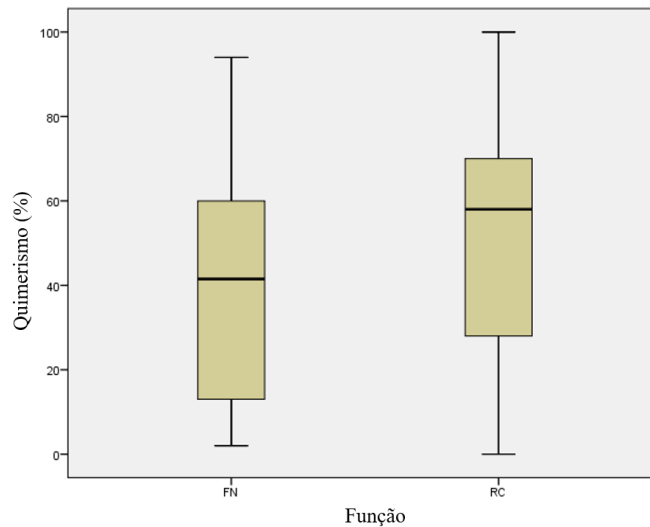
	<b>Anticorpos anti-HLA de classe I (%)</b>		<b>Anticorpos anti-HLA de classe II (%)</b>	
	Soro	Urina	Soro	Urina
<b>Grupo função normal (FN) N=26</b>	54	42	46	48
<b>Grupo rejeição crónica (RC) N=50</b>	56	56	60	58

**Legenda:** FN – função normal; RC – rejeição crónica; % – percentagem.

#### **4.4. Avaliação da mistura celular e avaliação semi-quantitativa da proveniência das células no sedimento urinário**

A Figura 9 representa as percentagens de células provenientes do dador, no sedimento urinário. Verifica-se uma semelhança das percentagens entre o grupo de função normal e o grupo de rejeição crónica, deste modo, as diferenças entre os grupos não são estatisticamente significativas ( $p=0,227$ ).





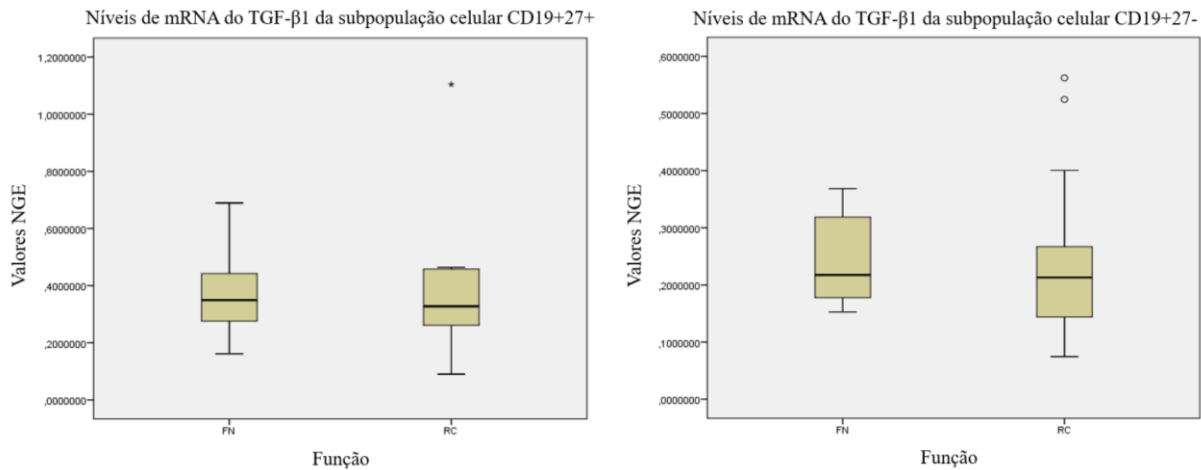
**Figura 9:** Boxplot da percentagem das células do dador (quimerismo celular) no sedimento urinário. A diferença encontrada não é estatisticamente significativa ( $U=241,500$ ;  $p=0,227$ ). A linha horizontal em cada caixa representa a mediana, as linhas horizontais inferior e superior à mediana representam o primeiro e o terceiro quartil, as barras verticais final estendem-se aos valores mínimo e máximo. % – percentagem; FN – função normal; RC – rejeição crónica.

#### 4.5. Quantificação relativa dos transcritos (mRNA) TGF- $\beta$ 1, IL-10, FoxP3 e IFN- $\alpha$ 1

##### 4.5.1. Expressão génica nas subpopulações celulares

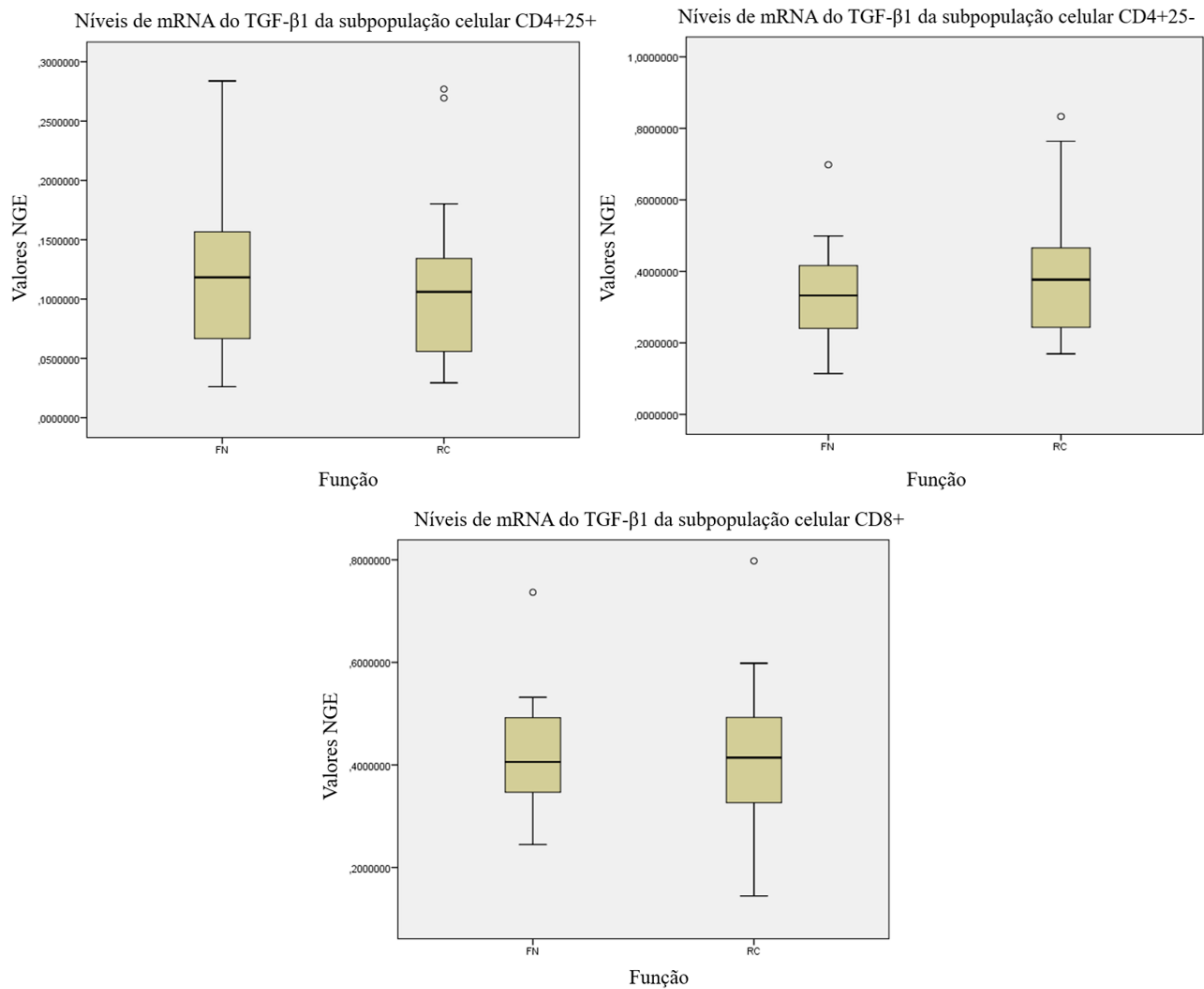
###### Gene TGF- $\beta$ 1

O valor de expressão génica normalizado (NGE) do gene que codifica o TGF- $\beta$ 1, na subpopulação das células B de memória CD19<sup>+</sup>/27<sup>+</sup>, encontra-se elevado para o grupo de função normal, enquanto que, na subpopulação das células B naïve CD19<sup>+</sup>/27<sup>-</sup>, o valor NGE do TGF- $\beta$ 1, encontra-se mais elevado no grupo de rejeição crónica. Porém, nenhum destes valores são estatisticamente significativos, com um p-valor de  $p=0,950$  e  $p=0,505$ , respetivamente (Figura 10).



**Figura 10:** Boxplot dos níveis de mRNA do TGF-β1 nas subpopulações celulares CD19<sup>+</sup>/27<sup>+</sup> (esquerda) e CD19<sup>+</sup>/27<sup>-</sup> (direita). A linha horizontal em cada caixa representa a mediana, as linhas horizontais inferior e superior à mediana representam o primeiro e o terceiro quartil, as barras verticais final estendem-se aos valores mínimo e máximo. A diferença entre os grupos de FN e RC para as duas subpopulações celulares CD19<sup>+</sup>/27<sup>+</sup> (U=62,000; p=0,950) e CD19<sup>+</sup>/27<sup>-</sup> (U=52,000; p=0,505) não é estatisticamente significativa. TGF-β1 – Fator de crescimento tumoral 1; NGE – expressão génica normalizada; FN – função normal; RC – rejeição crónica.

O valor de expressão génica normalizado (NGE) do gene que codifica o TGF-β1, na subpopulação das células T reguladoras CD4<sup>+</sup>/25<sup>+</sup>, encontra-se elevado no grupo de função normal. Por outro lado, tanto na subpopulação das células T CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup>, como na subpopulação das células T CD8<sup>+</sup>, o valor de NGE é mais elevado no grupo de rejeição crónica, no entanto, nenhum destes valores são considerados estatisticamente significativos, com um p-valor p>0,05 (Figura 11).

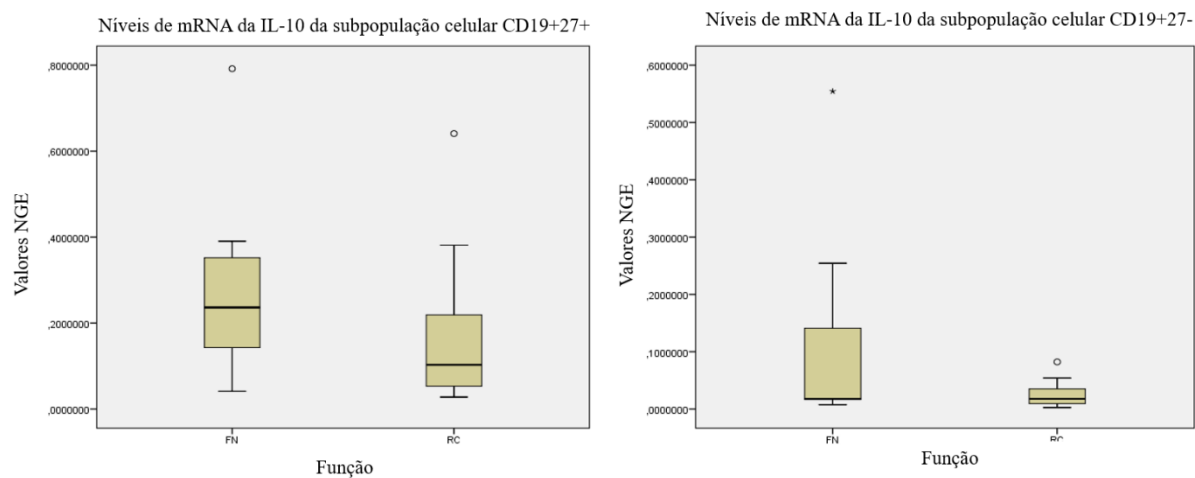


**Figura 11:** Boxplot dos níveis de mRNA do TGF-β1 nas subpopulações celulares CD4<sup>+</sup>/25<sup>+</sup> (esquerda), CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup> (direita) e CD8<sup>+</sup> (baixo). A linha horizontal em cada caixa representa a mediana, as linhas horizontais inferior e superior à mediana representam o primeiro e o terceiro quartil, as barras verticais final estendem-se aos valores mínimo e máximo. A diferença entre os grupos de FN e RC para as três subpopulações celulares CD4<sup>+</sup>/25<sup>+</sup> (U=168,000; p=0,527), CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup> (U=161,000; p=0,578) e CD8<sup>+</sup> (U=172,000; p=0,797) não é estatisticamente significativa. TGF-β1 – Fator de crescimento tumoral 1; NGE – expressão gênica normalizada; FN – função normal; RC – rejeição crónica.

Deste modo, o valor de NGE do gene que codifica o TGF-β1, encontra-se mais elevado no grupo de rejeição crónica, quando comparado com o grupo de função normal, em três das cinco subpopulações celulares estudadas: células B naïve CD19<sup>+</sup>/27<sup>-</sup>, células T CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup> e células T CD8<sup>+</sup>.

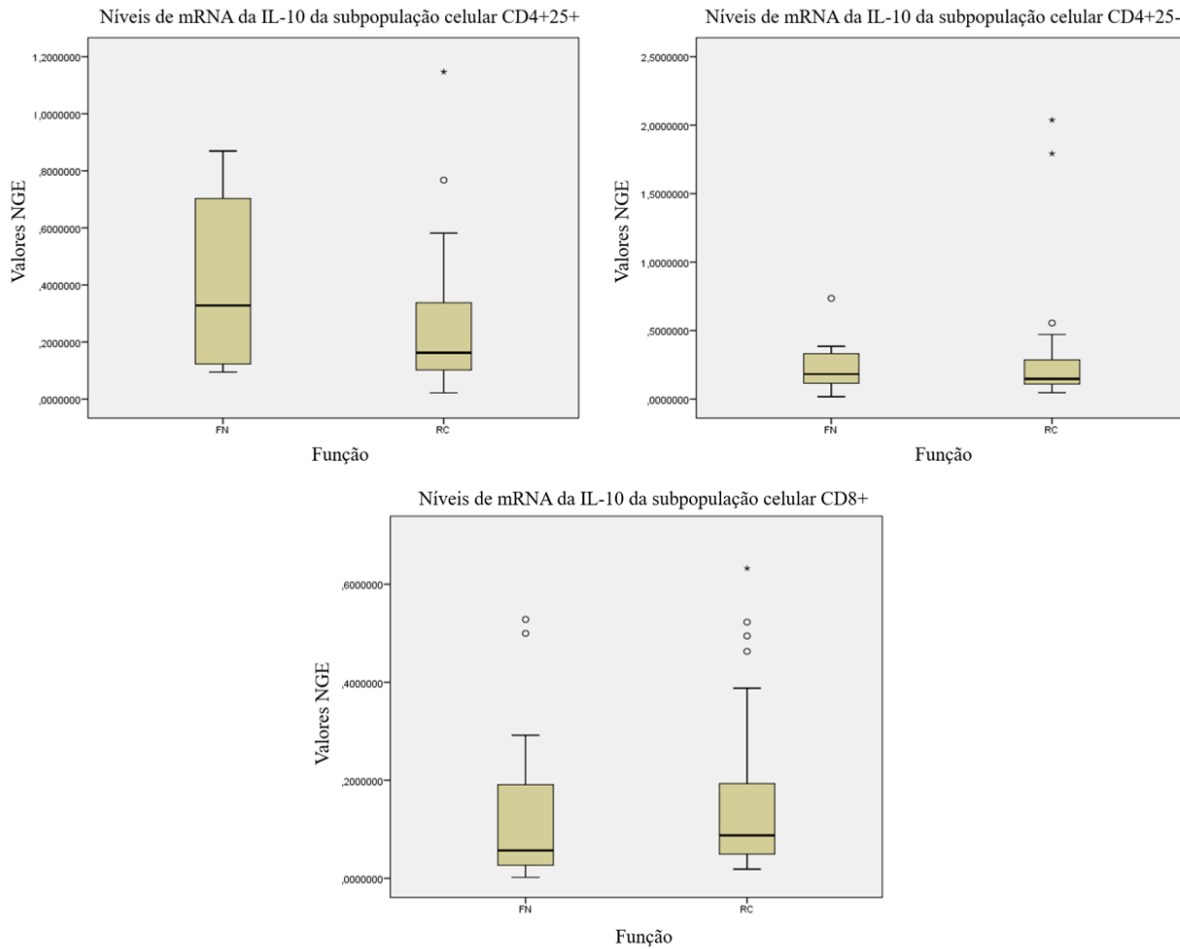
### Gene IL-10

O valor de expressão génica normalizado (NGE) do gene que codifica a IL-10, na subpopulação das células B de memória  $CD19^+/27^+$ , é muito semelhante em ambos os grupos de transplantados estudados. Na subpopulação das células B naïve  $CD19^+/27^-$ , o valor NGE da IL-10 encontra-se mais elevado no grupo de função normal, quando comparado com o grupo de rejeição crónica, porém nenhum destes valores são considerados estatisticamente significativos, com um p-valor de  $p=0,156$  e  $p=0,397$ , respetivamente (Figura 12).



**Figura 12:** Boxplot dos níveis de mRNA da IL-10 nas subpopulações celulares  $CD19^+/27^+$  (esquerda) e  $CD19^+/27^-$  (direita). A linha horizontal em cada caixa representa a mediana, as linhas horizontais inferior e superior à mediana representam o primeiro e o terceiro quartil, as barras verticais final estendem-se aos valores mínimo e máximo. A diferença entre os grupos de FN e RC para as duas subpopulações celulares  $CD19^+/27^+$  ( $U=40,500$ ;  $p=0,156$ ) e  $CD19^+/27^-$  ( $U=49,000$ ;  $p=0,397$ ) não é estatisticamente significativa. IL-10 – Interleucina 10; NGE – expressão génica normalizada; FN – função normal; RC – rejeição crónica.

É de notar um aumento do valor de NGE do gene que codifica a IL-10, no grupo de função normal, na subpopulação das células T reguladoras  $CD4^+/25^+$ . Tanto na subpopulação das células T  $CD4^+/25^-$ , como na subpopulação das células T  $CD8^+$ , o valor de NGE é mais elevado no grupo de rejeição crónica. Nenhum destes valores são considerados estatisticamente significativos, com um p-valor  $p>0,05$  (Figura 13).

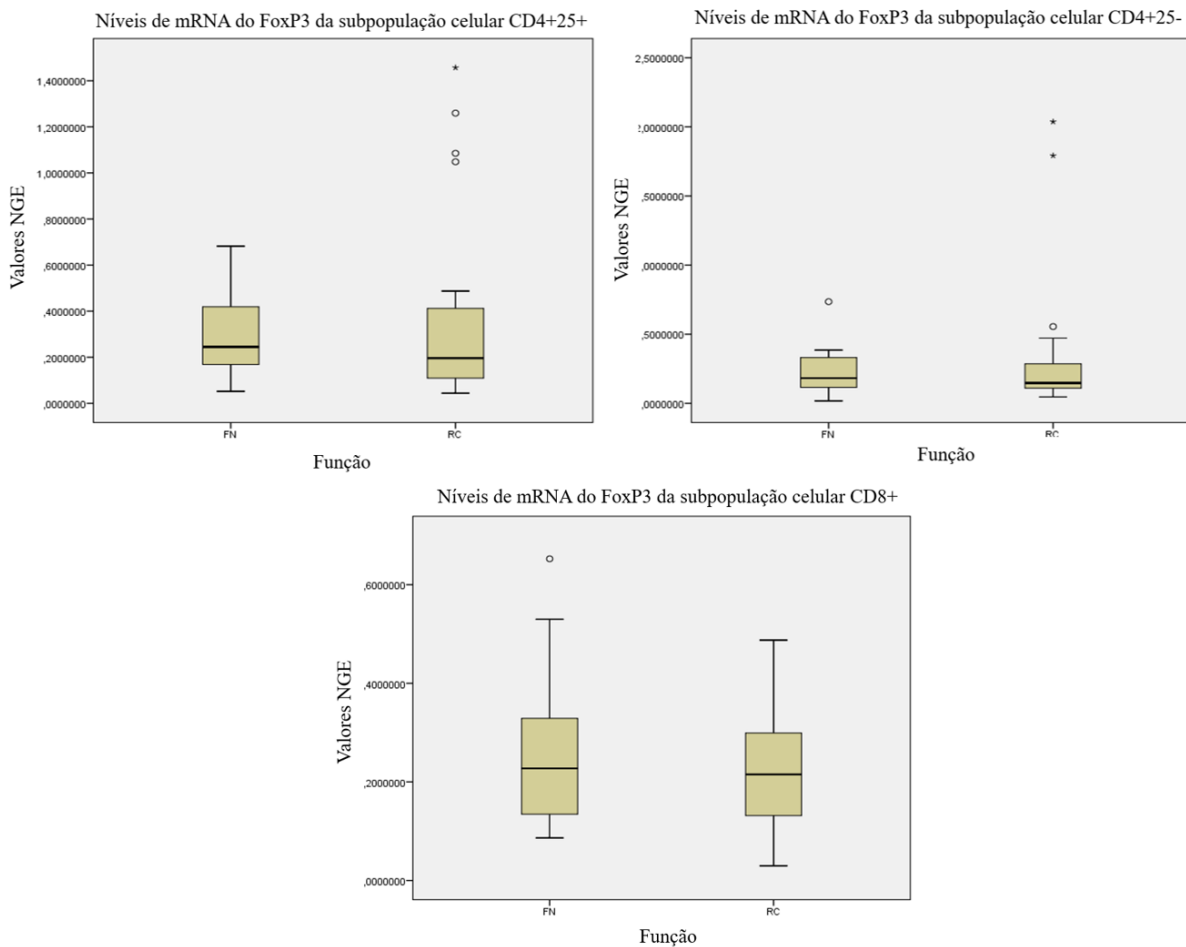


**Figura 13:** Boxplot dos níveis de mRNA da IL-10 nas subpopulações celulares nas subpopulações celulares CD4<sup>+</sup>/25<sup>+</sup> (esquerda), CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup> (direita) e CD8<sup>+</sup> (baixo). A linha horizontal em cada caixa representa a mediana, as linhas horizontais inferior e superior à mediana representam o primeiro e o terceiro quartil, as barras verticais final estendem-se aos valores mínimo e máximo. A diferença entre os grupos de FN e RC para as três subpopulações celulares CD4<sup>+</sup>/25<sup>+</sup> (U=132,000; p=0,114), CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup> (U=173,000; p=0,818) e CD8<sup>+</sup> (U=143,000; p=0,279) não é estatisticamente significativa. IL-10 – Interleucina 10; NGE – expressão génica normalizada; FN – função normal; RC – rejeição crónica.

Deste modo, o valor de NGE do gene que codifica a IL-10, encontra-se mais elevado no grupo de rejeição crónica, quando comparado com o grupo de função normal, em duas das cinco subpopulações celulares estudadas: células T CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup> e células T CD8<sup>+</sup>.

**Gene FoxP3**

Os valores de expressão génica normalizado (NGE) do gene que codifica o FoxP3 nas subpopulações das células T reguladoras CD4<sup>+</sup>/25<sup>+</sup>, das células T CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup> e das células T CD8<sup>+</sup> é semelhante entre os grupos de função normal e rejeição crónica, porém nota-se um ligeiro aumento deste valor nas subpopulações de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>/25<sup>+</sup> e de células T CD8<sup>+</sup>, para o grupo de função normal. Por outro lado, a subpopulação de células T CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup> apresentam um valor de NGE inferior no grupo de função normal, quando comparado com o grupo de rejeição crónica. Para cada uma das populações nenhum valor de NGE não é considerado estatisticamente significativo, com um p-valor para as células T reguladoras CD4<sup>+</sup>/25<sup>+</sup> de p=0,598, para as células T CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup> de p=0.818 e para as células T CD8<sup>+</sup> de p=0,674 (Figura 14).

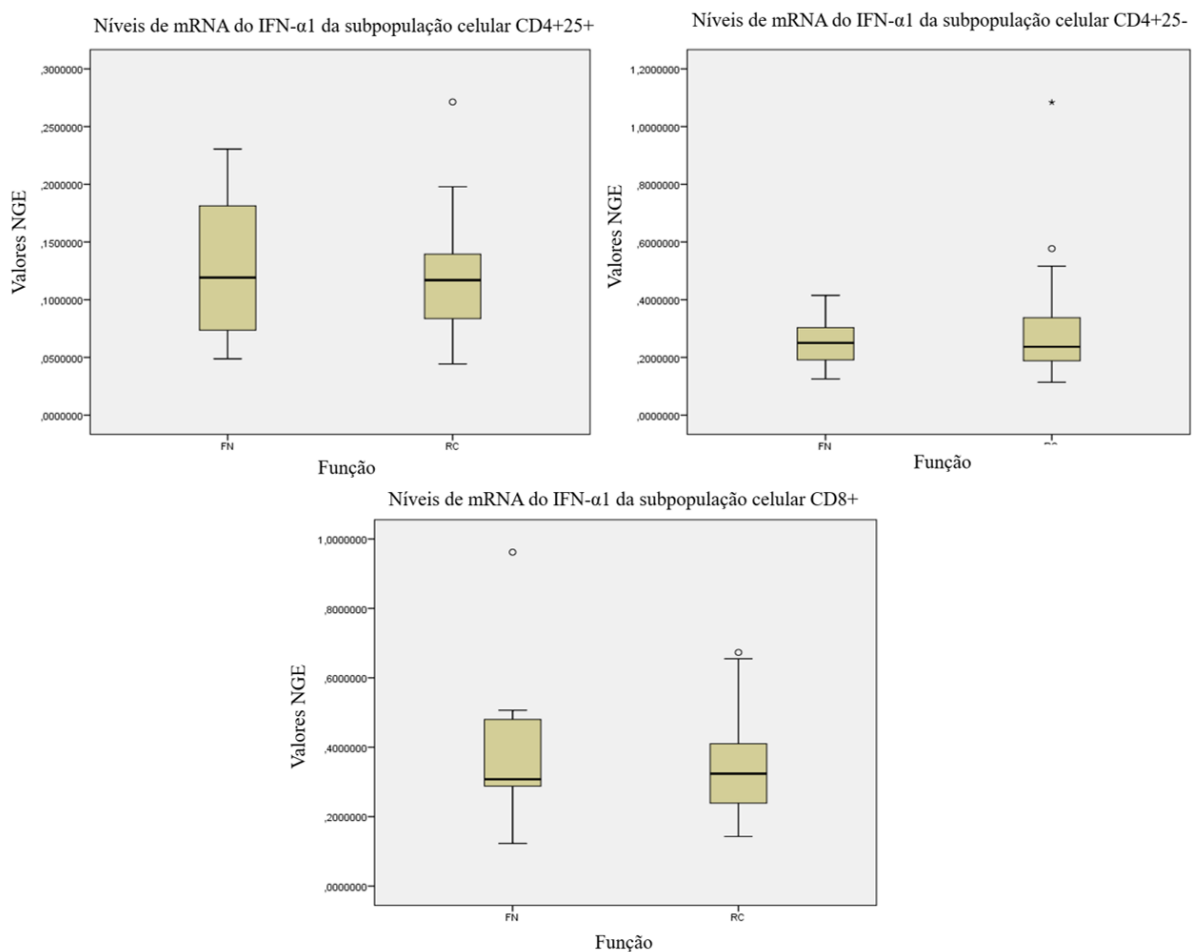


**Figura 14:** Boxplot dos níveis de mRNA do FoxP3 nas subpopulações celulares CD4<sup>+</sup>/25<sup>+</sup> (esquerda), CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup> (direita) e CD8<sup>+</sup> (baixo). A linha horizontal em cada caixa representa a mediana, as linhas horizontais inferior e superior à mediana representam o primeiro e o terceiro quartil, as barras verticais final estendem-se aos valores mínimo e máximo. A diferença entre os grupos de FN e RC para as três subpopulações celulares CD4<sup>+</sup>/25<sup>+</sup> (U=172,000; p=0,598), CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup> (U=173,000; p=0,818) e CD8<sup>+</sup> (U=166,000; p=0,674) não é estatisticamente significativa. FoxP3 – Fator de transcrição *forkhead box P3*; NGE – expressão génica normalizada; FN – função normal; RC – rejeição crónica.

Deste modo, a expressão génica relativa de FoxP3, é mais elevada no grupo de rejeição crónica, quando comparado com o grupo de função normal apenas em uma das três subpopulações celulares estudadas, nas células T CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup>.

### Gene IFN- $\alpha$ 1

Os valores de expressão génica normalizado (NGE) do gene que codifica o IFN- $\alpha$ 1, subpopulação das células T reguladoras CD4<sup>+</sup>/25<sup>+</sup> encontra-se elevado no grupo de função normal. Por outro lado, nas subpopulações das células T CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup> e de células T CD8<sup>+</sup>, o valor de NGE é muito mais elevado o grupo de rejeição crónica, quando comparado com o grupo de função normal. Nenhum destes valores são considerados estatisticamente, significativos com um p-valor  $p > 0,05$  (Figura 15).



**Figura 15:** Boxplot dos níveis de mRNA do FoxP3 nas subpopulações celulares CD4<sup>+</sup>/25<sup>+</sup> (esquerda), CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup> (direita) e CD8<sup>+</sup> (baixo). A linha horizontal em cada caixa representa a mediana, as linhas horizontais inferior e superior à mediana representam o primeiro e o terceiro quartil, as barras verticais final estendem-se aos valores mínimo e máximo. A diferença entre os grupos de FN e RC para as três subpopulações celulares CD4<sup>+</sup>/25<sup>+</sup> (U=176,500; p=0,683), CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup> (U=169,500; p=0,977) e CD8<sup>+</sup> (U=157,000; p=0,507) não é estatisticamente



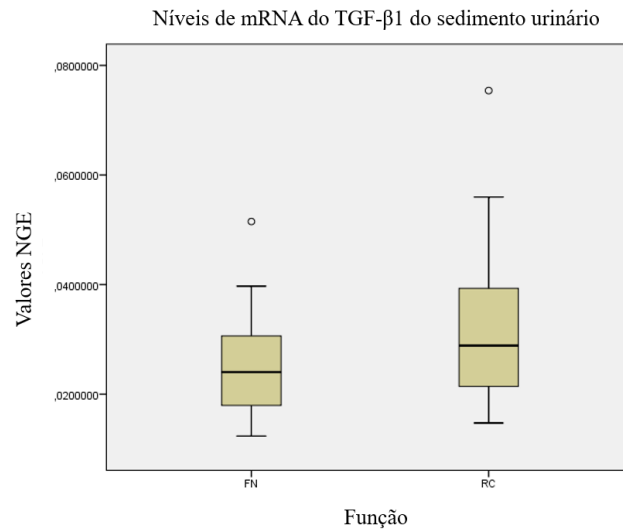
significativa. IFN- $\alpha$ 1 – Interferão alpha-1/13; NGE – expressão génica normalizada; FN – função normal; RC – rejeição crónica.

Deste modo, o valor de NGE do gene que codifica o IFN- $\alpha$ 1, encontra-se mais elevado no grupo de rejeição crónica, quando comparado com o grupo de função normal, em duas das três subpopulações celulares estudadas, sendo estas as subpopulações de células T CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup> e de células T CD8<sup>+</sup>.

#### **4.5.2. Expressão génica no sedimento urinário**

##### **Gene TGF- $\beta$ 1**

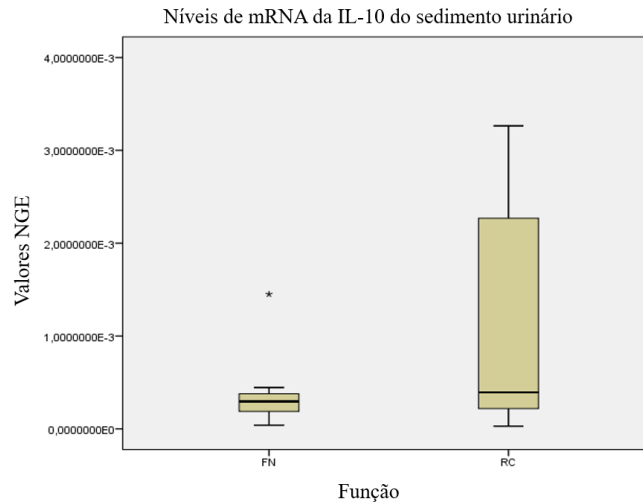
No sedimento urinário, o valor de expressão génica normalizado (NGE) do gene que codifica o TGF- $\beta$ 1, encontra-se elevado no grupo de rejeição crónica, comparativamente ao grupo de função normal, no entanto a diferença não é estatisticamente significativa, com um p-valor de  $p=0,267$  (Figura 16).



**Figura 16:** Boxplot dos níveis de mRNA do TGF- $\beta$ 1 no sedimento urinário. A linha horizontal em cada caixa representa a mediana, as linhas horizontais inferior e superior à mediana representam o primeiro e o terceiro quartil, as barras verticais final estendem-se aos valores mínimo e máximo. A diferença entre os grupos de FN e RC não é estatisticamente significativa ( $U=111,000$ ;  $p=0,267$ ). TGF- $\beta$ 1 – Fator de crescimento tumoral 1; NGE – expressão génica normalizada; FN – função normal; RC – rejeição crónica.

### Gene IL-10

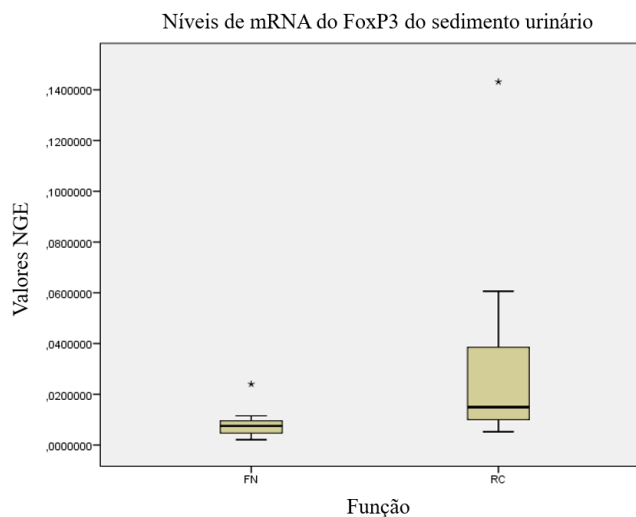
O valor de expressão génica normalizado (NGE) do gene que codifica a IL-10, no sedimento urinário, é muito elevado no grupo de rejeição crónica, quando comparado com o grupo de função normal, porém, a diferença entre ambos os grupos não é estatisticamente significativa, com um p-valor de  $p=0,239$  (Figura 17).



**Figura 17:** Boxplot dos níveis de mRNA da IL-10 no sedimento urinário. A linha horizontal em cada caixa representa a mediana, as linhas horizontais inferior e superior à mediana representam o primeiro e o terceiro quartil, as barras verticais final estendem-se aos valores mínimo e máximo. A diferença entre os grupos de FN e RC não é estatisticamente significativa ( $U=46,000$ ;  $p=0,239$ ). IL-10 – Interleucina 10; NGE – expressão génica normalizada; FN – função normal; RC – rejeição crónica.

### Gene FoxP3

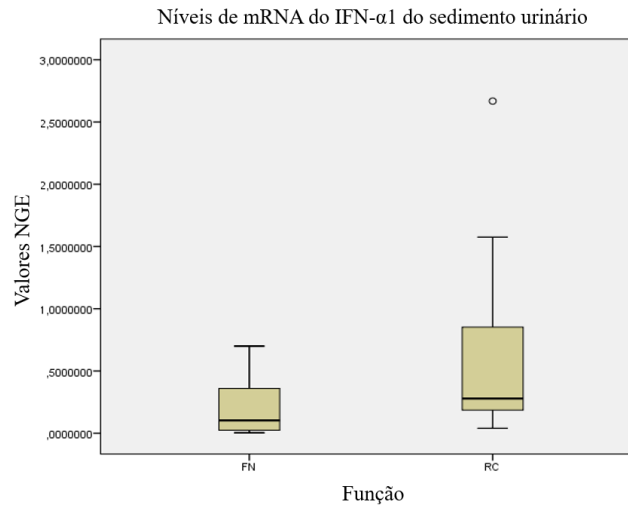
No sedimento urinário, o valor de expressão génica normalizado (NGE) do gene que codifica o FoxP3, encontra-se mais elevado no grupo de rejeição crónica, comparativamente ao grupo de função normal. O valor de NGE é estatisticamente significativo, com um p-valor de  $p=0,011$  (o resultado é considerado estatisticamente significativo para o teste de U de *Mann-Whitney*, quando p-valor é  $<0,05$ ) (Figura 18).



**Figura 18:** Boxplot dos níveis de mRNA do FoxP3 no sedimento urinário. A linha horizontal em cada caixa representa a mediana, as linhas horizontais inferior e superior à mediana representam o primeiro e o terceiro quartil, as barras verticais final estendem-se aos valores mínimo e máximo. A diferença entre os grupos de FN e RC é estatisticamente significativa ( $U=29,000$ ;  $p=0,011$ ). FoxP3 – Fator de transcrição *forkhead box P3*; NGE – expressão génica normalizada; FN – função normal; RC – rejeição crónica.

### Gene IFN- $\alpha 1$

É de notar um aumento do valor de expressão génica normalizado (NGE) do gene que codifica o IFN- $\alpha 1$ , no sedimento urinário, no grupo de rejeição crónica, comparativamente ao grupo de função normal, no entanto, a diferença entre ambos os grupos não é estatisticamente significativa, com um p-valor de  $p=0,067$  (Figura 19).



**Figura 19:** Boxplot dos níveis de mRNA do IFN- $\alpha$ 1 no sedimento urinário. A linha horizontal em cada caixa representa a mediana, as linhas horizontais inferior e superior à mediana representam o primeiro e o terceiro quartil, as barras verticais final estendem-se aos valores mínimo e máximo. A diferença entre os grupos de FN e RC é estatisticamente significativa ( $U=42,000$ ;  $p=0,067$ ). IFN- $\alpha$ 1 – Interferão alpha-1/13; NGE – expressão génica normalizada; FN – função normal; RC – rejeição crónica.

#### 4.6. Expressão génica nas subpopulações celulares vs. no sedimento urinário

A Tabela 13 enfatiza as diferenças entre os valores de expressão génica do grupo de rejeição crónica, quando comparados com os do grupo de função normal. Na população das células T reguladoras ( $CD4^+/25^+$ ), o grupo de rejeição crónica apresenta um menor valor de expressão génica, relativamente ao grupo de função normal.

Parece haver um padrão de aumento da expressão relativa de todos os genes estudados, TGF- $\beta$ 1, IL-10, FoxP3 e IFN- $\alpha$ 1, nas frações das células T  $CD4^+/25^-$ , das células T  $CD8^+$  e no sedimento urinário. De realçar que, no caso da expressão do gene que codifica o FoxP3, no sedimento urinário, o aumento da expressão génica foi significativo. O mesmo padrão não se pode inferir em relação às subpopulações das células B de memória  $CD19^+/27^+$  e células B naïve  $CD19^+/27^-$ .

**Tabela 13:** Tabela-resumo do aumento ou diminuição da expressão génica nas subpopulações celulares e no sedimento urinário para o grupo de rejeição crónica para cada um dos genes estudados, quando comparado com o valor dos níveis de expressão génica obtidos no grupo de função normal.

<b>Genes</b> <b>Células</b>	<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	<b>IL-10</b>	<b>FoxP3</b>	<b>IFN-<math>\alpha</math>1</b>
<b>B de memória</b> <b>CD19<sup>+</sup>/27<sup>+</sup></b>	↓	=		
<b>B naïve</b> <b>CD19<sup>+</sup>/27<sup>-</sup></b>	↑	↓		
<b>T reguladoras</b> <b>CD4<sup>+</sup>/25<sup>+</sup></b>	↓	↓	↓	↓
<b>CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup></b>	↑	↑	↑	↑
<b>CD8<sup>+</sup></b>	↑	↑	↑	↑
<b>Sedimento</b> <b>urinário</b>	↑	↑	↑ (p=0,011)	↑

**Legenda:** CD19 - *cluster* de diferenciação 19; CD27 - *cluster* de diferenciação 27; CD4 - *cluster* de diferenciação 4; CD25 - *cluster* de diferenciação 25; CD8 - *cluster* de diferenciação 8; p - p-valor; “↓” - menor valor de expressão génica no grupo de rejeição crónica; “↑” - maior valor de expressão génica no grupo de rejeição crónica; “=” - o valor de expressão génica no grupo de função normal e de rejeição crónica não apresenta diferenças.



## 5. Discussão

O transplante renal é o procedimento de eleição para pacientes com insuficiência renal crónica terminal, porém, o número de rins disponíveis para transplante é limitado. A discrepância entre o número de transplantes realizados e o número de pacientes que aguardam transplante, realça a necessidade de maximizar a sobrevida do enxerto (Francesc & Domingo, 2013). Desde 1980, com o uso de imunossuppressores, a incidência de episódios de rejeição aguda tem vindo a diminuir, no entanto, não houve uma melhoria significativa na sobrevida do enxerto a longo-prazo. Assim, a rejeição crónica continua a ser a principal barreira a um transplante renal bem sucedido, uma vez que os mecanismos por detrás da rejeição crónica ainda não se encontram totalmente estabelecidos (Hariharan & Mcintosh, 2000).

No âmbito do estudo em apreço os doentes foram divididos, posteriormente, pelos grupos de função normal e de rejeição crónica. Esta divisão foi realizada com base no diagnóstico clínico de rejeição crónica, tendo em conta os seus níveis de creatinina sérica. No entanto, é importante ter em conta o contributo da nefrotoxicidade de determinados fármacos para a progressão da disfunção crónica, como, por exemplo, a ciclosporina, pois podem agravar a disfunção do enxerto renal (Valente et al., 1997).

Na Tabela 1 verifica-se uma homogeneidade nas características idade e sexo entre os dois grupos de transplantados estudados. É de realçar, porém a elevada percentagem de doentes do grupo de rejeição crónica que tiveram pelo menos um episódio de rejeição aguda. Este facto reforça a influência dos episódios de rejeição aguda como o fator que mais influencia o desenvolvimento da rejeição crónica (Hariharan & Mcintosh, 2000). Os doentes do grupo de função normal apresentam uma maior percentagem de infeções por citomegalovírus que, de acordo com a literatura, apresentam um efeito indireto no aumento do risco de rejeição aguda e de disfunção crónica do enxerto (Requião-Moura, Matos, & Pacheco-Silva, 2015).

O elevado polimorfismo do sistema HLA representa um desafio ao *matching* entre dador e recetor. Foi demonstrado que o aumento das incompatibilidades HLA, essencialmente nos dois *loci* de classe I (*locus A* e *locus B*) e no *locus* para a classe II (*locus DR*), aumentam o risco de rejeição, com conseqüente diminuição da sobrevida do enxerto (W. H. Lim et al.,



2012). Deste modo, o menor número de incompatibilidades HLA é tido em conta na escolha do doente mais adequado para determinado dador, verificando-se a inexistência de diferenças significativas entre os grupos de função normal e de rejeição crónica (Tabela 7). Para além disso, é de realçar que até há alguns anos atrás, as incompatibilidades HLA no *locus* para a classe II (*locus* DR) tinham uma maior relevância no *matching*, comparativamente aos *loci* da classe I.

A relação positiva entre o número de incompatibilidades HLA e a presença de anticorpos anti-HLA no soro (Tabela 9 e Tabela 10) deve-se ao facto da existência de um maior número de incompatibilidade facilitar o aloconhecimento e, conseqüentemente, uma maior ativação celular com intervenção das células B, através da ligação do antígeno ao recetor de células B, gerando um sinal que culminará na apresentação deste antígeno pelas moléculas MHC II às células T CD4<sup>+</sup>, desencadeado a ativação da via clássica e da via da lectina da cascata do complemento ou induzindo citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (Colvin, 2007; Smith & Colvin, 2012).

Na pesquisa de anticorpos anti-HLA no soro, verificou-se que no grupo de rejeição crónica mais de metade dos doentes, tanto para a classe I como para a classe II, apresentavam anticorpos anti-HLA (Tabela 8), o mesmo se verificou na pesquisa de anticorpos na urina (Tabela 11). Assim, a Tabela 12 enfatiza a relação positiva entre a percentagem de doentes com anticorpos anti-HLA detetados soro e a sua presença na urina. Contrariamente ao que seria de esperar, não se nota nenhum aumento significativo das percentagens de doentes com anticorpos na urina em relação aos anticorpos anti-HLA presentes no soro. Thauinat et al., verificou que os anticorpos em circulação eram diferentes daqueles produzidos localmente no enxerto, denotando a existência de dois tipos de resposta imune visando diferentes antígenos.

Em relação à proveniência das células no sedimento urinário não há diferenças entre os doentes do grupo de função normal e de rejeição crónica, no entanto, o grupo de rejeição crónica apresenta uma mediana superior a 50%, ou seja, os doentes pertencentes a este grupo têm uma maior percentagem de células do dador. Li et al., encontraram *cell-free* DNA do dador, na urina do recetor, indicando que o quimerismo celular urinário pode ser visto como um novo marcador de monitorização do transplante renal, uma vez que elevadas concentrações de DNA do dador foram encontradas sob condições de rejeição do enxerto.

Neste trabalho, foi realizada a análise da expressão de genes específicos, tais como o TGF- $\beta$ 1, a IL-10, o FoxP3 e o IFN- $\alpha$ 1, tanto nas diferentes subpopulações celulares, como no sedimento urinário tentando estabelecer uma relação entre os níveis de expressão génica com o grupo ao qual pertencem as células (FN ou RC).

Teppo et al., verificou que a excreção urinária de TGF- $\beta$ 1 está relacionada com a lesão tubular proximal, com o grau de fibrose intersticial e com a consequente perda de função renal. A medição dos níveis de expressão de TGF- $\beta$ 1 na urina pode ser uma ferramenta útil, não invasiva, para avaliar a gravidade do dano renal em doentes com rejeição crónica do enxerto (Szeto et al., 2005). O TGF- $\beta$ 1 atua como o maior regulador da produção e degradação da matriz extracelular e encontra-se envolvido no processo de fibrogénese (Kalluri & Neilson, 2003). Os valores de NGE do TGF- $\beta$ 1 encontram-se elevados no grupo de rejeição crónica, nas subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>-</sup>) e de células T CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) (Figura 11). O mesmo se verifica na expressão de TGF- $\beta$ 1 na urina (Figura 16), que está de acordo com a literatura, uma vez que TGF- $\beta$ 1 tem a capacidade de promover fibrose intersticial, comprometendo a normal função do enxerto renal, tal como sucede nos doentes pertencentes ao grupo da rejeição crónica. Para além disso, os dados apoiam a hipótese de que a excreção urinária de TGF- $\beta$ 1 é maior em doentes com infeção de CMV (Helanterä et al., 2006). Apesar da expressão de TGF- $\beta$ 1 permitir avaliar o grau de dano renal em doenças renais crónicas, este gene, relativamente à especificidade, é considerado inadequado em termos de valor de diagnóstico.

A citocina IL-10 tem um papel limitador na resposta inflamatória e está envolvida na inibição da resposta das células Th1 (Cobbold & Waldmann, 2013). Em duas das subpopulações estudadas, nas células T CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup> e nas células T CD8<sup>+</sup> (Figura 13), bem como no sedimento urinário (Figura 17), surpreendentemente, este gene apresenta níveis elevados de expressão génica no grupo de rejeição crónica. Tal pode dever-se ao reduzido número de amostras estudadas.

Como se pode ver pela Figura 3, os mecanismos envolvidos na ativação das células T compreendem a libertação de diversas citocinas que direcionam a diferenciação em células Th1, Th2 e Th17. Deste modo, a presença de IL-10 irá estimular a diferenciação do linfócito T naíve em células Th2, enquanto que, a presença de TGF- $\beta$  estimula a diferenciação em células

Th17. No doentes pertencentes ao grupo de rejeição crónica, as subpopulações de células T CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup> e de células T CD8<sup>+</sup>, bem como o sedimento urinário, apresentam valores de expressão génica mais elevados, quando comparado com o grupo de função normal, o que indica uma tendência à diferenciação em células Th2 e Th17. No entanto Moraes-Vieira et al., reportaram um papel protetivo das células Th2 no contexto da alotransplantação. Por outro lado, as células Th17 desempenham um papel importante no desenvolvimento de lesões no aloenxerto, com conseqüente perda da função renal (Chen, Liang, Chen, Xu, & Ding, 2018; Kim et al., 2018).

Visto que as células B se encontram envolvidas em diversos processos imunológicos, tais como a tolerância num transplante, analisou-se a expressão génica de TGF-β1 e IL-10 das duas subpopulações separadas, as células B de memória (CD19<sup>+</sup>/27<sup>+</sup>) e as células B naïve (CD19<sup>+</sup>/27<sup>-</sup>). Na análise dos valores de NGE destes genes de citocinas imunomoduladoras não se observaram diferenças significativas entre os dois grupos de transplantados estudados (Figura 10 e Figura 12).

Sabe-se que a população natural de células T reguladoras que co expressam CD4 e CD25 (células T CD4<sup>+</sup>/25<sup>+</sup>) desempenha um papel fundamental na manutenção da tolerância às células T, podendo suprimir as células T ou atuar diretamente na atenuação da apresentação de antígenos pelas células dendríticas, criando um meio anti-inflamatório na presença de TGF-β1 e IL-10 (Garín et al., 2007). Deste modo, as células Treg apresentam valores de NGE, de ambos os genes, mais baixos no grupo de rejeição crónica, quando comparado com o grupo de função normal (Figura 11 e Figura 13). Para além da expressão de TGF-β1 e IL-10, a expressão de FoxP3, que requer a presença de IL-10, é essencial nas células Treg para a manutenção da auto tolerância imunológica e da homeostase imune (Caudy et al., 2007; Wing et al., 2008). Assim, verifica-se uma menor expressão de FoxP3 nas células Treg (CD4<sup>+</sup>/25<sup>+</sup>) no grupo de rejeição crónica, quando comparado com o grupo de função normal (Figura 14). Na subpopulação de células T CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup>, os níveis de NGE do FoxP3 são elevados no grupo de rejeição crónica, considerando o exposto e tendo em conta que na subpopulação células T CD8<sup>+</sup> não se verificaram diferenças entre os dois grupos de transplantados estudados, nada se pode inferir (Figura 14). Barabadi et al., demonstraram o aumento dos níveis de expressão de mRNA de FoxP3 na urina em doentes com rejeição crónica. Assim, na análise dos níveis de

NGE do FoxP3 no sedimento urinário do grupo de rejeição crónica, verificou-se um aumento estatisticamente significativo para o teste de U de *Mann-Whitney*, uma vez que o p-valor é  $<0,05$  (Figura 18).

A citocina IFN- $\alpha$ 1 tem efeitos pleiotrópicos que consistem na promoção da diferenciação das células B, que induzem a diferenciação das células T naíve em células T CD4 e em células T CD8 efetoras, reduzindo a proliferação das Treg e direcionando a expressão de MHC de classe I e de classe II, levando, assim, à produção de moléculas co estimatórias pelas células dendríticas (Jefferies, 2019). Na análise dos resultados apresentados na Figura 15, os níveis de NGE do IFN- $\alpha$ 1 encontram-se mais elevados nas células T CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup> e T CD8<sup>+</sup> e mais baixos nas células Treg CD4<sup>+</sup>/25<sup>+</sup> no grupo de rejeição crónica. Quando analisados os níveis de expressão de IFN- $\alpha$ 1 no sedimento urinário, verifica-se um aumento da sua expressão no grupo de rejeição crónica, o que pode reforçar que a presença de IFN- $\alpha$ 1 está associada à rejeição crónica (Figura 19).

De um modo geral, pode observar-se um padrão de expressão dos diferentes genes nas diferentes subpopulações celulares, bem como no sedimento urinário. Este padrão é visível nos níveis reduzidos de expressão génica, nos quatro genes estudados, na subpopulação de células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>/25<sup>+</sup>) no grupo de rejeição crónica, quando comparado com os do grupo de função normal, facto que está de acordo com a literatura, dado que as células T reguladoras estão envolvidas nos mecanismos de tolerância. Para além deste padrão, é verificado um aumento dos níveis de expressão génica de TGF- $\beta$ 1, IL-10, FoxP3 e IFN- $\alpha$ 1 nas subpopulações de células T CD4<sup>+</sup>/25<sup>-</sup> e de células T CD8<sup>+</sup> no grupo de rejeição crónica, comparativamente ao grupo de função normal, o que corrobora o papel destas subpopulações na resposta imune celular e humoral (Tabela 13). Esse aumento é também visível na análise da expressão génica do sedimento urinário.

Uma avaliação mais detalhada das células que constituem o sedimento urinário poderia, seguramente, acrescentar valor aos resultados encontrados e permitir explicar alguns resultados que, á primeira vista, poderão parecer contraditórios.



## 6. Conclusão

O trabalho realizado visou contribuir para uma possível monitorização da evolução do transplante renal, através da utilização de biomarcadores preditivos de rejeição crónica obtidos por procedimentos não invasivos e o efeito de determinados genes na sobrevida do enxerto.

No presente estudo, verificou-se a relação positiva entre a presença de anticorpos anti-HLA e de incompatibilidades e a rejeição do aloenxerto. A pesquisa de anticorpos anti-HLA na urina revelou-se um método eficaz na deteção de anticorpos, correspondendo à percentagem de anticorpos anti-dador encontrados no soro, porém este método precisa de validação, bem como de alguns ajustes, nomeadamente no grau de pureza das amostras nas quais se é feita a avaliação, por forma a poder vir a ser utilizado como um procedimento padrão de monitorização do enxerto.

Na determinação do grau de quimerismo no sedimento urinário, chegou-se à conclusão de que se encontravam presentes, em igual percentagem, as células do dador e do recetor em ambos os grupos de transplantados estudados. Dificilmente esta abordagem poderá acrescentar um valor ao diagnóstico de rejeição crónica mediada por anticorpos.

A expressão génica em subpopulações celulares do gene TGF- $\beta$ 1, IL-10 e do gene que codifica o fator de transcrição FoxP3, essencialmente nas células Treg, confirmam o papel modulador deste subtipo de células na tolerância. O estudo mais aprofundado das Treg no sangue periférico e a expressão génica de FoxP3 na urina complementados com estudos de *cell free* DNA poderá ser um campo a explorar.

Os biomarcadores estudados neste trabalho complementados com outros potenciais biomarcadores, estudados previamente (CXCL10, CXCL9), poderão auxiliar a construir um perfil com potencial para melhor entender o estadio da rejeição crónica do enxerto renal.

Convém frisar que a contribuição científica deste trabalho é muito pequena perante a complexidade dos mecanismos envolvidos na rejeição crónica. Todavia parece ter conseguido fornecer novos *insights* sobre alguns dos mecanismos subjacentes ao estabelecimento da rejeição crónica do enxerto renal.



## 7. Referências

- Abbas, A., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2011). *Cellular and Molecular Immunology* (7ª Edição). Philadelphia: WB Saunders Co.
- Adalid-Peralta, L., Fragoso, G., Fleury, A., & Sciutto, E. (2011). Mechanisms Underlying the Induction of Regulatory T cells and Its Relevance in the Adaptive Immune Response in Parasitic Infections. *International Journal of Biological Sciences*, 7(9), 1412–1426.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 124(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Arosa, F. A., Cardoso, E. M., & Pacheco, F. C. (2007). *Fundamentos da Imunologia* (2ª Edição). Lidel Edicoes Tecnicas.
- Ayala García, M. A., González Yebra, B., López Flores, A. L., & Guaní Guerra, E. (2012). The Major Histocompatibility Complex in Transplantation. *Journal of Transplantation*, 2012, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2012/842141>
- Barabadi, M., Shahbaz, S. K., Foroughi, F., Hosseinzadeh, M., Nafar, M., Yekaninejad, M. S., & Amirzargar, A. (2018). High Expression of FOXP3 mRNA in Blood and Urine as a Predictive Marker in Kidney Transplantation. *Progress in Transplantation (Aliso Viejo, Calif.)*, 28(2), 134–141. <https://doi.org/10.1177/1526924818765812>
- Batal, I., Zeevi, A., Iii, J. G. L., Aggarwal, N., Shapiro, R., Randhawa, P., & Girnita, A. (2010). Antihuman Leukocyte Antigen–Specific Antibody Strength Determined by Complement-Dependent or Solid-Phase Assays Can Predict Positive Donor-Specific Crossmatches. *Arch Pathol Lab Med*, 134, 7.



- Bharat, A., & Mohanakumar, T. (2007). Allopeptides and the alloimmune response. *Cellular Immunology*, 248(1), 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2007.03.010>
- Bradley, L. M. (2003). Migration and T-lymphocyte effector function. *Current Opinion in Immunology*, 15(3), 343–348. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(03\)00043-8](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(03)00043-8)
- Brusselle, G. G., Joos, G. F., & Bracke, K. R. (2011). New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet*, 378(9795), 1015–1026. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60988-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60988-4)
- Cardoni, R. L., Prigoshin, N., Tambutti, M. L., & Ferraris, J. R. (2005). [Regulatory cytokines in the response to the allogeneic renal transplant]. *Medicina*, 65(1), 54–62.
- Caudy, A. A., Reddy, S. T., Chatila, T., Atkinson, J. P., & Verbsky, J. W. (2007). CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked–like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(2), 482–487. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.10.007>
- Chakraborty, A. K., & Weiss, A. (2014). Insights into the initiation of TCR signaling. *Nature Immunology*, 15(9), 798–807. <https://doi.org/10.1038/ni.2940>
- Chang, A. T., & Platt, J. L. (2009). The Role of Antibodies in Transplantation. *Transplantation Reviews (Orlando, Fla.)*, 23(4), 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2009.06.002>
- Chen, R., Liang, F., Chen, Q., Xu, J., & Ding, Y. (2018). A novel model for dissecting roles of IL-17 in lung transplantation. *Journal of Thoracic Disease*, 10(6), 3298–3307. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.05.176>

- Chinen, J., & Buckley, R. H. (2010). Transplantation immunology: Solid organ and bone marrow. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S324–S335. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.11.014>
- Cobbold, S. P., & Waldmann, H. (2013). Regulatory Cells and Transplantation Tolerance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *3*(6), a015545. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015545>
- Cohen, D., Colvin, R. B., Daha, M. R., Drachenberg, C. B., Haas, M., Nickleit, V., ... Bajema, I. M. (2012). Pros and cons for C4d as a biomarker. *Kidney International*, *81*(7), 628–639. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.497>
- Colvin, R. B. (2007). Antibody-Mediated Renal Allograft Rejection: Diagnosis and Pathogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology*, *18*(4), 1046–1056. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007010073>
- Colvin, R. B., & Smith, R. N. (2005). Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nature Reviews Immunology*, *5*(10), 807–817. <https://doi.org/10.1038/nri1702>
- Cornell, L. D., Smith, R. N., & Colvin, R. B. (2008). Kidney Transplantation: Mechanisms of Rejection and Acceptance. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *3*(1), 189–220. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151508>
- Crane, A., Eltemamy, M., & Shoskes, D. (2019). Transplant immunosuppressive drugs in urology. *Translational Andrology and Urology*, *8*(2), 109–117. <https://doi.org/10.21037/tau.2018.07.12>
- Davis, M. M., Boniface, J. J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B., & Chien, Y. (1998). LIGAND RECOGNITION BY  $\alpha\beta$  T CELL RECEPTORS. *Annual Review of Immunology*, *16*(1), 523–544. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.523>

- Desvaux, D., Schwarzinger, M., Pastural, M., Baron, C., Abtahi, M., Berrehar, F., ... le Gouvello, S. (2004). Molecular diagnosis of renal-allograft rejection: correlation with histopathologic evaluation and antirejection-therapy resistance. *Transplantation*, 78(5), 647–653. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000133530.26680.dc>
- Dias, E. C. A., & Camara, N. O. S. (2005). Monitorização Molecular da Rejeição de Transplantes Renais. *J Bras Nefrol*, 27(2), 76–83.
- Dunkelberger, J. R., & Song, W.-C. (2010). *Complement and its role in innate and adaptive immune responses* / *Cell Research*. 34–50.
- Einecke, G., Fairhead, T., Hidalgo, L. G., Sis, B., Turner, P., Zhu, L.-F., ... Halloran, P. F. (2006, September 1). Tubulitis and Epithelial Cell Alterations in Mouse Kidney Transplant Rejection Are Independent of CD103, Perforin or Granzymes A/B. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01483.x>
- Fantus, D., Rogers, N. M., Grahammer, F., Huber, T. B., & Thomson, A. W. (2016). Roles of mTOR complexes in the kidney: implications for renal disease and transplantation. *Nature Reviews. Nephrology*, 12(10), 587–609. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.108>
- Feucht, H. E., & Opelz, G. (1996). The humoral immune response towards HLA class II determinants in renal transplantation. *Kidney International*, 50(5), 1464–1475. <https://doi.org/10.1038/ki.1996.460>
- Francesc, M., & Domingo, H. (2013). ¿Ha mejorado la supervivencia del injerto tras el trasplante renal en la era de la moderna inmunosupresión? *Nefrología*, 33(1), 14–26. <https://doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2012.Oct.11739>

- Franzese, O., Mascali, A., Capria, A., Castagnola, V., Paganizza, L., & Di Daniele, N. (2013). Regulatory T Cells in the Immunodiagnosis and Outcome of Kidney Allograft Rejection. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/852395>
- Garín, M. I., Chu, C.-C., Golshayan, D., Cernuda-Morollón, E., Wait, R., & Lechler, R. I. (2007). Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood*, 109(5), 2058–2065. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-016451>
- Gray, D., Gray, M., & Barr, T. (2007). Innate responses of B cells. *European Journal of Immunology*, 37(12), 3304–3310. <https://doi.org/10.1002/eji.200737728>
- Gujar, S. A., & Lee, P. W. K. (2014). Oncolytic Virus-Mediated Reversal of Impaired Tumor Antigen Presentation. *Frontiers in Oncology*, 4(77), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00077>
- Halloran, P. F. (2004). Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *The New England Journal of Medicine*, 351(26), 2715–2729. <https://doi.org/10.1056/NEJMra033540>
- Hariharan, S., & McIntosh, M. J. (2000). Improved Graft Survival after Renal Transplantation in the United States, 1988 to 1996. *The New England Journal of Medicine*, 342(9), 605–612.
- Helanterä, I., Teppo, A. M., Koskinen, P., Törnroth, T., Grönhagen-Riska, C., & Lautenschlager, I. (2006). Increased urinary excretion of transforming growth factor-beta(1) in renal transplant recipients during cytomegalovirus infection. *Transplant Immunology*, 15(3), 217–221. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2005.11.001>

- Hennecke, J., & Wiley, D. C. (2001). T Cell Receptor–MHC Interactions up Close. *Cell*, *104*(1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00185-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00185-4)
- Ho, E. K., Vasilescu, E. R., Colovai, A. I., Stokes, M. B., Hallar, M., Markowitz, G. S., ... Suciú-Foca, N. (2008). Sensitivity, specificity and clinical relevance of different cross-matching assays in deceased-donor renal transplantation. *Transplant Immunology*, *20*(1–2), 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2008.09.013>
- Hourmant, M., Figueres, L., Gicquel, A., Kimmel, C., & Garandeau, C. (2019). New rules of ABO-compatibility in kidney transplantation. *Transfusion Clinique et Biologique*, *26*(3), 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2019.06.002>
- Huang, J., Brameshuber, M., Zeng, X., Xie, J., Li, Q., Chien, Y., ... Davis, M. M. (2013). A Single Peptide-Major Histocompatibility Complex Ligand Triggers Digital Cytokine Secretion in CD4+ T Cells. *Immunity*, *39*(5), 846–857. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.036>
- Jefferies, C. A. (2019). Regulating IRFs in IFN Driven Disease. *Frontiers in Immunology*, *10*(325), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00325>
- Jiang, S., Herrera, O., & Lechler, R. I. (2004). New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Current Opinion in Immunology*, *16*(5), 550–557. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.07.011>
- Jones, N. D., Fluck, N. C., Mellor, A. L., Morris, P. J., & Wood, K. J. (1998). The induction of transplantation tolerance by intrathymic (i.t.) delivery of alloantigen: a critical relationship between i.t. deletion, thymic export of new T cells and the timing of transplantation. *International Immunology*, *10*(11), 1637–1646. <https://doi.org/10.1093/intimm/10.11.1637>

- Jr, C. A. J., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J., Jr, C. A. J., Travers, P., ... Shlomchik, M. J. (2001). *Immunobiology* (5th ed.). Garland Science.
- Kalluri, R., & Neilson, E. G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, *112*(12), 1776–1784. <https://doi.org/10.1172/JCI200320530>
- Kamoun, M. (2001). Cellular and molecular parameters in human renal allograft rejection. *Clinical Biochemistry*, *34*(1), 29–34. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(00\)00188-0](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(00)00188-0)
- Kasiske, B. L. (1998). THE EVALUATION OF PROSPECTIVE RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS AND LIVING DONORS. *Surgical Clinics of North America*, *78*(1), 27–39. [https://doi.org/10.1016/S0039-6109\(05\)70632-0](https://doi.org/10.1016/S0039-6109(05)70632-0)
- Kim, K. W., Kim, B.-M., Doh, K. C., Kim, C.-D., Jeong, K. H., Lee, S.-H., ... Chung, B. H. (2018). Clinical significance of CD161+CD4+ T cells in the development of chronic antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients. *PLoS ONE*, *13*(7), e0200631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200631>
- Konieczny, B. T., Dai, Z., Elwood, E. T., Saleem, S., Linsley, P. S., Baddoura, F. K., ... Lakkis, F. G. (1998). IFN- $\gamma$  Is Critical for Long-Term Allograft Survival Induced by Blocking the CD28 and CD40 Ligand T Cell Costimulation Pathways. *The Journal of Immunology*, *160*(5), 2059–2064.
- Krammer, P. H., Arnold, R., & Lavrik, I. N. (2007). Life and death in peripheral T cells. *Nature Reviews. Immunology*, *7*(7), 532–542. <https://doi.org/10.1038/nri2115>
- Kuby, J., Kindt, T. J., Osborne, B. A., & Goldsby, R. A. (2003). *Immunology* (5<sup>a</sup> Edição). Freeman.

- Kuchen, S., Robbins, R., Sims, G. P., Sheng, C., Phillips, T. M., Lipsky, P. E., & Ettinger, R. (2007). Essential Role of IL-21 in B Cell Activation, Expansion, and Plasma Cell Generation during CD4+ T Cell-B Cell Collaboration. *The Journal of Immunology*, *179*(9), 5886–5896. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.5886>
- Kurian, S. M., Heilman, R., Mondala, T. S., Nakorchevsky, A., Hewel, J. A., Campbell, D., ... Salomon, D. R. (2009). Biomarkers for Early and Late Stage Chronic Allograft Nephropathy by Proteogenomic Profiling of Peripheral Blood. *PLoS ONE*, *4*(7), e6212. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006212>
- Lee, C., Park, J. H., Suh, J. H., Kim, H. W., & Moon, K. C. (2014). C4d Immunoreactivity of Intraoperative Zero-Hour Biopsy in Renal Allograft. *Transplantation Proceedings*, *46*(10), 3367–3370. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.08.046>
- Li, Y., Hahn, D., Zhong, X. Y., Thomson, P. D., Holzgreve, W., & Hahn, S. (2003). Detection of donor-specific DNA polymorphisms in the urine of renal transplant recipients. *Clinical Chemistry*, *49*(4), 655–658.
- Liaskou, E., Wilson, D. V., & Oo, Y. H. (2012). Innate Immune Cells in Liver Inflammation. *Mediators of Inflammation*, *2012*, 1–21. <https://doi.org/10.1155/2012/949157>
- Lim, M. A., Kohli, J., & Bloom, R. D. (2017). Immunosuppression for kidney transplantation: Where are we now and where are we going? *Transplantation Reviews*, *31*(1), 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2016.10.006>
- Lim, W. H., Chadban, S. J., Clayton, P., Budgeon, C. A., Murray, K., Campbell, S. B., ... McDonald, S. P. (2012). Human leukocyte antigen mismatches associated with increased risk of rejection, graft failure, and death independent of initial

- immunosuppression in renal transplant recipients. *Clinical Transplantation*, 26(4), e428–e437. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0012.2012.01654.x>
- Lima, H. C. (2006). Papel das células T reguladoras no desenvolvimento de dermatoses. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 81(3), 269–281. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962006000300010>
- Lindahl, K. F., & Wilson, D. B. (1977). Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes. II. Estimates of the frequency and specificity of precursors. *Journal of Experimental Medicine*, 145(3), 508–522. <https://doi.org/10.1084/jem.145.3.508>
- Liu, Y., Pejchinovski, M., Wang, X., Fu, X., Castelletti, D., Watnick, T. J., ... Serra, A. L. (2018). Dual mTOR/PI3K inhibition limits PI3K-dependent pathways activated upon mTOR inhibition in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Scientific Reports*, 8(5584), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22938-x>
- Lo, D. J., Weaver, T. A., Kleiner, D. E., Mannon, R. B., Jacobson, L. M., Becker, B. N., ... Kirk, A. D. (2011). Chemokines and their Receptors in Human Renal Allotransplantation. *Transplantation*, 91(1), 70–77. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181fe12fc>
- Lorenz, M., Regele, H., Schillinger, M., Exner, M., Rasoul-Rockenschaub, S., Wahrmann, M., ... Böhmig, G. A. (2004). Risk factors for capillary C4d deposition in kidney allografts: evaluation of a large study cohort. *Transplantation*, 78(3), 447–452. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000128344.94808.03>
- Male, D., Roth, D., & Roitt, I. (2006). *Immunology* (7<sup>a</sup> Edição, Vols. 1–563). Elsevier Ltd.



- Manfro, R. C., Gonçalves, L. F. S., & Saitovitch, D. (1999). Revisão/Atualização em Transplante Renal: Progressos na indução de tolerância em transplantes humanos. *J. Bras. Nefrol*, *21*(3), 130–142.
- Manz, B. N., Jackson, B. L., Petit, R. S., Dustin, M. L., & Groves, J. (2011). T-cell triggering thresholds are modulated by the number of antigen within individual T-cell receptor clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(22), 9089–9094. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018771108>
- Marsh, S. G. E., Albert, E. D., Bodmer, W. F., Bontrop, R. E., Dupont, B., Erlich, H. A., ... Trowsdale, J. (2010). Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens*, *75*(4), 291–455. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2010.01466.x>
- Mason, D. (1998). A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunology Today*, *19*(9), 395–404. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(98\)01299-7](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(98)01299-7)
- Moraes-Vieira, P. M. M., Bassi, Ê. J., Araujo, R. C., & Câmara, N. O. S. (2012). Leptin as a link between the immune system and kidney-related diseases: leading actor or just a coadjuvant? *Obesity Reviews*, *13*(8), 733–743. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2012.00997.x>
- Pereira, A. B., Rezende, N. A. de, Teixeira Junior, A. L., Teixeira, M. M., & Simões e Silva, A. C. (2009). Citocinas e quimiocinas no transplante renal. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, *31*(4), 286–296. <https://doi.org/10.1590/S0101-28002009000400007>
- Priyadharshini, B., Greiner, D. L., & Brehm, M. A. (2012). T cell activation and transplantation tolerance. *Transplantation Reviews (Orlando, Fla.)*, *26*(3), 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2011.09.002>

- Requião-Moura, L. R., Matos, A. C. C. de, & Pacheco-Silva, A. (2015). Cytomegalovirus infection in renal transplantation: clinical aspects, management and the perspectives. *Einstein (São Paulo)*, *13*(1), 142–148. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RW3175>
- Roedder, S., Vitalone, M., Khatri, P., & Sarwal, M. M. (2011). Biomarkers in solid organ transplantation: establishing personalized transplantation medicine. *Genome Medicine*, *3*(6), 1–12. <https://doi.org/10.1186/gm253>
- Romagnani, P., & Crescioli, C. (2012). CXCL10: A candidate biomarker in transplantation. *Clinica Chimica Acta*, *413*(17), 1364–1373. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.02.009>
- Rossini, A. A., Greiner, D. L., & Mordes, J. P. (1999). Induction of Immunologic Tolerance for Transplantation. *Physiological Reviews*, *79*(1), 99–141. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.99>
- Sawitzki, B., Schlickeiser, S., Reinke, P., & Volk, H.-D. (2011). Monitoring tolerance and rejection in organ transplant recipients. *Biomarkers*, *16*(sup1), S42–S50. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2011.578754>
- Sayegh, M. H., & Carpenter, C. B. (2004). Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises. *The New England Journal of Medicine*, *351*(26), 2761–2766. <https://doi.org/10.1056/NEJMon043418>
- Sayegh, M. H., & Turka, L. A. (1998). The Role of T-Cell Costimulatory Activation Pathways in Transplant Rejection. *New England Journal of Medicine*, *338*(25), 1813–1821. <https://doi.org/10.1056/NEJM199806183382506>
- Smith, R. N., & Colvin, R. B. (2012). Chronic alloantibody mediated rejection. *Seminars in Immunology*, *24*(2), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2011.09.002>

- Somasundaran, M., & Quiroga, I. (2011). Principles in transplantation: immunology. *Surgery (Oxford)*, 29(7), 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2011.05.002>
- Szeto, C.-C., Chan, R. W.-Y., Lai, K.-B., Szeto, C. Y.-K., Chow, K.-M., Li, P. K.-T., & Lai, F. M.-M. (2005). Messenger RNA expression of target genes in the urinary sediment of patients with chronic kidney diseases. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 20(1), 105–113. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfh574>
- Talaat, R. M., Mohamed, S. F., Bassyouni, I. H., & Raouf, A. A. (2015). Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. *Cytokine*, 72(2), 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.12.027>
- Teppo, A.-M., Honkanen, E., Finne, P., Törnroth, T., & Grönhagen-Riska, C. (2004). Increased urinary excretion of alpha1-microglobulin at 6 months after transplantation is associated with urinary excretion of transforming growth factor-beta1 and indicates poor long-term renal outcome. *Transplantation*, 78(5), 719–724. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000131816.51366.6b>
- Thaunat, O. (2012). Humoral immunity in chronic allograft rejection: Puzzle pieces come together. *Transplant Immunology*, 26(2–3), 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2011.11.003>
- Thaunat, O., Patey, N., Caligiuri, G., Gautreau, C., Mamani-Matsuda, M., Mekki, Y., ... Nicoletti, A. (2010). Chronic Rejection Triggers the Development of an Aggressive Intragraft Immune Response through Recapitulation of Lymphoid Organogenesis. *The Journal of Immunology*, 185(1), 717–728. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903589>
- Trivedi, H. L. (2007). Immunobiology of Rejection and Adaptation. *Transplantation Proceedings*, 39(3), 647–652. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2007.01.047>

- Valente, J. F., Hariharan, S., Peddi, V. R., Schroeder, T. J., Ogle, C. K., Alexander, J. W., & First, M. R. (1997). Causes of renal allograft loss in black vs. white transplant recipients in the cyclosporine era. *Clinical Transplantation*, *11*(3), 231–236.
- Valenzuela, N. M., & Reed, E. F. (2013). Antibodies in Transplantation: The Effects of HLA and Non-HLA Antibody Binding and Mechanisms of Injury. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1034*, 1–26. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-493-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-493-7_2)
- Vivier, E., & Malissen, B. (2005). Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nature Immunology*, *6*(1), 17–21. <https://doi.org/10.1038/ni1153>
- Vukmanovic-Stejic, M., Vyas, B., Gorak-Stolinska, P., Noble, A., & Kemeny, D. M. (2000). Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood*, *95*(1), 231–240.
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., ... Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science (New York, N.Y.)*, *322*(5899), 271–275. <https://doi.org/10.1126/science.1160062>
- Wood, K. J., & Goto, R. (2012). Mechanisms of Rejection: Current Perspectives. *Transplantation*, *93*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31823cab44>
- Wood, K. J., & Sakaguchi, S. (2003). Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nature Reviews. Immunology*, *3*(3), 199–210. <https://doi.org/10.1038/nri1027>
- Zachary, A. A., & Leffell, M. S. (2010). Barriers to successful transplantation of the sensitized patient. *Expert Review of Clinical Immunology*, *6*(3), 449–460. <https://doi.org/10.1586/eci.10.14>

- Zakrzewski, J. L., van den Brink, M. R. M., & Hubbell, J. A. (2014). Overcoming immunological barriers in regenerative medicine. *Nature Biotechnology*, *32*(8), 786–794. <https://doi.org/10.1038/nbt.2960>
- Zeng, Q., Ng, Y.-H., Singh, T., Jiang, K., Sheriff, K. A., Ippolito, R., ... Chalasani, G. (2014). B cells mediate chronic allograft rejection independently of antibody production. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(3), 1052–1056. <https://doi.org/10.1172/JCI70084>