

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

**Avaliação molecular das disfunções subclínicas do enxerto renal.
Quantificação gênica de Perforina, TIM3, FOXP3, TGF- β , CTGF e CD138 no
sangue periférico de pacientes com função estável que realizaram biópsia
protocolar no terceiro mês após o transplante renal.**

Gabriel Joelsons

Porto Alegre

2014

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

**Avaliação molecular das disfunções subclínicas do enxerto renal.
Quantificação gênica de Perforina, TIM3, FOXP3, TGF- β , CTGF e CD138 no
sangue periférico de pacientes com função estável que realizaram biópsia
protocolar no terceiro mês após o transplante renal.**

Gabriel Joelsons

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ceratti
Manfro

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas, UFRGS, como requisito para
obtenção do título de Doutor

Porto Alegre

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Joelsons, Gabriel

Avaliação molecular das disfunções subclínicas do enxerto renal. Quantificação gênica de Perforina, TIM3, FOXP3, TGF- β , CTGF e CD138 no sangue periférico de pacientes com função estável que realizaram biópsia protocolar no terceiro mês após o transplante renal. / Gabriel Joelsons. -- 2014.

85 f.

Orientador: Roberto Ceratti Manfro.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Transplante renal. 2. rejeição aguda. 3. expressão gênica. 4. diagnóstico. 5. mRNA. I. Manfro, Roberto Ceratti, orient. II. Título.

Banca Examinadora

Elizete Keitel

Francisco José Veríssimo Veronese

Giovani Gadonski

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro, um agradecimento especial. Obrigado pela oportunidade de trabalharmos juntos, por nunca ter deixado faltar nada para que eu fosse capaz de realizar este trabalho e principalmente pela dedicação demonstrada em todas as etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr Francisco José Veríssimo Veronese, chefe do serviço de Nefrologia, pelo auxílio, pelo exemplo e pela amizade.

À Dra Rosangela Montenegro Munhoz, ao Dr Riad Abdel Hadi e ao Dr Fabio Spuldaro pelo suporte na realização das biópsias e acompanhamento dos pacientes.

À Dra Adriana Reginato Ribeiro e Dr Rodrigo Fontanive Franco e toda equipe do transplante renal que me auxiliou na marcação das biópsias e realizou acompanhamento dos pacientes.

À Tuany Di Domenico por toda a ajuda com as coletas, processamento, análises, organização, banco de dados, trabalho de bancada, redação de trabalhos científicos e suporte nos momentos difíceis.

Às minhas estagiárias Thais Hain, Greice Ferreira, Maysa Lucena e Fernanda Almerón de Souza por todo auxílio durante estes 4 anos.

Às secretárias do serviço de Nefrologia do HCPA Jussara Cruz, Jaqueline da Rosa e Cristina Dal Pra por estarem do meu lado há quase 10 anos me ajudando sempre que possível e me dando o suporte necessário para a concretização desta jornada.

Às colegas Bárbara Alemar, Cleandra Gregório e Patrícia Garcia Rodrigues que me estenderam a mão em um momento de muita necessidade auxiliando na realização das PCRs.

À Ursula Matte e Patricia Koehler pela ajuda e empréstimo de materiais em momentos de extrema urgência.

À Vera Susana Ribeiro do PPG-CM por todo o auxílio nestes últimos 7 anos estando sempre ao meu lado e constantemente me lembrando das minhas pendências.

Finalmente, gostaria de agradecer à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, à CAPES pela oportunidade de realizar mais uma etapa na minha formação profissional e à FAPERGS por ajudar no custeio da minha tese de doutorado.

Agradecimentos Especiais

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais Jaques e Magali pelo amor e carinho, pois sempre me deram toda a estrutura e suporte necessários e sem eles nada disso seria possível.

A minha irmã Patrícia, por ser uma das minhas maiores incentivadoras e ser sempre um exemplo de dedicação.

A minha esposa Bruna pelo seu amor, paciência, parceria e auxílio em todos os momentos, principalmente nos mais críticos quando parecia que o tempo era um inimigo. Sem você ao meu lado este projeto não teria sido concluído.

A todos, meu mais sincero obrigado.

*“A vida resulta da sobrevivência não-aleatória de replicadores aleatoriamente
mutantes”*

“Science is the poetry of reality”

(Richard Dawkins)

Resumo

Introdução: A sobrevivência em curto prazo dos transplantes renais tem melhorado notavelmente nas últimas duas décadas. No entanto, a sobrevivência em longo prazo de enxertos e pacientes ainda são muito inferiores ao desejado e a maioria dos enxertos são perdidos por falecimento dos receptores e deterioração crônica da função do enxerto. Acredita-se que a maior parte das lesões que resultam em encurtamento da sobrevida do enxerto se iniciam logo após o transplante e muitas vezes são subclínicas. O desenvolvimento de biomarcadores não invasivos para identificar com precisão as lesões sub-clínicas, sem a necessidade de biópsias de protocolo, seria um grande passo para a prática clínica de transplantes de órgãos, uma vez que permitiria o reconhecimento precoce de eventos de agressões ao enxerto e poderia levar a adequadas ações terapêuticas potencialmente propiciando sobrevida mais prolongada dos aloenxertos.

Objetivos: O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial diagnóstico de agressões sub-clínicas da análise molecular não-invasiva da expressão gênica de leucócitos do sangue periférico em receptores de transplante renal com função estável em curto prazo.

Métodos: Cento e trinta e seis pacientes renais com função estável do enxerto foram arrolados no estudo e realizaram biópsia protocolar no 3º mês pós-transplante. Foram coletadas amostras de sangue periférico concomitantemente para realizarmos a quantificação da expressão gênica de perforina, TIM3, FOXP3, TGF-B, CTGF e CD138 através da metodologia de PCR em tempo real.

Resultados: Trinta e nove pacientes foram diagnosticados com rejeição aguda (28,7%), sendo 33 destes com alterações borderline, 5 com rejeição aguda Banff IA e um paciente com rejeição Banff IB, vinte pacientes apresentaram fibrose intersticial e atrofia tubular (14,7%), sete apresentaram necrose tubular aguda (5,1%), três infecções pelo vírus do poliomá (2,2%) e um caso de nefrotoxicidade aguda por inibidores da calcineurina (0,8%). A mensuração da expressão gênica foi realizada através de qPCR e os pacientes com disfunção do enxerto apresentaram expressões diminuídas de perforina, TIM3, FOXP3 e

TGF- β em relação aos pacientes com rejeição aguda e histologia normal do enxerto. Outras análises demonstraram que a perforina, TIM3 e FOXP3 também são capazes de excluir o diagnóstico de rejeição aguda, com valores preditivos negativos (VPN) de 83%, 83% e 79,6%, respectivamente. Em uma análise combinada dos 3 genes associados o VPN para rejeição aguda foi de 86.4%. A avaliação do RNA mensageiro dos genes TGF-B e CTGF mostrou que eles estão hiperexpressos nos enxertos com fibrose intersticial e atrofia tubular.

Conclusões: Existe uma elevada incidência de agressões sub-clínicas dos enxertos renais que podem ser detectadas por biópsias protocolares. A mensuração do RNA mensageiro, em amostras do sangue periférico, mostrou ser uma ferramenta de potencial utilidade em identificar essas agressões de forma não-invasiva.

Palavras-Chave: Transplante renal, rejeição aguda, expressão gênica, diagnóstico, mRNA

Abstract

Background: Short term survival of kidney transplants has improved remarkably over the last two decades. However, long term survival of grafts and patients are still much lower than desired and most of the grafts are lost by recipients' death and chronic graft function deterioration. It is believed that most of the injuries that result in graft shortening survival are initiated early after transplantation and many times are subclinical. The development of non-invasive biomarkers to accurately identify sub-clinical injuries, without the need of protocol biopsies, would be a major step forward in the practice of clinical organ transplantation since it would allow the early recognition of graft insulting events and lead to proper therapeutic actions potentially leading to more prolonged allograft survivals

Objective: The aim of the present study was to evaluate the diagnosis potential of the non-invasive molecular analyzes of peripheral blood leukocytes gene expression in stable kidney recipients in the short-term.

Methods: One hundred and thirty-six patients were enrolled in this study and underwent protocol biopsies at 3 months after grafting. Peripheral blood samples were collected concomitantly for the gene expression quantitation of perforin, TIM3, FOXP3, TGF-B, CTGF and CD138 through qPCR methodology.

Results: Thirty-nine patients were diagnosed as acute rejection (28.7%), being 33 with borderline histological changes, 5 Banff IA acute rejection and 1 patient with Banff IB acute rejection, twenty patients had interstitial fibrosis and tubular atrophy (14.7%), seven had acute tubular necrosis (5.1%), three had poliomyavirus infection (2.2%) and one patient had calcineurin inhibitor toxicity (0.8%). Gene expression was measured through qPCR and patients with graft dysfunction presented lower expressions of perforin, TIM3, FOXP3 and TGF- β than patients with acute rejection and normal graft histology. Other analyzes showed that perforin, TIM3 and FOXP3 are also able to rule out acute rejection, with negative predictive values (NPV) of 83%, 83% and 79.6% respectively. In a combined analysis of the 3 genes associated the NPV was 86.4%. CTGF and TGF-B mRNA were overexpressed in grafts with interstitial fibrosis and tubular atrophy.

Conclusions: An elevated incidence of sub-clinical injuries can be detected by protocol biopsies of stable grafts. The evaluation of mRNA in the peripheral blood has shown to be a potentially useful tool to uncover these injuries non-invasively.

Keywords: Kidney transplantation, acute rejection, gene expression, diagnosis, mRNA

Lista de Quadros

Quadro 1. Etapas de desenvolvimento e validação de biomarcadores.....	29
--	-----------

Lista de Figuras

Figura 1. Alorreconhecimento antigênico e vias de transdução do sinal intracelular.....	20
Figura 2. Mecanismos efetores da rejeição alogeneica	21
Figura 3. Principais metodologias aplicadas.....	32
Figura 4. Amplificação da reação de PCR e gráficos box-plot da expressão gênica de Perforina.....	35
Figura 5. Comparação das tecnologias de Microarranjos e PCR em Tempo Real.....	44

Lista de Abreviaturas

Sigla	Significado
APC	Células Apresentadoras de Antígeno
CPH	Complexo principal de histocompatibilidade
CTL	Linfócitos T Citotóxicos
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IC	Inibidores de calcineurina
DGF	Disfunção Inicial do enxerto
IFTA	Fibrose Intersticial e atrofia tubular!
IL	Interleucina
IRA	Insuficiência renal aguda
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NTA	Necrose tubular aguda
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
RA	Rejeição aguda
RAC	Rejeição aguda celular
RASC	Rejeição aguda sub-clínica
RMA	Rejeição mediada por anticorpos
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
TCR	Receptor de célula T
Treg	Células T Regulatórias

Sumário

1	Introdução.....	15
2	Revisão da Literatura.....	17
2.1	Transplante renal.....	17
2.2	Processos imunobiológicos envolvidos no transplante renal.....	17
2.2.1	Alorreconhecimento por linfócitos T.....	18
2.2.2	Coestimulação.....	19
2.2.3	IL-2 e o terceiro sinal.....	20
2.2.4	Diferenciação das células T.....	20
2.2.5	Ativação e função das células B.....	21
2.2.6	Células T citotóxicas.....	22
2.3	Agressões ao enxerto renal.....	23
2.3.1	Rejeição aguda.....	24
2.3.2	Rejeição aguda sub-clínica.....	26
2.4	Diagnóstico das disfunções do enxerto.....	27
2.5	Biomarcadores e métodos moleculares no diagnóstico da rejeição aguda.....	29
2.5.1	PCR em tempo real.....	32
2.5.2	Microarrays – Microarranjos.....	41
2.6	Perspectivas no uso dos testes moleculares em transplante renal.....	44
3	Objetivos.....	48
3.1	Objetivo principal.....	48
3.2	Objetivos secundários.....	48
4	Referências bibliográficas da revisão.....	49
5	Artigo em inglês.....	56
6	Considerações finais.....	84
7	Anexos.....	86

1 Introdução

O objetivo do presente estudo foi avaliar as agressões sub-clínicas ao enxerto renal no terceiro mês pós-transplante através de exames histopatológicos e moleculares, a fim de compreender a incidências destes eventos na população local e aprimorar técnicas de diagnóstico molecular não-invasivo, com a finalidade de se tornar uma ferramenta aplicável na rotina clínica. Cento e trinta e seis pacientes com função estável no terceiro mês foram submetidos à biópsia renal e foram avaliados histologicamente. Destes, cento e oito foram avaliados molecularmente de maneira minimamente invasiva através de análises em sangue periférico após realizarem a biópsias protocolar para que os resultados pudessem ser avaliados. Destes 136 pacientes, mais de 50% tiveram disfunção inicial do enxerto (DGF), 39 pacientes foram diagnosticados com rejeição aguda (6 pacientes; 4,5%) e/ou alterações borderline (33 pacientes; 24,3%), 20 pacientes apresentaram sinais de fibrose, 7 pacientes demonstraram achados relativos à tubulite, 3 pacientes acometidos de infecção pelo vírus do poliomia e 1 paciente com diagnóstico de toxicidade medicamentosa pelo imunossupressor. Pacientes com histologia normal nas biópsias obtiveram médias de creatininas mais baixas e taxas de filtração glomerular estimadas mais elevadas.

Quanto à análise da expressão gênica, as medianas de perforina, TIM3, FOXP3 e TGF-B foram significativamente menores no grupo de outras disfunções do que em relação ao grupo de rejeição e histologia normal, se tornando uma potencial ferramenta no acompanhamento e manejo de pacientes transplantados, principalmente nos casos de DGF, onde biópsias seriadas se fazem necessárias. A avaliação molecular serviria como uma ferramenta de monitorização mais frequente. Outro ponto interessante foram os parâmetros diagnósticos encontrados nas análises. Os genes da perforina, TIM3 e FOXP3 obtiveram valores preditivos negativos bastante interessantes (83%, 83%, 79,6%, respectivamente) e quando combinados em uma análise chegaram à 86,4%, significando ser um ótimo teste para descartar a possibilidade de rejeição aguda.

Concluindo, a abordagem molecular mostrou-se muito útil para exclusão do diagnóstico de rejeição e também ao diferenciar disfunções com componentes de fibrose intersticial e atrofia tubular de outras causas de disfunções dos enxertos renais.

2 Revisão da Literatura

2.1 Transplante Renal

Os primeiros transplantes renais exitosos foram realizados em Boston e Paris há quase 60 anos. Os transplantes foram considerados terapias experimentais até que o uso da imunossupressão farmacológica e biológica, na década de 1960, os tornasse procedimentos terapêuticos eficazes fazendo com que, a partir de um determinado momento, fossem a melhor alternativa terapêutica para indivíduos com doença renal crônica terminal, oferecendo-lhes maior sobrevida e melhor qualidade de vida quando comparado às terapias de substituição da função renal com diferentes modalidades de diálise (Wolfe et al, 1999, Courtney et al, 2009).

Atualmente a meia-vida de enxertos provenientes de doadores falecidos se encontra em torno de 8-9 anos, doadores falecidos de critérios expandidos em torno de 6 anos e a de doadores vivos permanece em aproximadamente 11 anos de meia-vida desde o final da década de 80. Assim sendo, apesar do enorme sucesso atualmente alcançado em curto prazo nas últimas duas décadas, as sobrevidas em médio e longo prazos de enxertos e pacientes estão melhorando apenas lentamente, mas permanecem ainda insatisfatórias. (Lamb et al, 2011)

As causas dessas sobrevidas insatisfatórias podem ser diversas, no entanto, acredita-se que diferentes tipos de agressões sub-clínicas possam ser importantes nesse cenário. Entre as possíveis agressões sub-clínicas, as relacionadas à aloresponsividade, à nefrotoxicidade e às infecções virais possivelmente sejam as mais importantes.

2.2 Processos imunobiológicos envolvidos no transplante renal

As bases imunobiológicas dos processos de rejeição e aceitação dos transplantes de tecidos ou órgãos de indivíduos de mesma espécie começaram

a ser descritas no século passado, tendo seus primeiros relatos realizados por especialistas em tumores. Entretanto, as leis do transplante foram definidas por Medawar e colaboradores (Munn et al, 1998 e Haeney M et al 1995) através de experimentos realizados durante a Segunda Guerra Mundial, os quais postularam que: (a) enxertos do próprio indivíduo eram aceitos (autoenxerto); (b) enxertos de outros indivíduos eram rejeitados (aloenxerto); (c) um segundo aloenxerto igual ao primeiro era rejeitado de forma acelerada, achados estes que corroboraram observações dos investigadores de tumores. (Billingham et al, 1951)

Com a imunologia dos transplantes cada vez mais estudada e melhor compreendida, descobriu-se ser o sistema imunológico o principal protagonista na prática dos transplantes. Sumariamente, as moléculas do sistema HLA (Human Leukocyte Antigen), moléculas polimórficas presentes nas superfícies celulares, são reconhecidas pelo sistema imunológico do receptor do enxerto desencadeando o processo da resposta imunológica da rejeição dos transplantes. Outras moléculas, como os antígenos secundários, também são importantes no processo de rejeição sendo capazes de desencadear uma resposta imunológica. (Coelho et al, 2007)

2.2.1 Alorreconhecimento por linfócitos T

A primeira etapa da resposta imune adaptativa ao transplante em um receptor sem anticorpos pré-formados às moléculas do doador é o reconhecimento dos aloantígenos pelas células T, também conhecido como alorreconhecimento. (Wood et al, 2012) O alorreconhecimento **direto** é a interação das células T do receptor através do receptor de célula T (TCR) com complexos de MHC-peptídeo alogênicos intactos apresentados por células apresentadoras de antígeno (APC – Antigen Presenting Cell) derivadas do doador, incluindo células dendríticas. Alorreconhecimento **indireto** ocorre quando peptídeos derivados do MHC (Major Histocompatibility Complex) do doador são degradados por mecanismos de processamento de antígeno e apresentados por APCs do receptor. A terceira via de alorreconhecimento,

denominada via **semi-direta**, ocorre pela captura dos complexos MHC-peptídeo do doador por APCs do receptor, ocorrendo uma troca de fragmentos de membrana celular destas células alogênicas, podendo resultar na apresentação de moléculas MHC intactas do doador por APCs do receptor às suas células T. Vide Figura 1.

A apresentação de antígenos pela via direta de alorreconhecimento tem um papel de destaque em iniciar a resposta imune adaptativa em transplantes HLA incompatíveis. Entretanto, o papel desta via na rejeição do enxerto se enfraquece, uma vez que o número de leucócitos recebidos do doador através do órgão transplantado é limitado, permanecendo apenas outros tipos de células do doador capazes de estimular células T pela via direta, como por exemplo, células endoteliais. Em contrapartida, a via indireta estará disponível para apresentação de antígeno enquanto o órgão permanecer *in situ*, tornando-se a via dominante de alorreconhecimento em longo prazo. (Wood et al, 2012)

2.2.2 Co-estimulação

Sinais antígeno-específicos entregues à célula T através de seu TCR-CD3 como consequência de alorreconhecimento não são suficientes para ativar completamente células T “naive”. A interação de moléculas co-estimulatórias com seus ligantes gera um segundo sinal essencial. Estas moléculas co-estimulatórias são divididas basicamente em duas famílias, a família B7 e a família TNF/Receptor TNF (TNFR), onde moléculas CD28, pertencentes à família B7, são responsáveis por aumentar a estabilidade e por consequência a expressão de interleucina-2 (IL-2), promovendo a proliferação celular e resistência a morte celular induzida por apoptose. Outra molécula desta mesma família é responsável pela retro-regulação da resposta imune uma vez que tem afinidade 10-20 vezes maior do que a molécula CD28 e irá atuar competindo pela ligação em moléculas CD80 e CD86 presentes nas APCs. (Li et al, 2009)

2.2.3 IL-2 e o terceiro sinal

Após o reconhecimento do antígeno pelas células T, uma sinapse imunológica é formada, resultando no agrupamento de co-estimulação, sinalização e moléculas de adesão para formar um complexo de ativação supramolecular. A cadeia de sinalização que é desencadeada faz com que fatores de transcrição alterem a expressão de diversos genes, em particular o aumento da expressão do fator de crescimento de célula T IL-2 e seu receptor de alta afinidade IL-2R cadeia α (CD25). Logo após a ativação, a geração de grandes quantidades de IL-2 e outras citocinas pró-proliferativas atuam de modo autócrino e parácrino para gerar o que tem sido descrito como “sinal 3”. A transdução dos sinais de IL-2 promove progressão do ciclo celular e iniciam a expansão clonal e diferenciação em células T ativadas. (Wood et al, 2012)

2.2.4 Diferenciação das células T

Após a ativação, as células T irão se diferenciar em células com capacidades funcionais e citocinas distintas, dependendo dos sinais adicionais recebidos e do seu microambiente. CD4⁺ de classe II geralmente adquirem função auxiliar (Helper, Th) enquanto CD8⁺ de classe I serão normalmente citotóxicas. Outra população de células T que surgem são as células T regulatórias (Treg), que expressam o fator de transcrição FOXP3 e que irão regular/controlar a resposta imune. (Wood et al, 2003)

Outra linhagem celular T CD4 efetora foi designada a partir da descoberta de uma nova família de citocinas, a interleucina 17 (IL-17). A IL-17 foi originalmente descrita e clonada por Rouvier et al. (1993) e subsequentemente renomeada para IL-17A. Esta fração é considerada o protótipo da família das IL-17. Estas células produzem principalmente a IL-17A e a IL-17F, enquanto as demais células da resposta imune inata produzem os outros membros da família. Essa linhagem parece ter evoluído como um braço do sistema imune adaptativo especializado para uma proteção reforçada contra agentes não cobertos completamente pelas células Th1 ou Th2. (Weaver et al, 2007 e Torchinsky et al, 2010) Figura 1.

Figura 1. Alorreconhecimento antigênico e vias de transdução do sinal intracelular.

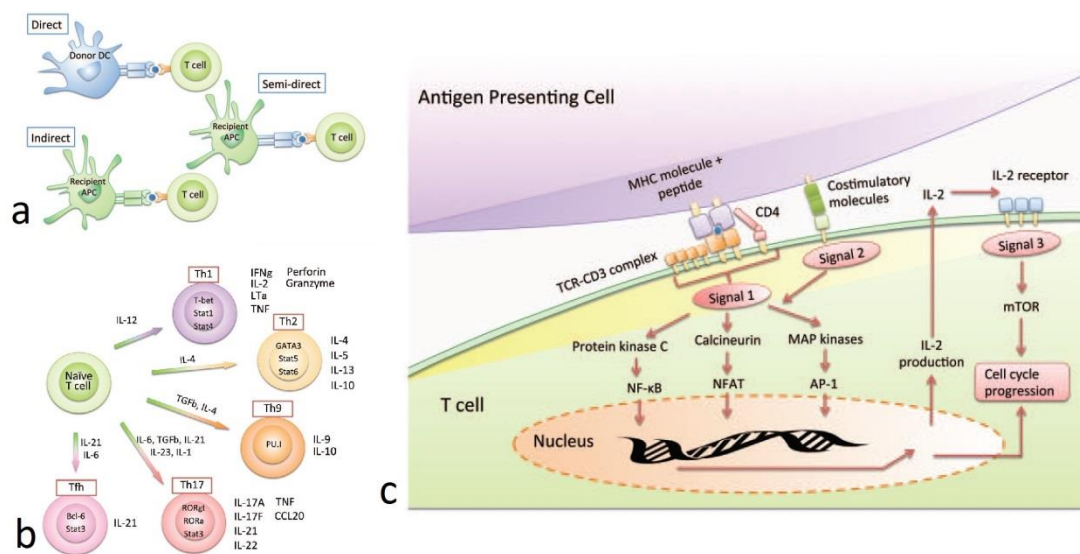


Figura 1. a) Esquema de reconhecimento aloantigênico direto, indireto e semi-direto; b) Vias de diferenciação de células T CD4+; c) Complexos supramoleculares e o modelo de 3 sinais da ativação de células T. – Modificado de Wood et al. 2012

2.2.5 Ativação e função das células B

As células B podem atuar como APCs e diferenciar-se em células produtoras de anticorpos. A maioria das células B é dependente do auxílio das células CD4+ auxiliares para sua ativação e produção de anticorpos. (Tarlington et al, 2008) Como APCs, as células B podem interagir com as células T pelo seu TCR e moléculas co-estimulatórias, criando um aglomerado de células permitindo que as citocinas secretadas pelas células T influenciem a ativação, diferenciação e produção de anticorpos pelas células B. A rejeição mediada por anticorpos pode ser imediata, como a rejeição hiperaguda, quando existem anticorpos anti-HLA do doador pré-formados ou iniciar-se após algum tempo do transplante. Nessa segunda situação ela pode ser aguda, crônica ou crônica em atividade e todas essas formas são bastante deletérias ao enxerto podendo levar a sua perda em curto ou longo prazo. (Wood et al, 2012)

2.2.6 Células T citotóxicas

Células T CD8+ citotóxicas (CTL) são ativadas como resultado da formação de um aglomerado de três células com a célula helper e a APC ou como resultado de um “licenciamento” por células T CD4+ helper das APCs para a ativação das CTLs. Sinais co-estimulatórios CD40/CD154 exercem um papel importante neste processo. CTLs ativadas irão migrar para o local do enxerto onde serão capazes de identificar as células-alvo por reconhecimento alógeno das moléculas de MHC classe I. Após a localização da célula-alvo há liberação de grânulos contendo moléculas citotóxicas como perforina e granzima B e um aumento na expressão da superfície celular de Fas ligante (FasL) e na secreção de mediadores solúveis, como TNF- α . A destruição das células-alvo pelas CTLs ocorre por indução de apoptose. Perforinas polimerizam e se inserem na membrana celular da célula-alvo formando poros que facilitam a entrada de granzima B e outros compostos na célula. Granzima B é uma protease capaz de iniciar apoptose por diversos mecanismos, incluindo a ativação de cascatas de caspase. A ligação de FasL com Fas na superfície da célula-alvo também é capaz de desencadear apoptose através da ativação das caspases. (Wood et al, 2012) As vias de ativação e efetoras da resposta aloimune estão sumarizadas na Figura 2.

Figura 2. Mecanismos efetores da rejeição alógena

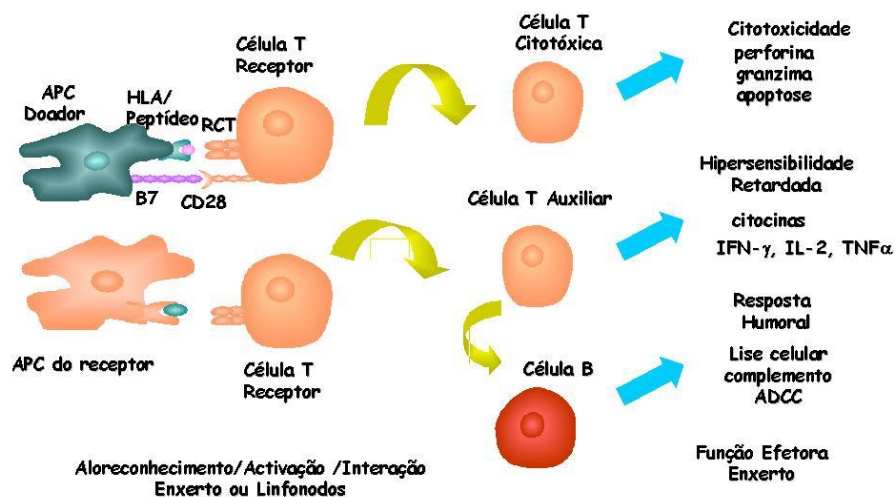


Figura 2. Mecanismos efetores da rejeição alógena. O reconhecimento alógeno, pelos linfócitos T, interações entre células do sistema imune, ativando diversos mecanismos efetores, como: (i) citotoxicidade mediada por células; (ii) reação imunológica de hipersensibilidade retardada (ou tardia); (iii) citotoxicidade mediada por anticorpos.

2.3 Agressões ao enxerto renal

Os fatores determinantes das perdas de enxertos são diversos e destacam-se a aloresponsividade subclínica celular e/ou humoral continuada aos antígenos presentes nos tecidos transplantados, a nefrotoxicidade das drogas imunossupressoras, e mais recentemente a nefropatia produzida pela infecção pelo vírus polioma (Pascual et al, 2002, Prince et al, 2009). Deve também ser considerado que o uso crescente de órgãos de doadores de critérios expandidos, apresentam desde o momento da transplantação fibrose mais significativa, maior probabilidade de rejeição e portanto, maior susceptibilidade aos insultos pró-fibróticos pós-transplante (Audard et al, 2008, Merion et al, 2006).

Além disso, os regimes de imunossupressão atualmente utilizados são, potentes mas ainda assim insuficientes para alguns pacientes, já que ocorrem rejeições agudas e rejeições agudas sub-clínicas. Ademais, outros processos deletérios ao enxerto podem ocorrer. O primeiro deles é a nefrotoxicidade induzida pelos inibidores da calcineurina levando à fibrose intersticial, uma conhecida causa de perda de enxertos renais, acometendo-os de forma universal (Nankivell et al, 2003). Esta nefrotoxicidade é também significativa em receptores de outros órgãos transplantados, levando-os a doença renal crônica e necessidade de terapia dialítica ou de transplante renal (Ojo et al, 2003). O segundo é o aumento na incidência da nefropatia pelo vírus polioma, em especial quando os inibidores de calcineurina são associados a outros imunossupressores potentes como os derivados do ácido micofenólico (Schold et al, 2009). A nefropatia pelo vírus polioma, que é causa de perda de aproximadamente 5% dos enxertos nos EUA, é uma condição relacionada à imunossupressão excessiva e necessita rastreamento e diagnóstico precoces, levando a diminuições significativas da terapia imunossupressora como única forma de tratamento conhecida já que os anti-virais e outras drogas não demonstraram, até o presente momento, eficácia comprovada nesta situação (Dharnidharka et al, 2009, Schold et al, 2009).

As condições acima citadas, nefrotoxicidade por inibidores de calcineurina e nefropatia pelo vírus polioma, são potentes indutoras de fibrose

tecidual do enxerto levando-o a doença renal crônica e necessidade de retorno à terapia dialítica. Este processo de fibrose progressiva foi anteriormente denominado “nefropatia crônica do enxerto”, sua denominação atual é a de fibrose intersticial e atrofia tubular (IFTA do inglês, *interstitial fibrosis and tubular atrophy*) (Solez et al, 2008). Existem evidências que o manejo adequado destas situações com minimização ou retirada dos inibidores da calcineurina podem inibir ou retardar significativamente a instalação dos processos de fibrose e assim manter a função aumentando a sobrevida dos enxertos (Mota et al, 2004). Da mesma forma no manejo da nefropatia pelo vírus polioma, a diminuição importante da intensidade da imunossupressão, diminuindo-se ou retirando drogas, antes que ocorra fibrose significativa, é atualmente a medida mais eficiente no manejo desta condição (Prince et al, 2009).

2.3.1 Rejeição Aguda

As rejeições agudas são atualmente classificadas em rejeições celulares ou mediadas por anticorpos e podem ocorrer isolada ou conjuntamente, em geral com a predominância de um dos componentes (Nankivell et al, 2010).

As rejeições celulares agudas dos transplantes sejam elas clinicamente manifestas ou sub-clínicas são deletérias à sua função e produzem encurtamentos das sobrevidas sendo decorrentes basicamente de imunossupressão insuficiente para o controle da resposta aloimune (Nickerson et al, 1999). Com o uso combinado de fármacos imunossupressores potentes, envolvendo o uso de inibidores de calcineurina (ciclosporina e tacrolimo) e anti-proliferativos, as rejeições celulares tanto as clinicamente manifestas quanto as sub-clínicas tornaram-se menos frequentes (Woodle et al, 2008, Rush et al, 2007). No entanto, em algumas situações a frequência das rejeições permanece elevada como em pacientes sensibilizados aos antígenos HLA, re-transplantados e naqueles com disfunção inicial do enxerto, conjuntamente referidos como pacientes de alto risco imunológico. Este grupo de pacientes é numericamente bastante significativo podendo, no Brasil, chegar a 60-70% dos

receptores de rins de doadores falecidos e a 20-25% dos receptores de rim de doador vivo (Azevedo et al, 2005).

A RA clássica é caracterizada pela rápida diminuição da função do enxerto que é atacado pelo sistema imune do hospedeiro, o qual reconhece e ataca antígenos presentes no órgão do doador. O processo de rejeição inicia-se pelo reconhecimento dos antígenos de histocompatibilidade (aloantígenos) do doador pelos linfócitos T do receptor. O reconhecimento ocorre em órgãos linfóides secundários, onde células apresentadoras de antígeno (monócitos/macrófagos, células dendríticas e células B) estimulam e ativam linfócitos T, que entram em expansão clonal e migram para o enxerto onde irão exercer sua função efetora. No mecanismo de rejeição celular, após a estimulação dos linfócitos, pela interação do TCR com o Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) juntamente com moléculas de adesão e co-estimulação, os complexos TCR/CD3 e CD4 ou CD8 tornam-se fisicamente associados e ativam várias enzimas intracelulares denominadas tirosino-quinases. Estas elevam a concentração de cálcio intracelular e ativam várias proteínas citoplasmáticas regulatórias denominadas fatores de transcrição. Entre esses fatores, destacam-se NF-kB, Oct-1 e NFAT (fator nuclear de células T ativadas), que se ligam a regiões regulatórias dos genes de várias citocinas como interleucinas IL-2 e IL-4, interferon- γ e TNF- α . A ativação da imunidade celular seguida de resposta do tipo hipersensibilidade tardia com a ativação de monócitos/macrófagos e linfócitos citotóxicos parece ser o mecanismo final da agressão celular ao enxerto.

Os linfócitos T CD8+, ou citotóxicos, são os principais efetores do reconhecimento e ataque das células-alvo. Os mediadores citolíticos melhor descritos são a perforina e a granzima, que ficam estocadas no citoplasma desses linfócitos, em grânulos semelhantes aos lisossomos e, quando as células são ativadas, migram para a membrana citoplasmática, fundem-se a ela liberando os grânulos em direção à célula-alvo. Em decorrência do ataque citolítico, a célula alvo pode morrer por necrose (caracterizada por ruptura da membrana plasmática e destruição das organelas) ou apoptose (caracterizada por condensação da cromatina, fragmentação do DNA e bolhas de membrana com citoplasma condensado). Outra via de ataque citotóxico utilizada pelas

células T CD8+ é a indução de morte celular via interação Fas/Fas ligante, que leva à apoptose das células-alvo.(Muthukumar et al, 2003, Muthukumar et al, 2005)

Outros mecanismos ocorrem na rejeição aguda mediada por anticorpos, também chamada de rejeição humoral. De forma resumida, nesse tipo de rejeição ocorre ativação de linfócitos B que se diferenciam em plasmócitos, via estimulação por mediadores solúveis (interleucinas) produzidos por linfócitos T CD4+. Os anticorpos reconhecem seqüências específicas de aminoácidos presentes em antígenos HLA expressos na superfície das células endoteliais do enxerto, ativam a cascata do complemento e levam assim a dano da microcirculação do enxerto. (Bettelli et al, 2007, Gloor et al, 2008)

Mais recentemente foi demonstrado que a injúria causada pelo processo de isquemia e reperfusão no enxerto renal conduz à ativação do sistema imune, levando a processos capazes de afetar a integridade celular, acreditando ser um dos principais responsáveis pela lesão inicial do enxerto e por mediar, em longo prazo mudanças estruturais, incluindo a fibrose intersticial. (Jang et al, 2009)

2.3.2 Rejeição Aguda Sub-Clínica

Por definição, na rejeição aguda sub-clínica (RASC) os enxertos têm função estável e ocorre na presença de infiltrados linfo-monocitários característicos de rejeição aguda. (Rush et al, 2004) Menos descritas, mas também existente, são as rejeições agudas sub-clínicas, mediadas por anticorpos. (Haas et al, 2007) As RASCs são em geral diagnosticadas por biópsias protocolares, obtidas em enxertos com função estável onde são detectados aspectos morfológicos e/ou imuno-histoquímicos característicos das rejeições acima descritas, isoladamente ou em conjunto. A exemplo do que vem ocorrendo com as rejeições agudas clinicamente manifestas, as RASC vêm apresentando incidência decrescente na medida em que regimes imunossupressores mais potentes são utilizados.(Nankivell et al, 2004)

2.4 Diagnóstico das disfunções do enxerto

O diagnóstico de rejeição aguda, assim como das outras causas de disfunção em enxertos renais, é baseado na identificação anatomopatológica de infiltrados de células mononucleares em fragmentos renais obtidos por biópsias de enxertos com disfunção. Através de um consenso internacional de nomenclaturas e critérios específicos, denominado de classificação de Banff (Solez et al, 2008), é realizado o diagnóstico histológico da rejeição do órgão com base em regras empíricas onde as lesões são graduadas de modo semi-quantitativo. Essa análise histológica, a partir de uma biópsia renal, é considerada o “padrão-ouro” no diagnóstico de rejeição do enxerto. Porém, uma vez que essa metodologia é baseada na remoção de fragmentos corticais de natureza focal intra-enxerto, não pode ser considerada uma técnica altamente sensível, além de estar associada à complicações como sangramento, fístula arteriovenosa e perda do enxerto. Ademais, é também um método bastante agressivo e dispendioso.

Apesar de o diagnóstico histopatológico da rejeição correlacionar-se com a sua resposta ao tratamento e com os desfechos do enxerto, sua acurácia nunca pôde ser validada devido a ausência de outra metodologia independente à avaliação da existência de rejeição. (Colvin et al, 1997, Gaber et al, 1996) Entre os diversos aspectos negativos dessa técnica diagnóstica, destacam-se: (a) graduação das lesões realizada de modo arbitrário; (b) variação de representatividade entre fragmentos das punções de biópsia renal; (c) concordância inter-avaliador de apenas 10-50% em relação a gradação das lesões e de 45-70% relacionado ao diagnóstico; (d) reprodutibilidade intra-observador de aproximadamente 80-85%. (Marcussen et al, 1995)

Outras desvantagens desta metodologia são, por exemplo, a dificuldade na realização de diagnóstico diferencial de algumas agressões ao enxerto. Em alguns casos a infecção pelo vírus polioma pode apresentar um quadro histológico muito semelhante a um episódio de rejeição aguda, e em outros a rejeição crônica pode se assemelhar muito à nefrotoxicidade por inibidores da calcineurina. Adicionalmente, a biópsia renal é um método invasivo, caro, com

problemas de representatividade, variabilidade de interpretação e associado a complicações que podem ser bastante sérias. (Colvin et al, 1997)

Os métodos auxiliares ao diagnóstico da RA são igualmente pouco precisos. As dosagens de creatinina, níveis séricos de fármacos imunossupressores e métodos de imagem padecem de falta de acurácia adequada para o diagnóstico das disfunções de causa parenquimatosa. Isso evidencia a clara necessidade do desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, preferencialmente não invasivos, que possam ser utilizados como biomarcadores dos processos inflamatórios, tóxicos e fibróticos que acometem os enxertos renais auxiliando ou até mesmo substituindo o diagnóstico histopatológico.

Médicos com experiência e conhecimento no uso clínico das drogas imunossupressoras e que sejam capazes de manejar adequadamente os atuais métodos diagnósticos são, em geral, capazes de reconhecer e tratar os eventos decorrentes de imunossupressão insuficiente, como a rejeição aguda, ou de imunossupressão excessiva, casos da nefrotoxicidade, e das infecções. (Hirsch et al, 2005, Nankivell et al, 2003) O exercício da prática clínica, assim como o que foi aprendido em modelos experimentais, comprova a noção empírica de que as rejeições devem ser diagnosticadas com a maior precocidade possível e que essa precocidade tem implicação na reversibilidade do processo de rejeição. No entanto, são comuns situações de curso silencioso, nas quais faltam métodos diagnósticos apropriados e que, portanto, cursam sem diagnóstico, muitas vezes levando a processos irreversíveis. Por conseguinte, a comunidade do transplante está atualmente direcionada a desenvolver estratégias seguras, em propiciar baixa incidência de rejeição, de nefrotoxicidade e de infecções virais em um balanço entre a eficácia da imunossupressão e seus efeitos colaterais. Em paralelo, busca-se alcançar a situação ideal, ou seja, o desenvolvimento de tolerância aos antígenos do transplante.

Assim sendo, levando-se em consideração as limitações do método “padrão-ouro” atual e a necessidade de métodos diagnósticos acurados que propiciem diagnósticos precoces, preconiza-se que os ensaios não-invasivos

serão capazes de se tornarem ferramentas para monitorização frequente e efetiva no período pós-transplante. Idealmente, esses ensaios devem ser capazes de detectar: [1] inflamação subclínica do enxerto; [2] fibrose intersticial e atrofia tubular subclínicas; [3] glomerulopatia do transplante subclínica e [4] agressão mediada por anticorpos. A base lógica para a detecção desses processos em estágio sub-clínico serve para a intervenção prévia ao dano causal da perda crônica de função e/ou insuficiência do enxerto. (Nickerson, 2009)

2.5 Biomarcadores e métodos moleculares no diagnóstico da rejeição aguda

Um biomarcador é definido como uma substância ou característica usada como indicador de estado biológico normal ou patológico, que pode ser objetivamente medida, e que reflete a ação das intervenções terapêuticas sobre a atividade da doença. (Biomarkers definition working group, 2001) Existem diversos tipos de biomarcadores que diferem predominantemente no seu objetivo, podendo ser: (a) preditivos, para a identificação do risco de doença; (b) de rastreamento: para a identificação de doença sub-clínica; (c) diagnósticos para o reconhecimento de doença; (d) de estadiamento: para a categorização da gravidade da doença; (e) de prognóstico utilizados para a predição de curso doença da ou da resposta terapêutica. (Bestard et al, 2004)

Na prática dos transplantes renais, biomarcadores são usados corriqueiramente para o acompanhamento da evolução do enxerto. Utilizamos marcadores de função e agressão ao enxerto, como a creatinina, proteinúria, métodos de imagem, anticorpos anti-HLA e biópsias protocolares ou de vigilância. Entretanto, esses biomarcadores utilizados na clínica apresentam deficiências tais como, falta de sensibilidade, serem tardios, invasivos e algumas vezes caros.

Adicionalmente, há situações nas quais existe necessidade de maior refinamento diagnóstico como os enxertos sob risco aumentado de rejeições, os estados de imunossupressão excessiva, a ocorrência de fibrose tecidual,

propiciar segurança da minimização e conversões da terapia imunossupressora e a identificação do desenvolvimento de tolerância aos aloantígenos. Atualmente, o processo de desenvolvimento e validação de biomarcadores é bastante complexo e visa assegurar que o teste em questão tenha utilidade clínica. (Azuaje et al, 2009) Vide Quadro 1.

Quadro 1. Etapas de desenvolvimento e validação de biomarcadores

1. Seleção do biomarcador (ou conjunto de biomarcadores)
 2. Coorte de validação
 - Estudo piloto
 - Validação metodológica
 - Validação clínica
 3. Coorte de aprendizado
 4. Coorte de confirmação
 5. Confirmações por outros grupos
 6. Ensaios guiados (multicêntricos)
 7. Impacto nos resultados clínicos
-

O sistema histopatológico de uso corrente, a classificação Banff, possui critérios que se correlacionam com desfechos, porém as decisões são arbitrárias e devem ser revistas por novos métodos de avaliação transcricional, presentemente denominado transcriptômica, que desta forma representa referencial independente. (Reeve et al, 2009) A aplicação clínica das análises moleculares é também pertinente para que o entendimento de todo o transcriptoma forneça conhecimentos mais aprofundados das bases mecânicas das disfunções dos enxertos, da rejeição e de possíveis estados de tolerância. Estratégias complementares utilizando-se biomarcadores baseados em amplificação de ácidos nucleicos devem possibilitar no futuro o desenvolvimento do manuseio personalizado tanto do ponto de vista diagnóstico como de orientação terapêutica. (Strom et al, 2005)

Em etapas subsequentes, essas ferramentas deverão identificar condições patológicas sem a necessidade dos procedimentos invasivos e assim propiciar uma avaliação confiável do estado imune do receptor permitindo a individualização da terapia imunossupressora. O aperfeiçoamento do entendimento dos mecanismos da resposta aloimune levou a que fossem testados marcadores moleculares de genes candidatos para a avaliação do transplantado renal. Posteriormente, novos estudos focaram em padrões de expressão em testes não-invasivos de fluidos biológicos de acesso facilitado, como urina e sangue periférico. (Aquino-Dias et al, 2008, Vasconcellos et al, 1998, Li et al, 2001, Renesto et al, 2007)

As ferramentas diagnósticas não invasivas apresentam diversas vantagens, que incluem principalmente a possibilidade de uso frequente e sequencial, facilitando a avaliação do estado imune do receptor. Assim sendo os parâmetros moleculares poderão vir a servir para direcionar a minimização da imunossupressão e sua individualização. Abordagens moleculares que incorporem um conjunto de marcadores podem vir a funcionar não apenas como uma metodologia substitutiva para o procedimento invasivo da biópsia tecidual, como também poderá fornecer informações preditivas, diagnósticas e prognósticas e prover a compreensão da fisiopatologia das diferentes causas de disfunção do enxerto. (Flechner et al, 2004)

Adicionalmente, conforme já demonstradas em estudos clínicos, as avaliações moleculares propiciam a vantagem inequívoca de detectar o processo de agressão em sua fase de montagem, antes que tenha ocorrido deterioração funcional. Da mesma forma, as perturbações moleculares devem também preceder as alterações histológicas. (Nickerson, 2009, Flechner et al, 2004) Embora esta última afirmação possa ser vista como uma vantagem, ela é também um empecilho à validação adequada dos testes moleculares no cenário clínico em que a biópsia é usada como o padrão-ouro.

Os métodos moleculares surgiram como potencialmente adequados para o diagnóstico das disfunções dos enxertos renais. Nas fases iniciais do desenvolvimento clínico dos testes moleculares, em especial da RT-PCR, ela foi utilizada em tecido de aloenxertos, sendo posteriormente aplicados em

amostras não invasivas, sangue periférico e células do sedimento urinário. Os métodos atualmente empregados na pesquisa em transplantes renais são a reação em cadeia da polimerase em tempo-real (RT-PCR) os micro-arranjos de DNA e mais recentemente os micro-RNAs.

Diversos estudos demonstraram a utilidade da mensuração da expressão gênica de genes relacionados ao ataque citolítico ao enxerto em tecido renal, (Aquino-Dias et al, 2008) células do sangue periférico (Vasconcellos et al, 1998) e células do sedimento urinário.(Li et al, 2001, Renesto et al, 2007) Mais recentemente, alguns estudos utilizando a técnica de microarranjos também foram capazes de prever episódios de rejeição aguda baseados em padrões de expressão gênica em relação a pacientes normais e com outras causas de disfunção. (Reeve et al, 2009, Flechner et al, 2004, Brouard et al, 2007) Assim sendo, fica claro que até o presente momento os métodos moleculares foram testados predominantemente para o diagnóstico de RA de transplantes renais. Figura 3.

2.5.1 PCR em tempo real

PCR em tempo real é uma reação quantitativa altamente sensível e que permite a quantificação de transcritos raros e de pequenas variações na expressão gênica. O sistema da PCR em tempo real é baseado na detecção e quantificação de um repórter fluorescente cuja quantidade aumenta de forma diretamente proporcional às quantidades do produto molecular amplificado na reação. Pelo registro da quantidade de fluorescência emitida a cada ciclo, é possível monitorar a reação da RT-PCR durante sua fase exponencial, onde o aumento significativo dos produtos amplificados se correlaciona com a quantidade inicial do produto (*template*) específico, marcador de um gene em particular, a ser avaliado. (Livak et al, 1995)

Figura 3. Principais metodologias aplicadas

Autor (ref)	Ano	n amostras / pacientes	Compartimento	Metodologia	Marcadores
Vasconcellos	1998	31/25	Tecido e SP	RT-PCR	Perforina, Granzima B e FasL
Van Kooten	1998	8/6	Tecido	RT-PCR	IL-17
Li	2001	24/22	Urina	RT-PCR	Perforina, Granzima B
Sarwal	2003	67/50	Tecido	microarranjos	n/a
Flechner	2004	44/44	Tecido e SP	microarranjos	n/a
Dias	2004	35/35	Tecido	RT-PCR	Perforina, Granzima B, FasL
Muthukumar	2005	83/83	Urina	RT-PCR	FOXP3, CD25, CD3 e Perforina
Renesto	2007	72/72	Urina	RT-PCR	TIM3 e IFN-gamma
Brouard	2007	91/91	SP	microarranjos	n/a
Bunnag	2008	83/83	Tecido	RT-PCR	FOXP3
Aquino-Dias	2008	48/35	Tecido, SP e Urina	RT-PCR	Perforina, Granzima B, FasL, PI9 e FOXP3
Manfro	2008	160/115	Tecido, SP e Urina	RT-PCR	TIM3
Sui	2008	3/3	Tecido	microarranjos, RT-PCR	20 miRNAs diferentes
Reeve	2009	186/143	Tecido	microarranjos	n/a
Anglicheau	2009	33/32	Tecido e SP	microarranjos, RT-PCR	miR-142-5p, miR-155, miR-223
Newell	2010	100/100	SP e Urina	microarranjos, RT-PCR	<i>Granzima B, Perforina, PI9, FoxP3, CTLA 4, TGFB, CTGF, IP10, MIG e CXCR3</i> TGF-B, TNF-a, MCP1, RANTES,
Viklicky	2010	64/64	Tecido	RT-PCR	FOXP3, Granzima B, Perforina e HMOX1 e outros
Lorenzen	2011	88/81	Urina	RT-PCR	miR-10a, miR-10b, miR-210 Vimentina, HGF, Fibronectina,
Anglicheau	2012	114/114	Urina	RT-PCR	Perforina, TGF-B1, TIMP-1 , Granzima B e outros
Hricik	2013	2095/282	Urina	RT-PCR	CCR1, CCR5, CXCR3, CCL5 (RANTES), CXCL9, CXCL10 (IP-10), IL-8, perforin and granzyme B
Suthanthiran	2013	3559/465	Urina	RT-PCR	CD3ε, perforin, granzyme B, proteinase inhibitor 9, CD103, IP-10, CXCR3, and TGF-β1

Modificada de Anglicheau, 2008.

A técnica quantitativa eliminou a variabilidade inerente à técnica da PCR convencional, semi-quantitativa, e permitiu a quantificação confiável de produtos de PCR na rotina clínica. Atualmente, essa técnica é comumente

utilizada para determinar a expressão gênica de mRNAs e seus níveis de expressão. As análises podem ser absolutas, como no número de cópias de mRNA pela comparação a uma curva padrão, ou relativas a um calibrador pela análise por curva padrão ou pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (Livak et al, 2001)

Diversos mecanismos celulares que dizem respeito à sobrevivência, crescimento e diferenciação, são refletidos por padrões alterados de expressão gênica e a habilidade de quantificar níveis transcricionais de genes específicos é de fundamental importância para qualquer pesquisa sobre a expressão gênica. A PCR em tempo real (RT-PCR) é um método de amplificação enzimática *in vitro* de sequências definidas de cDNA, podendo ser utilizado para comparar níveis de mRNA em diferentes populações ou amostras para caracterizar padrões de expressão de mRNAs em patologias específicas. A PCR convencional não proporciona resultados quantitativos, exceto na modalidade denominada PCR competitivo, trabalhosa, artesanal e de difícil reprodutibilidade. (Bustin, 2000)

O primeiro estudo a avaliar a expressão gênica em amostras não invasivas, no caso o sangue periférico, foi publicado por Vasconcellos e colaboradores, em 1998. Nesse estudo, correlacionou-se a expressão gênica de transcritos de mRNA, pela técnica de PCR competitiva, no tecido e sangue periférico, tendo sido analisadas as expressões dos genes Perforina, Granzima B e Fas-Ligante. Foi encontrado que a expressão gênica dessas moléculas, que codificam para o ataque citolítico, nas células mononucleares do sangue periférico correlaciona-se com a sua expressão intra-enxerto. Adicionalmente, encontrou-se elevada acurácia diagnóstica para o evento rejeição aguda pela análise das quantificações desses genes, especialmente nas análises combinadas. (Vasconcellos et al, 1998)

As análises em urina foram inicialmente realizadas por Li e colaboradores, que avaliaram quantificações mRNA dos genes da Perforina e Granzima B extraído de células do sedimento urinário, correlacionando-as às quantificações obtidas a partir do tecido obtido por biópsias renais, novamente utilizando a técnica de PCR competitiva. Os autores encontraram que níveis elevados dos transcritos desses genes na urina foram capazes de diferenciar

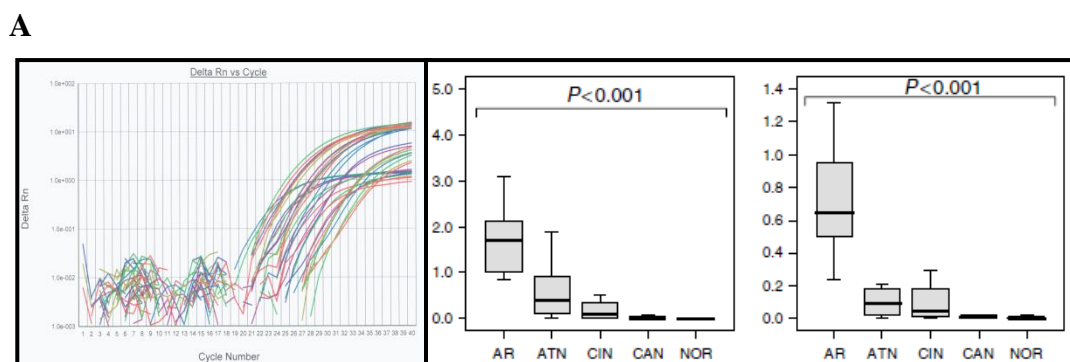
pacientes normais de pacientes com rejeição aguda, propiciando assim esse diagnóstico de forma não-invasiva. (Li et al, 2001) Posteriormente, em trabalho oriundo do mesmo grupo, Muthukumar e colaboradores, também avaliando o mRNA extraído de células do sedimento urinário, dessa vez pela técnica de RT-PCR, demonstraram elevada expressão do gene FOXP3 e foram capazes de distinguir pacientes com rejeição aguda de pacientes com doença crônica do enxerto renal e de biópsias normais. Interessantemente nesse estudo, a análise dos níveis de mRNA de FOXP3 foi capaz de identificar os pacientes em risco de perda de enxerto nos seis meses posteriores ao episódio de rejeição aguda. (Muthukumar et al, 2005)

Posteriormente, Renesto e colaboradores descreveram a utilização de uma molécula especificamente expressa em células Th1 diferenciadas, chamada TIM3, como marcador de rejeição aguda a partir do RNA extraído de células do sedimento urinário. Níveis elevados de TIM3 foram encontrados em pacientes com RA, comparados a outras condições clínicas, mais uma vez sugerindo o uso dessa metodologia como uma ferramenta não-invasiva promissora para a avaliação das disfunções dos enxertos renais. (Renesto et al, 2007) Essa mesma molécula foi estudada de forma pareada em tecido, células do sedimento urinário e do sangue periférico por Manfro e colaboradores, em pacientes com disfunção inicial do enxerto (DGF) e com disfunção aguda de enxertos renais. Nos casos de DGF, a avaliação dos parâmetros diagnósticos para RA apresentou acurácia de 100% nos dois compartimentos periféricos na diferenciação de necrose tubular aguda (NTA). Nos casos de disfunção aguda do enxerto, as acurácias ficaram em torno de 90% na diferenciação entre rejeição aguda, nefrotoxicidade por inibidores de calcineurina (IC), fibrose intersticial e atrofia tubular (IFTA) e rins normais. (Manfro et al, 2008)

Aquino-Dias e colaboradores analisaram moléculas de ataque citolítico como a Perforina, a Granzima B, a Fas-ligante e uma serpinina proteínase - PI-9 além do gene de células T-regulatórias - FOXP3 (Forkhead Box 3). Esse estudo avaliou a utilidade dessa metodologia não-invasiva em pacientes acometidos por DGF e disfunção aguda do enxerto. Os resultados evidenciaram expressão aumentada dessas moléculas nos grupos de

pacientes com rejeição aguda e no grupo com rejeição aguda superimposta à NTA, diferenciando-as de pacientes com NTA pura nefrotoxicidade por IC, IFTA e pacientes com biopsias protocolares normais. Como pacientes em DGF não têm atualmente um marcador não invasivo acurado de rejeição aguda, essa abordagem, se adequadamente confirmada em estudos longitudinais, será de grande utilidade clínica. (Aquino-Dias et al, 2008) Na figura 4, é mostrado o gráfico de ampliação do mRNA e as quantificações para o gene da Perforina em uma porção dos pacientes arrolados nesse último estudo descrito.

Figura 4. Amplificação da reação de PCR e gráficos box-plot da expressão gênica de Perforina



Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) mostrando a amplificação do mRNA do gene da perforina (painel A) e as avaliações *box-plot* em células do sangue periférico (B centro) e células do sedimento urinário (B direita). AR =Rejeição aguda; ATN = necrose tubular aguda; CIN = nefrotoxicidade por inibidores de calcineurina; CAN = nefropatia crônica do enxerto e NOR = biópsias normais. Modificado de Aquino-Dias e cols 2008.

Alguns estudos indicam que o mRNA da interleucina 17 (IL-17) e sua proteína estão aumentadas em episódios de rejeição aguda em pacientes transplantados renais, hepáticos e pulmonares. Caldwell e colaboradores mostraram que a lesão de reperfusão de isquemia hepática que contribui com o aumento da imunidade específica ao aloantígeno por diversos mecanismos, conduzindo também ao aumento de células Th17. (Caldwell et al, 2005) Estudos em modelos de murinos que foram induzidos a uma rejeição aguda renal identificaram uma elevação dos níveis de mRNA da IL-17 e consequentemente sua proteína dois dias pós-transplante, também detectado

em amostras de urina e tecidos de pacientes com rejeição aguda renal. (Van et al, 1998)

Interessantemente, os estudos de marcadores moleculares demonstram que, nas duas condições RA e RASC, ocorre expressão aumentada dos mesmos genes relacionados ao ataque citolítico, sendo que na RA, esses mRNAs estão presentes em maior quantidade. (Dias et al, 2004)

No estudo de Hricik e colaboradores foram analisados diversos genes envolvidos na agressão do enxerto, porém para desenvolverem um modelo baseado na análise do mRNA e proteínas e foram incluídos apenas os genes da granzima B, CXCL9 e CXCL10. Este estudo é parte do *Clinical Trials in Organ Transplantation Protocol-01* (CTOT-01), sendo um estudo observacional prospectivo multicêntrico para validação da utilidade preditiva e diagnóstica de um painel de biomarcadores não-invasivos para desfecho de transplantes em receptores de enxertos renais. Os achados deste estudo indicam que entre os ensaios testados, níveis urinários da quimiocina CXCL9 são significativamente elevados em pacientes com rejeição aguda, comparados àqueles sem rejeição, e que estas elevações na expressão de CXCL9 são comumente detectadas até 30 dias antes da disfunção do enxerto ser clinicamente detectável. Talvez mais importante seja o poder de descartar a rejeição aguda durante episódio de disfunção aguda do enxerto através da ausência de CXCL9 urinário com um valor preditivo negativo maior do que 92%. Afinal, os resultados do CTOT-01 indicam que a proteína urinária CXCL9 é um excelente marcador para exclusão de rejeição aguda do enxerto e para estratificação de grupos de pacientes de baixo risco versus alto risco de dano insipiente ao enxerto. Baixa expressão de CXCL9 urinário é indicativa de baixo risco imunológico e é um biomarcador valioso para identificar pacientes destinados a terem função estável em longo prazo. (Hricik et al, 2013)

Em 2013 foi publicado um grande estudo multicêntrico *Clinical Trials in Organ Transplantation 04* (CTOT-04), liderado por Suthanthiran e colaboradores (Suthanthiran et al, 2013), que avaliou mais de 4 mil amostras urinárias de mais de 450 indivíduos entre o 3º dia e o final do primeiro ano pós-transplante. Neste estudo foi investigada a capacidade de sete genes em

diagnosticar RA e sua capacidade de prognosticar RA em períodos de estabilidade clínica dos enxertos. Os genes foram escolhidos devido à imunobiologia das proteínas codificadas por estes mRNAs e por dados provenientes de estudos prévios unicêntricos. Dentre os genes estudados (*CD3ε chain*, *perforin*, *granzyme B*, *proteinase inhibitor 9*, *CD103*, *interferon-inducible protein 10 (IP-10)*, e *chemokine receptor CXCR3*), apenas os níveis de CD3 e o IP-10 juntamente com o gene de controle 18S rRNA em células urinárias aparentemente formam uma assinatura molecular capaz de diagnóstico e prognóstico de rejeição aguda celular em enxertos renais.

Um mecanismo que potencialmente aciona os processos inflamatórios parece ocorrer através da ativação da resposta imune inata iniciada durante a recuperação do órgão e da lesão de isquemia e reperfusão (Land, 2007), iniciando a liberação de mediadores inflamatórios associados com a resposta imune inata.

Em estudo de McDaniel e colaboradores, foi encontrado que um aumento na expressão de 1,5 vezes está associado a baixa filtração glomerular. *Allograft Inflammatory Factor1 (AIF-1)*, uma proteína estrutural que tem sido descrita como tendo relação na regulação de inflamação, recentemente tem sido demonstrado estar associado com rejeição do enxerto pós-transplante (Zhou et al, 2011). AIF-1 é expresso durante a lesão de isquemia e reperfusão e isto parece exercer um papel importante na ativação inicial da resposta imune inata. (McDaniel et al, 2013)

Relatos preliminares de dois grandes consórcios internacionais, o *Immune Tolerance Network (ITN)* e o *Indices of Tolerance (IOT)*, da União Europeia, evidenciaram observações similares em relação à hiperexpressão de genes de células B em pacientes que desenvolveram tolerância, comparados com pacientes sob regime convencional de imunossupressão. (Hernandez-Fuentes et al, 2008, Newell et al, 2010) Na mesma direção, a baixa expressão de mRNA do marcador CD20 de células B foi observada em enxertos que perderam função, como consequência de rejeição por células T ou mediada por anticorpos se comparadas com aqueles indivíduos/enxertos que tiveram um curso favorável. (Bestard et al, 2010)

Dentre os candidatos a potenciais marcadores, estudos recentes têm sugerido a avaliação de um subgrupo de células T regulatórias (Tregs), que expressam o fator de transcrição chamado de FoxP3, em nível protéico e transcricional diretamente do enxerto e sua correlação com outros compartimentos, como sangue periférico e urina. Estudos como o de Bestard et al, (Bestard et al, 2008) demonstraram que, sob baixas condições inflamatórias, as Tregs parecem ter um impacto favorável, exercendo um papel regulatório nos infiltrados mononucleares intra-enxerto. Reciprocamente, quando a rejeição está se estabelecendo e, por conseguinte um importante processo inflamatório se instala no enxerto, esse subgrupo de células T só seria capaz de contrabalançar as funções efetoras destrutivas das células T citotóxicas ao invés de desempenhar uma função preventiva ou pró-tolerogênica. (Bunnag et al, 2008)

Nas rejeições mediadas por anticorpos (RMA) parece haver menos componentes regulatórios (Tregs e células B) do que em rejeições mediadas por células T. Em estudo de Viklicky et al, os pacientes que perderam o enxerto após RMA apresentaram uma ausência ainda maior de regulação (baixa expressão de FOXP3, RANTES, TGF-B1 e CD20). O melhor preditor de perda de enxerto dentro de 12 meses foi definido por baixa expressão de TGF-B1 e CD20. (Viklicky et al, 2010) Estes dados sugerem que a falta de uma contra-regulação adequada possa ser um elemento chave na patogênese de RMAs severas que resultam em perda do enxerto. (Bestard et al, 2010)

Avaliando a condição de fibrose túbulo-intersticial de aloenxertos renais, Anglicheau e colaboradores avaliaram os níveis de mRNA de diversas moléculas na urina de pacientes com diagnóstico histológico de fibrose e de pacientes com biópsias normais. Um modelo composto pelos níveis de mRNA de quatro genes (vimentina, NKCC2, E-Caderina e 18S ribossomal) obteve 77% de sensibilidade e 87% de especificidade no diagnóstico de fibrose, reforçando a ideia da utilização desta técnica como ferramenta diagnóstica não invasiva das agressões ao enxerto renal. (Anglicheau et al, 2012)

Um estudo realizado por Sui e colaboradores comparou níveis de expressão de miRNAs em biópsias de pacientes submetidos a transplante

renal que desenvolveram quadro de rejeição aguda e amostras de rins normais para averiguar a existência de relação entre micro-RNAs (miRNAs) e rejeição aguda. O estudo identificou 71 miRNAs e desses, 20 miRNAs possuíam expressão diferenciada, sendo que 12 tinham seus níveis diminuídos e oito aumentados, quando comparados a pacientes com função renal normal. (Sui et al, 2008)

Em seguida, Anglicheau e colaboradores investigaram a associação da rejeição aguda com alterações significativas na expressão de miRNAs em tecido de enxertos renais e observaram se esses padrões de expressão intraenxerto de miRNAs eram suficientes para diagnosticar rejeição aguda e prever função renal. Como resultado, observaram que determinados miRNAs (miR-142-5p, miR-155 e miR-223) que estão hiper-expressos em biópsias com RA estão também presentes em altos níveis em células mononucleares do sangue periférico em comparação com os miRNAs hipo-expressos (miR-30a-3p, miR-10b ou let-7c) em biópsias sem RA. Outro achado importante desse estudo, foi que dos 53 miRNAs diferencialmente expressos entre biópsias de RA e normais, 43 encontravam-se hipo-expressos e somente 10 estavam hiper-expressos. (Anglicheau et al, 2009)

Lorenzen e colaboradores testaram a hipótese que miRNAs encontrados na urina de pacientes com rejeição aguda e outras alterações poderiam não só servir como marcadores, mas também como preditores da sobrevida do enxerto. Foram testados 81 pacientes, para os miR-10a, miR-10b e miR-210 detectados na urina encontrando-se resultados significativos, principalmente para o miR-210 que, entre outras características, está diminuído em pacientes transplantados renais com rejeição aguda, além de ser capaz de prever o declínio do índice de filtração glomerular, um anos após o transplante. Postula-se assim que o miR-210 seja um potencial marcador para rejeição renal aguda e preditor de função do enxerto a longo prazo. (Lorenzen et al, 2011)

Apesar de ainda nos faltar conhecimento sobre a totalidade das funções dos miRNAs e sua implicação no processo de rejeição, parece estar claro que os mesmos desempenham um papel fundamental na maquinaria imunológica responsável pelas agressões ao enxerto renal.

2.5.2 *Microarrays* – *Microarranjos*

A utilização de microarranjos de DNA na busca da identificação de uma “assinatura molecular” para gerar perfis quantitativos de expressão de mRNA, permitindo a mensuração detalhada da expressão gênica em escala global, tem sido amplamente empregada na investigação do complexo processo imunológico que sucede o transplante renal desde 2001. (Jun et al, 2001) O principal objetivo desses estudos é definir um grupo de genes de relevância diagnóstica que possa posteriormente ser utilizado como biomarcador através da técnica de PCR quantitativo.

A técnica dos microarranjos de DNA foi mais recentemente utilizada em estudos com pacientes transplantados. Estudos utilizando essa tecnologia para estabelecer perfis de expressão de mRNA identificaram que a rejeição aguda está associada com importantes perturbações na expressão de múltiplos genes, incluindo aqueles envolvidos no ciclo celular, metabolismo e imunidade. (Flechner et al, 2004) No estudo pioneiro de Sarwal e colaboradores demonstrou-se que esses testes moleculares poderiam evidenciar um painel de genes relacionados à resposta imunológica contra o enxerto. Nesse estudo, biópsias de pacientes com rejeição aguda que eram indistinguíveis por análise histológica convencional, revelaram diferenças na expressão gênica associada com diferenças de componente imunológico e celular e curso clínico. Foram encontrados também aglomerados de células B em biópsias associadas com rejeição severa de enxerto, o que sugere um papel relevante das células B na rejeição aguda. (Sarwal et al, 2003)

Flechner e colaboradores publicaram o primeiro estudo utilizando essa metodologia em RNA, obtido de células mononucleares do sangue periférico, obtidas concomitante às amostras de biópsia. Seus resultados evidenciaram uma assinatura transcricional capaz de diferenciar RA, disfunção aguda sem rejeição e transplantes com função estável sem histórico de rejeição. Uma peculiaridade desse estudo foi a demonstração de que mesmo que esta assinatura molecular em sangue periférico tenha sido capaz de distinguir entre RA e pacientes com função estável, os padrões de expressão gênica foram muito diferentes dos padrões expressos no tecido. (Flehner et al, 2004)

Brouard e colaboradores avaliaram a utilização da monitorização molecular como ferramenta não-invasiva de tolerância operacional em pacientes transplantados renais. Esse estudo teve como objetivo a identificação de biomarcadores de tolerância operacional em sangue periférico, com intuito de utilizá-los para a determinação da frequência desse estado em pacientes com função renal estável na presença de imunossupressores. Em um primeiro momento, foram segregados 49 genes relacionados à tolerância e posteriormente analisados por microarranjos e PCR em tempo real e 33 deles conseguiram diferenciar os fenótipos de tolerância e rejeição crônica com alta especificidade e sensibilidade. A assinatura genética demonstrada sugeriu um padrão de redução de sinalização co-estimulatória, quiescência imunológica, apoptose e respostas de células T de memória. Identificou-se no sangue periférico de transplantados renais um grupo de genes associados à tolerância operacional que pode vir a ser útil como ferramenta não-invasiva para guiar a administração de medicação imunossupressora. (Brouard et al, 2007)

Em estudo sobre marcadores de insuficiência renal aguda, Famulski e colaboradores encontraram que um sinal de insuficiência renal aguda previamente identificado no período inicial do pós-transplante também estava elevado em biópsias tardias relacionadas à RAC, RMA, nefropatia pelo vírus polioma e glomerulonefrite, mas não à fibrose. Mais importante, este sinal parece ser preditivo de perda de enxerto em longo prazo nos casos onde a lesão reflete um dano intratável e prolongado. (Famulski et al, 2013)

Em estudo de Reeve e colaboradores, 403 amostras de 315 pacientes foram avaliadas buscando uma ferramenta auxiliar ao diagnóstico histopatológico, principalmente nos casos de rejeição mediada por anticorpos (RMA) com marcação para C4d negativa e rejeição aguda celular, onde aspectos histológicos dificultam que haja conformidade no diagnóstico entre diferentes patologistas. Foi postulado pelo autor um sistema integrado de “diagnóstico” que se baseia na interação da análise histológica e molecular para diagnosticar corretamente as agressões ao enxerto renal principalmente nos casos onde sabidamente a avaliação histológica fica prejudicada, como por exemplo, em situações de rejeição *borderline* (situação ambígua), fibrose avançada e infecção pelo vírus polioma (falsos negativos) e lesões vasculares

isoladas, insuficiência renal aguda (IRA) e pós-tratamento de rejeição (falsos-negativos). Das 74 biópsias diagnosticadas como RAC ou mista por algum dos 3 patologistas participantes, apenas 12 (16%) tiveram a concordância dos 3 avaliadores.

Assim, o escore molecular é proposto como um teste auxiliar a ser utilizado com a análise histológica para criar um novo sistema diagnóstico capaz de classificar corretamente biópsias com fibrose, identificar quais lesões vasculares isoladas realmente representam RAC e aperfeiçoar a avaliação de biópsias com inflamação devido a IRA ou após o tratamento anti-rejeição. (Reeve et al, 2013)

Em estudo prévio, Reeve e colaboradores já haviam comparado a abordagem molecular com a histopatológica para o diagnóstico da rejeição aguda de transplantes renais. Esse estudo sugere que a abordagem molecular seja mais fidedigna em representar o estado de agressão imunológica ao enxerto, uma vez que o diagnóstico histopatológico tem bases empíricas e observacionais (tratamento-dependente), sem um *background* explicativo da biologia mecanicista responsável pelo dano acarretado ao enxerto. Análise morfológica simplifica a complexidade dos processos envolvidos nas lesões do enxerto com seus distintos mecanismos envolvidos. Apesar da nomenclatura Banff recentemente ter introduzido novos subtipos de lesão do enxerto, incluindo subtipos de rejeição humoral, não é capaz de revelar as diferentes patogêneses, o que pode ter um impacto individual no prognóstico e terapia. (Volk et al, 2013) Portanto, de acordo com os autores, as discordâncias entre as técnicas são esperadas e a metodologia molecular é mais poderosa e acurada para a avaliação do estado imune do paciente. A significância desses resultados no contexto de monitorização de pacientes submetidos a transplante renal pode explicar a falha de mais de uma década de trabalhos que analisaram em células do sangue periférico a ativação de antígenos baseada nos achados em biópsias de enxertos com rejeição e outros modelos imunes. É possível que o perfil de expressão gênica dos linfócitos do sangue periférico represente a adequação da imunossupressão, de tal forma que, em pacientes que venham a rejeitar, reflitam a imunossupressão insuficiente, comparados

com pacientes transplantados com função renal estável, sem mecanismos operantes de agressão aloimune. (Reeve et al, 2009)

Na metodologia dos microarranjos, o fato de se demonstrar que os transcritos ocorrem de maneira coordenada sugere que um limitado número de transcritos de genes seja necessário para a classificação de rejeição versus não-rejeição. Por fim, um fato muito importante a ser considerado ao se desenhar uma ferramenta não-invasiva para monitorização do enxerto é a sua aplicabilidade. Atualmente, as análises por microarranjos ainda são muito onerosas, demoradas e sua avaliação estatística costuma ser muito mais complexa e de difícil resolução para utilização na rotina clínica, onde a análise de alguns genes de interesse por PCR em tempo real parece ser uma abordagem mais viável e recomendável. (Nickerson, 2009) É importante mencionar que a reprodutibilidade de genes diferencialmente expressos pode ser afetada por vários fatores, como a metodologia, as diferenças inerentes entre os indivíduos e populações e a escolha de limiares, faltando ainda uma padronização e reprodutibilidade intra e inter laboratórios. (Bestard et al, 2010)

2.6 Perspectivas no uso dos testes moleculares em transplante renal

Existe a expectativa de que os microarranjos venham a desempenhar papel crucial no transplante de órgãos em assuntos relacionados à identificação de mecanismos moleculares de rejeição aguda, injúria crônica, efeito de toxicidade das drogas imunossupressoras e tolerância. É também esperado que eles ajudem a identificar novos alvos de drogas para um tratamento com imunossupressores pós-transplante mais personalizado. Também importante, espera-se que os microarranjos ajudem a definir biomarcadores para uso não-invasivo e para o diagnóstico clínico de rejeição e identificação de tolerância. Na abordagem clínica, existem duas razões principais para que se utilize um número pequeno de genes para o monitoramento clínico por qPCR. A primeira é o custo; a qPCR é consideravelmente menos onerosa para se testar um número restrito de genes, podendo ser realizada rapidamente e na maior parte dos laboratórios. Os

microarranjos, que utilizam tecnologia mais cara, são úteis para testarem-se múltiplos genes, em geral centenas. A segunda diz respeito à análise dos resultados com as duas metodologias. Os microarranjos são complexos e requerem muito tempo e pessoal altamente treinado para sua interpretação, ao passo que os dados provenientes da qPCR são de análise consideravelmente mais simples e rápida. Por fim, a qPCR é mais sensível em detectar pequenas mudanças na expressão gênica. A comparação das tecnologias de microarranjos e PCR em tempo real (qPCR), identificando seus pontos fortes e fracos, foi proposta por Kahtri e colaboradores e está apresentada na figura 5. (Kathri et al, 2009)

Figura 5. Comparação das tecnologias de Microarranjos e PCR em Tempo Real

Microarranjos	PCR em Tempo Real
- Custo efetiva no rastreamento de milhares de genes	- Custo efetiva em testar no máximo algumas dezenas de genes
- Muito dispendiosa para rastreamento de apenas dezenas de genes	- Cara e consome tempo para testar centenas de genes
- Tecnologia relativamente nova e requer expertise na análise dos dados	- Análise de dados simplificada e de fácil aplicabilidade na rotina clínica
- Baixa sensibilidade devido a não detecção de transcritos pouco abundantes na amostra	- Alta sensibilidade permite a detecção de transcritos pouco abundantes em uma amostra
- Baixa especificidade por hibridização cruzada, erros no desenho das sondas. Limitada na detecção de splice-alternativos	- Alta especificidade; possibilidade de desenhar primers para identificação de transcritos splice-variantes

Modificado de Hernandez-Fuentes, 2008.

Enquanto o potencial impacto clínico das assinaturas de expressão gênica que podem prever a RA e monitorar a imunossupressão é claro, as possíveis contribuições para o entendimento da biologia do transplante também são importantes considerações. Por conseguinte, o objetivo máximo da assinatura de expressão gênica é identificar genes específicos e associá-los a rotas de mecanismos celulares mediadores de rejeição, lesão e reparo tecidual, imunossupressão e tolerância. Com o conhecimento dos mecanismos de ação, é possível que se desenvolvam novas abordagens mais eficazes que permitam a monitorização segura do curso clínico e de eventuais estados de tolerância ao enxerto. (Hartono et al, 2010)

O desenvolvimento de técnicas moleculares capazes de fornecer um painel da atividade imunológica responsável pela agressão ao enxerto de forma não-invasiva sugere a possibilidade futura da otimização e individualização do tratamento com drogas imunossupressoras. Situações clínicas nas quais a monitorização dos processos nocivos ao enxerto é feita por biópsias, como a DGF, a RASC, a IFTA, entre outras, poderão vir a ser diagnosticadas por métodos moleculares não invasivos. No entanto, existem diversas premissas a serem cumpridas para que os testes moleculares possam alcançar a arena clínica. Especificamente os testes deverão: [1] ser avaliados em diferentes coortes de pacientes; [2] ser avaliados em séries de pacientes consecutivos com múltiplas patologias para permitir a verdadeira determinação de seus parâmetros diagnósticos; [3] ser reproduzido por grupos independentes; [4] ser avaliados longitudinalmente para determinar a habilidade de um dado ensaio de detectar processos patológicos precocemente e tardiamente pós-transplante, assim como avaliar seu comportamento em condições intervenientes; [5] demonstrar que o teste candidato retorna aos valores basais com terapia efetiva. Além de satisfazer esses critérios básicos, um teste útil também deve ser capaz de detectar níveis sub-clínicos de agressão para que a intervenção precoce seja uma opção potencial. (Nickerson, 2009)

Outra perspectiva gerada com os estudos moleculares é a sua utilidade terapêutica. Os antagonistas em especial apresentam este potencial, tendo sido testada esta estratégia com sucesso in vivo em primatas com a intenção de inibir a atividade hepática do miR122, relacionado com níveis séricos de

colesterol. (Esau et al, 2006) Em transplantes renais, como citado a cima, alguns microRNAs se mostram hipoexpressos, uma alternativa terapêutica seria restaurar os níveis de determinados miRNAs através da administração destes em versão sintética. O uso de miRNAs como alternativa terapêutica é interessante porém ainda a desafios como o desenvolvimento de drogas seguras que sejam órgão e/ou célula-específico e que tenham baixa toxicidade derivada dos efeitos de absorção e da ativação de respostas imunes. (Li et al, 2010).

O presente estudo foi concebido e executado para testar a hipótese de que a avaliação molecular de transcritos do sangue periférico podem ser úteis para o diagnóstico não-invasivo de agressões sub-clínicas a enxertos renais.

3 Objetivos

3.1 Objetivo principal

Avaliar métodos diagnósticos moleculares não invasivos que possam produzir resultados acurados em termos de detectar agressões sub-clínicas aos aloenxertos renais.

3.2 Objetivos secundários

3.2.1. Avaliar a incidência de alterações histopatológicas em biópsias renais de pacientes estáveis no terceiro mês pós-transplante;

3.2.2. Avaliar a expressão gênica de FOXP3, TIM3 e Perforina no sangue periférico e verificar a sua acurácia para o diagnóstico de rejeição aguda;

3.2.3. Avaliar a expressão gênica de TGF- β e CTGF no sangue periférico como potenciais marcadores moleculares de fibrose intersticial e atrofia tubular;

3.2.4. Avaliar o impacto das alterações sub-clínicas histológicas e de suas expressões moleculares na função e sobrevida dos enxertos.

4 Referências bibliográficas

Anglicheau D, Suthanthiran M. Noninvasive prediction of organ graft rejection and outcome using gene expression patterns. *Transplantation* 2008; 86(2):192-199.

Anglicheau D, Sharma VK, Ding R, Hummel A, Snopkowski C, Dadhania D, et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:5330-5

Anglicheau D, Muthukumar T, Hummel A, Ding R, Sharma VK, Dadhania D, et al. Discover and validation of a molecular signature for the noninvasive diagnosis of human renal allograft fibrosis. *Transplantation* 2012; 93:1136-1146

Aquino-Dias E, Joelsons G, da Silva DM, Berdichevski RH, Ribeiro AR, Veronese FJ, et al. Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney Int* 2008; 73:877-84

Audard V, Matignon M, Dahan K, Lang P, Grimbert P. Renal transplantation from extended criteria cadaveric donors: problems and perspectives overview. *Transpl Int.* 2008 Jan;21(1):11-7.

Azevedo LS, Castro MC, Monteiro de Carvalho DB, d'Avila DO, Contieri F, Gonçalves RT, Manfro R, Ianhez LE. Incidence of delayed graft function in cadaveric kidney transplants in Brazil: a multicenter analysis. *Transplant Proc.* 2005:2746-7

Azuaje F, Devaux Y, Wagner D. Challenges and standards in reporting diagnostic and prognostic biomarker studies. *Clin Transl Sci* 2009; 2:156-61

Bettelli E, Oukka M, Kuchroo V. TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 2007; 8:345-50

Bestard O, Cruzado JM, Rama I, Torras J, Gomà M, Serón D, et al. Presence of FoxP3+ regulatory T cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19:2020–6

Bestard O, Cruzado JM, la Franquesa M, Grinyó JM. Biomarkers in renal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15:467-73

Billingham RE, Medawar PB. The technique of free skin grafting in mammals. *J Exp Biol* 1951; 28:385-402

Biomarkers definition working group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69:89-95

Brouard S, Mansfield E, Braud C, Li L, Giral M, Hsieh SC, et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:15448-53

Bunnag S, Allanach K, Jhangri GS, Sis B, Einecke G, Mengel M, et al. FOXP3 expression in human kidney transplant biopsies is associated with rejection and time post transplant but not with favorable outcomes. *Am J Transplant* 2008; 8:1423–33

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25:169-93

Caldwell CC, Okaya T, Martignoni A, Husted T, Schuster R, Lentsch AB. Divergent functions of CD4-T lymphocytes in acute liver inflammation and injury after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289:969–976

Coelho V, Caldas C, Kalil JE. Imunobiologia do transplante renal. In: Noronha IL, Manfro RC, Pacheco-Silva A, Casadei DH. *Manual de transplante renal*. 1ª ed. Barueri, SP: Manole, 2007. p. 2-22.

Colvin RB, Cohen AH, Saiontz C, Bonsib S, Buick M, Burke B, et al. Evaluation of pathologic criteria for acute renal allograft rejection: reproducibility, sensitivity, and clinical correlation. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8:1930–41

Courtney AE, Maxwell AP. The challenge of doing what is right in renal transplantation: balancing equity and utility. *Nephron Clin Pract* 2009; 111(1):c62-7.

Dharnidharka VR, Cherikh WS, Abbott KC. An OPTN analysis of national registry data on treatment of BK virus allograft nephropathy in the United States. *Transplantation* 2009 Apr 15;87(7):1019-26.

Dias ECA, Veronese FJV, Gonçalves LFS, Manfro RC. Molecular markers in subclinical acute rejection of renal transplants. *Clin Transplant* 2004; 18:281-7

Esau C, Davis S, Murray SF et al. MiR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 2006; 3:87–98

Famulski KS, Reeve J, de Freitas DG, Kreepala C, Chang J, Halloran PF. Kidney transplants with progressing chronic diseases express high levels of acute kidney injury transcripts. *Am J Transplant* 2013; 13:634-644

Flechner SM, Kurian SM, Head SR, Sharp SM, Whisenant TC, Zhang J, et al. Kidney transplant rejection and tissue injury by gene profiling of biopsies and peripheral blood lymphocytes. *Am J Transplant* 2004; 4:1475-89

Gaber LW, Moore LW, Alloway RR, Flax SD, Shokouh-Amiri MH, Schroder T, et al. Correlation between Banff classification, acute renal rejection scores and reversal of rejection. *Kidney Int.* 1996;49:481–7

Gloor J, Cosio F, Lager DJ, Stegall MD. The spectrum of antibody-mediated renal allograft injury: implications for treatment. *Am J Transplant* 2008; 8: 1367–1373

Haeney M. The immunological background to transplantation. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36:Suppl B:1-9

Haas M, Montgomery RA, Segev DL, Rahman MH, Racusen LC, Bagnasco SM et al. Subclinical acute antibody-mediated rejection in positive crossmatch renal allografts. *Am J Transplant* 2007; 7:576–585.

Hartono C, Muthukumar T, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of acute rejection of renal allografts. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15:35–41

Hernandez-Fuentes M, Sawitzki B, Perucha E, et al. Identification of immune tolerance in renal transplants. *Am J Transplant.* 2008;8(Suppl 2):292

Hricik DE, Nickerson P, Formica RN, Poggio ED, Rush D, Newell KA, et al. Multicenter validation of urinary CXCL9 as a risk-stratifying biomarker for kidney transplant injury. *Am J Transplant* 2013; 13:2634-44

Jang HR, Ko GJ, Wasowska BA, Rabb H. The interaction between ischemia reperfusion and immune responses in the kidney. *J Mol Med* 2009; 87:859–864.

Jun AS, Liu SH, Koo EH, Do DV, Stark WJ, Gottsch JD. Microarray analysis of gene expression in human donor corneas. *Arch Ophthalmol* 2001; 119:1629-34

Khatri P, Sarwal MM. Using gene arrays in diagnosis of rejection. *Curr Opin Organ Transplant.* 2009;14:34–9

Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche HU. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am J Transplant* 2011; 11:450-462.

Land WG. Innate immunity-mediated allograft rejection and strategies to prevent it. *Transplant Proc* 2007; 39:667-72

Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, et al. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzymeB in urine. *N Engl J Med* 2001; 344:947-54

Li JY, Yong TY, Michael MZ, Gleadle JM. Review: The role of microRNAs in kidney disease. *Nephrology* 2010; 15: 599–608

Li XC, Rothstein DM, Sayegh MH. Costimulatory pathways in transplantation: Challenges and new developments. *Immunol Rev* 2009; 229: 271.

Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; 4:357-62

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct Method. *Methods*. 2001;25:402-8

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

Manfro RC, Aquino-Dias EC, Joelsons G, Nogare AL, Carpio VN, Gonçalves LF. Noninvasive Tim-3 messenger RNA evaluation in renal transplant recipients with graft dysfunction. *Transplantation* 2008; 86:1869-74

Marcussen N, Olsen TS, Benediktsson H, Racusen L, Solez K. Reproducibility of the Banff classification of renal allograft pathology. Inter- and intraobserver variation. *Transplantation* 1995; 60:1083-9

McDaniel DO, Rigney DA, McDaniel KY, Windham WJ, Redmond P, Williams B, et al. Early expression profile of inflammatory markers and kidney allograft status. *Transplant Proc* 2013; 45:1520-1523

Merion RM, Ashby VB, Wolfe RA, Distant DA, Hulbert-Shearon TE, Metzger RA, Ojo AO, Port FK. Deceased-donor characteristics and the survival benefit of kidney transplantation. *JAMA*. 2006 May 10;295(18):2140.

Mota A, Arias M, Taskinen EI, Paavonen T, Brault Y, Legendre C, Claesson K, Castagneto M, Campistol JM, Hutchison B, Burke JT, Yilmaz S, Häyry P, Neylan JF; Rapamune Maintenance Regimen Trial. Sirolimus-based therapy following early cyclosporine withdrawal provides significantly improved renal histology and function at 3 years. *Am J Transplant*. 2004 Jun;4(6):953-61

Munn DH, Zhou M, Attwood JT, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998; 281:1191-3.

Muthukumar T, Ding R, Dadhania D, Medeiros M, Li B, Sharma VK, Hartono C, et al. Serine proteinase inhibitor-9, an endogenous blocker of granzyme B/perforin lytic pathway, is hyperexpressed during acute rejection of renal allografts. *Transplantation*. 2003;75:1565-70

Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, et al. Messenger RNA for FOX P3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med*. 2005, 353:2342-51

Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med*. 2003 11;349(24):2326-33

Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR: Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. *Transplantation* 2004; 78:242-9

Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med* 2010; 363:1451-62

Newell KA, Asare A, Kirk AD, Gisler T, Bourcier K, Suthanthiran M, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; 120:1836-47

Nickerson P, Jeffery J, Gough J, Grimm P, McKenna R, Birk P, Rush D. Effect of increasing baseline immunosuppression on the prevalence of clinical and subclinical rejection: a pilot study. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Aug;10(8):1801-5

Nickerson P. Post-transplant monitoring of renal allografts: are we there yet? *Curr Opin Immunol* 2009; 21:563-8

Ojo AO, Held PJ, Port FK, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med* 2003; 349:931-40.

Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med*. 2002 Feb 21;346:580-90.

Prince O, Savic S, Dickenmann M, Steiger J, Bubendorf L, Mihatsch MJ. Risk factors for polyoma virus nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Mar;24(3):1024-33.

Reeve J, Einecke G, Mengell M, Sis B, Kayser N, Kaplan B, et al. Diagnosing rejection in renal transplants: a comparison of molecular- and histopathology-based approaches. *Am J Transplant* 2009; 9:1-9

Reeve J, Sellarés J, Mengel M, Sis B, Skene A, Hidalgo L, et al. Molecular diagnosis of T cell-mediated rejection in human kidney transplant biopsies. *Am J Transplant* 2013; 13:645-655

Renesto PG, Ponciano VC, Cenedeze MA, Saraiva-Câmara NO, Pacheco-Silva A. High expression of Tim-3 mRNA in urinary cells from kidney transplant recipients with acute rejection. *Am J Transplant* 2007; 7:1661-5

Rouvier E, Luciani MF, Mattei MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J. Immunol* 1993; 150: 5445–5456.

Rush DN, Henry SF, Jeffery JR, Schroeder TJ, Gough J. Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. *Transplantation* 2004; 57:208-11

Rush D, Arlen D, Boucher A, Busque S, Cockfield SM, Girardin C, et al. Lack of benefit of early protocol biopsies in renal transplant patients receiving TAC and MMF: a randomized study. *Am J Transplant* 2007; 7: 2538-2545

Sarwal M, Chua MS, Kambham N, Hsieh SC, Satterwhite T, Masek M, et al. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Eng J Med* 2003; 349:125-38

Schold JD, Rehman S, Kayler LK, Magliocca J, Srinivas TR, Meier-Kriesche HU. Treatment for BK virus: incidence, risk factors and outcomes for kidney transplant recipients in the United States. *Transpl Int.* 2009 Jun;22(6):626-34.

Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant.* 2008; 8:753-60

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

Suthanthiran M, Schwartz JE, Ding R, Abecassis M, Dadhania D, Samstein B, et al. Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *N Engl J Med* 2013; 369:20-31

Strom TB. Rejection – More than the eye can see. *N Engl J Med.* 2005, 353;2394-96

Tarlinton DM, Batista F, Smith KGC. The B-cell response to protein antigens in immunity and transplantation. *Transplantation* 2008; 85:1698

Torchinsky, MB, Garaude J, Martin AP, Blander JM. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. *Nature* 2009; 458:78–82

Van KC, Boonstra JG, Paape ME, Fossiez F, Banchereau J, Lebecque S, et al. Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:1526-1534

Vasconcellos LM, Schachter AD, Zheng XX, Vasconcellos LH, Shapiro M, Harmon WE, et al. Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation* 1998; 66:5626

Viklicky O, Hribova P, Volk HD, Slatinska J, Petrasek J, Bandur S, et al. Molecular phenotypes of acute rejection predict kidney graft prognosis. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21:173–80

Volk HD, Sawitzki B, Reinke P. Molecular analysis of renal allograft biopsies – more than a nice toy for researchers? *Am J Transplant* 2013; 13:539-540

Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007; 25:821–852.

Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nature Immunol Rev* 2003; 3: 199.

Wood KJ, Goto R. Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation* 2012; 93:1-10.

Woodle ES, First MR, Pirsch J, Shihab F, Gaber AO, Van Veldhuisen P; Astellas Corticosteroid Withdrawal Study Group. A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial comparing early (7 day) corticosteroid cessation versus long-term, low-dose corticosteroid therapy. *Ann Surg*. 2008 Oct;248(4):564-77

Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999; 341: 1725-30

Zhou X, He Z, Henegar J, Allen B, Bigler S. Expression of allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) in acute cellular rejection of cardiac allografts. *Cardiovasc Pathol* 2011; 20:177-84

5 Artigo em inglês

Molecular evaluation of subclinical graft injuries in kidney transplant recipients with stable function submitted to a third month protocol transplant biopsy.

Authors

Joelsons G¹

Domenico T¹

Montenegro RM²

Souza FA¹

Aleamar B¹

Gregorio C¹

Bringhenti RN³

Manfro RC^{1,2,4}

Institutions

¹Post-Graduate Medical Sciences Program. School of Medicine. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. ²Division of Nephrology, Renal Transplant Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil. ³Division of Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil ⁴Corresponding author

Funding sources: The present work was funded by The Research Incentive Fund from Hospital de Clínicas de Porto Alegre, by the Division of Nephrology Research Fund, also from Hospital de Clínicas de Porto Alegre and by FAPERGS, a research foundation in Rio Grande do Sul. GJ received a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and RCM is a scholar of the Brazilian Research Council (CNPq). Authors have no conflicts of interest to disclose.

Corresponding author:

Roberto Ceratti Manfro MD, PhD

Division of Nephrology - Renal Transplant Unit

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

2350 Ramiro Barcelos Street

Porto Alegre, RS. 90035-903

e-mail: rmanfro@hcpa.ufrgs.br

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the diagnosis potential of the non-invasive molecular analyzes of peripheral blood leukocytes gene expression in stable kidney recipients in the short-term. One hundred and thirty-six patients were enrolled in this study and underwent protocol biopsies at 3 months after grafting. Thirty-nine patients were diagnosed as acute rejection (28.7%), being 33 with borderline histological changes, 5 Banff IA acute rejection and 1 patient with Banff IB acute rejection, twenty patients had significant fibrosis (14.7%), seven had acute tubular necrosis (5.1%), three had poliomyavirus infection (2.2%) and one patient had calcineurin inhibitor toxicity (0.8%). Gene expression was measured through qPCR and patients with graft dysfunction presented lower expressions of perforin, TIM3, FOXP3 and TGF- β than patients with acute rejection and normal graft histology. Other analyzes showed that perforin, TIM3 and FOXP3 are also able to rule out acute rejection, with negative predictive values (NPV) of 83%, 83% and 79.6%. In a combined analysis of the 3 genes associated the NPV was 86.4%, being an interesting tool in the follow up of kidney recipients, particularly in the condition of delayed graft function (DGF), when the physicians are blinded to the patients immunological status and a surveillance biopsy is needed. Surveillance biopsies are not feasible in the daily routine, so a non-invasive approach would be of great benefit to the patients management. In conclusion, this molecular approach with gene profiling techniques might be very useful in ruling out acute rejection in the daily care of kidney transplanted patients hopefully optimizing their long term graft half-lives with individualization of immunosuppressive treatment, especially in patients with DGF.

Key-words: Kidney transplantation, acute rejection, gene expression, diagnosis, mRNA

Introduction

Short term survival of kidney transplants has improved remarkably over the last two decades (1). However, long term survival of grafts and patients are still much lower than desired and most of the grafts are lost by recipients' death and chronic graft function deterioration (2). Currently the half-life of grafts from deceased donors is around 10 years for standard criteria deceased organ donors, 6 years for expanded criteria deceased donors and around 12 years for non HLA-identical living donors. Moreover these half-lives have not improved substantially over the last two decades and it is conceivable that different types of sub-clinical attacks are relevant in this scenario. (3-5).

It is believed that most of the injuries that result in shortening of graft survival are initiated early after transplantations and many times are subclinical (6). Currently, many sub-clinical injuries can only be detected by protocol graft biopsies and the uncovering of biomarkers for such situations would be of major utility in the clinical practice of solid organ transplantation. Among the possible causes of continuous sub-clinical graft injury one must consider the occurrence of ongoing allo responsiveness, either cellular, antibody mediated or both, toxicity of immunosuppressive drugs and more recently the nephropathy produced by polyoma virus infection (7,8). Also it must be appreciated that the increasing use of organs from expanded criteria donors represents a further burden since they may have more significant fibrosis and higher rejection probability and therefore be more susceptible to graft deteriorating insults (9,10).

Acute rejections are currently classified into cellular or antibody-mediated rejection and may occur isolated or together, usually with a predominance of one component (2). Acute cellular rejections of transplants, whether clinically overt or subclinical, are deleterious to their function and may lead to a shortening of survival basically resulting of insufficient immunosuppression to control the alloimmune response. (11) By definition, in subclinical acute rejection (SAR) grafts have stable function in the presence of morphological and/or immunohistochemical features, alone or in combination, characteristic of acute rejection. (12,13)

The development of non-invasive biomarkers to accurately identify sub-clinical injuries, without the need of protocol biopsies, would be a major step forward in the

practice of clinical organ transplantation since it would allow the early recognition of graft insulting events and lead to proper therapeutic actions potentially leading to more prolonged allograft survivals. In this work we report the molecular non-invasive evaluation, in the peripheral blood, of stable kidney transplant recipients that underwent graft biopsies in order to identify subclinical injuries.

Materials and Methods

Patients

All adult patients that underwent kidney in our institution between March 2011 and May 2013 and reached the third post-transplant month with stable renal function were considered for participation in the study. Graft stability was determined by absence of significant variation of serum creatinine in the last month before the biopsy (serum creatinine variation < 0.3 mg/dL), absence of abnormal proteinuria (protein/creatinine ratio in the urine < 1), absence of hematuria in the urine sediment and a normal renal graft doppler ultrasound. All consenting patients had biopsies performed by a trained nephrologist under real-time ultrasound guidance with 16 G needle using a semi-automated biopsy gun.

Methods

Demographic variables (age, gender, race, donor type), transplant related variables (HLA mismatches, PRA, blood transfusions, cold ischemia time, re-transplants, primary renal disease, immunosuppression and delayed graft function) and graft related outcomes (serum creatinine, estimated MDRD glomerular filtration rate [eGFR], patient and graft survival) were prospectively collected.

One or two cores were obtained for each biopsy and a blood sample was drawn along with the biopsy. For the histopathological analysis slides were stained with hematoxylin and eosin, periodic acid-shiff and Masson's trichrome. Immunostaining for C4d detection was performed with primary rabbit polyclonal anti-C4d antibody (Abcam, American Research Products, Palo Alto, CA, USA) and polyoma virus (Abcam, American Research Products, Palo Alto, CA, USA) were also performed for all biopsies. Biopsies were interpreted by a transplant pathologist unaware of the clinical information and classified as rejection biopsies ("rejectors") and non-rejection biopsies ("non-rejectors") that included grafts with normal histology and all other

alterations. Interpretations were performed according to the 2007 Banff classification (14). Expressions of the selected genes were evaluated in rejectors and non-rejectors by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).

Immunosuppression and anti-rejection therapy

Immunosuppression was initiated pre-operatively with tacrolimus or cyclosporine and sodium mycophenolate in all patients who also received a 500 mg dose of methylprednisolone transoperatively. Induction therapy was used for all recipients of deceased donor organs and for recipients of living donor organs considered of high immunological risk. Deceased donor recipients and living donor recipients considered of high immunological risk received induction with Thymoglobulin®. All other deceased donor recipients received Basiliximab®. Patients were maintained with a combination of prednisone, sodium mycophenolate and tacrolimus or cyclosporine. Rejections were treated with a 3 day course of methylprednisolone 500 mg IV. Steroid resistant rejections and those with initial Banff classification Banff IIA or higher were treated with a 10-14 day course of Thymoglobulin®.

Sample Handling and Design of Primers and Probes

Peripheral blood samples were drawn in EDTA-containing tubes immediately before the protocol biopsies. Peripheral blood leukocytes (PBL) were obtained through erythrocyte lysis with a hypotonic buffer and urine samples were collected before the biopsy and stored at -80°C. RNA isolation was performed using the QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Total RNA quantification were made using the NanoDrop® 1000 Spectrophotometer v.3.7 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE, USA) and RNA purity was observed as a ratio of absorbances at two different wave lengths (260/280 nM). Only samples with optical density ratio higher than 1.8 were analyzed. Total RNA was reverse transcribed to cDNA using the cDNA High Capacity Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to manufacturer's instructions, to a final volume of 20uL and stored at -20oC.

The 5' nuclease assay was performed using the ABI 7000 Sequence Detection System and TaqMan Universal PCR Master Mix, composed by AmpliTaq Gold® DNA polymerase, Amperase UNG, passive reference (ROX), buffer and dNTP's (Applied

Biosystems, Foster City, CA, USA). The design and synthesis of the primers and fluorogenic probes for Perforin (ID: *Hs00169473_m1*; *GenBank reference: 5551*), TIM3 (ID: *Hs 00262170_m1*; *GenBank reference: 84868*), FOXP3 (ID: *Hs00262170_m1*; *GenBank reference: 50943*), CD138 (ID: *Hs00896423_m1*; *GenBank reference: 6382*), CTGF (ID: *Hs00170014_m1*; *GenBank reference: 1490*) and TGF- β (ID: *Hs00998133_m1*; *GenBank reference: 7040*) mRNA were made by TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA) and had already been tested and validated previously by the manufacturer. 18s rRNA, due to its low inter sample variability, was used as an endogenous control (Taqman PDAR Endogenous Control, Applied Biosystems). Gene Expression Assays consisted of 20 times concentrated (360uM) mix of PCR primers and Taqman® MGB (Minor Groove Binding) probes. These assays are designed for the detection and amplification of specific genetic sequences. All primers utilized are intron-spanning to avoid genomic DNA amplification (Gene Expression Assays/Custom Primers and Probes; Applied Biosystems, USA). The Taqman® probes were labeled with FAM (6-carboxyfluorescein) as the reporter at the 5' region, except the endogenous control 18s rRNA that was labeled with the dye VIC as the reporter. Gene expression relative quantitation was measured as a raise in fluorescence, resulting from amplification and probe degradation. The cycle in which the fluorescence exceeds the detection threshold is called Threshold Cycle (Ct). More specific template in a sample results in an earlier exceeding fluorescence. The mean Δ Ct of the samples without histological alterations was used as calibrator. The analyses of amplified products were performed by the relative quantification method $2^{-\Delta\Delta$ Ct, which describes alterations to the target gene expression relative to a reference sample (15).

Statistical Analyses

Descriptive analyses, means \pm standard deviations and distributions are shown. Receiver operating characteristic (ROC) curves and non-parametric Mann-Whitney and U-Wilcoxon tests were used for statistical analysis. Fisher's exact test and Pearson Chi-Square were used to compare qualitative variables. P levels lower than 0.05 were considered statistically significant.

Ethical Issues

The study was approved by the research and ethics committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, accredited by the National Research Council of the Brazilian Ministry of Health, and registered at the Office for Human Research Protection – OHRP-USDHHS. Patients were informed of the study proposal and agreed in participate by signing an informed and written consent.

Results

Two hundred and eighty adult patients received a kidney transplant between March 2011 and May 2013 at our institution. Among them one hundred and sixty had stable renal graft function at the third post-transplant month and one hundred and thirty six underwent a kidney protocol biopsy. Molecular evaluations were undertaken in 108 of these patients. Exclusions for the kidney biopsy were due to unstable graft function at the 3rd month (39 patients), refusal to undertake a biopsy (89 patients), 13 graft losses and 3 deaths. Exclusions for the molecular analysis were due to poor quality RNA (18 patients with optical density ratio below 1.8) and technical mishaps at the PCR rendering the results not reliable (10 patients). Figure 1

Histopathological derived analyses

The main demographical data of the 136 patients that underwent the third month protocol biopsy are shown in table 1 along with the comparison of rejectors and non-rejectors. As shown in the table 1, no statistically significant differences were found in the demographic data and transplant related variables.

Table 2 shows the frequencies and percentages of the histopathological diagnosis. For all analyzes the biopsies with borderline rejection were in the group of the rejectors patients. Histopathological findings revealed that only approximately half of the biopsies were read as normal transplant biopsies and that a high frequency of acute cellular rejection and IFTA was found in the protocol biopsies.

The impact of sub-clinical histological finding in graft function is shown in table 3. The lowest serum creatinine in the first three months, at 1, 6, 12 months post-transplantation and at biopsy was always lower in the group of patients with normal transplant histology. MDRD estimated glomerular filtration rate (eGFR), as expected,

followed the reverse trend being always higher in patients with normal transplant histology. Both serum creatinine and eGFR were not different between the group of rejectors and the group of patients with other histologic alterations.

Biopsy related complications were macroscopic hematuria and macroscopic hematuria with acute renal failure in one case each that resolved in 2 and 5 days respectively. All patients were followed-up at least to one-year after transplantation. At this time one death by sepsis has occurred in the group of patients with normal histology and no grafts were lost.

Gene expression analyses

In 108 of the biopsied patients molecular analyses of the mRNA obtained from the peripheral blood was performed. The histological diagnoses among these patients were: acute rejection in 31 patients (28: borderline; two: Banff 1A and one Banff 1B); 16 with IFTA (stage I: 15 and stage II: 1); 7 patients with acute tubular necrosis (ATN); one with poliovirus infection; one with acute calcineurin inhibitor nephrotoxicity (CIN) and fifty two with normal renal graft histology.

For the analysis patients were divided into three groups, rejectors, normal transplant histology and other alterations. The levels of mRNA expression quantified by RT-PCR of all genes evaluated are shown in table 4 and figure 2. Medians of the mRNA transcripts of the perforin ($P = 0.007$), TIM3 ($P = 0.005$) and FOXP3 ($P = 0.002$) genes were significantly higher in patients with acute rejection as compared with the two other groups. TGF- β gene expression presented borderline statistical significance ($P = 0.052$). TGF- β and CTGF genes presented higher expression levels in the group of patients with IF/TA as compared with other dysfunctions group. TGF- β mRNA expression values were 0.70 (0.12 – 5.96) and 0.12 (0.058 – 0.27) ($P = 0.035$) and CTGF expression values were 1.05 (0.14 – 9.70) and 0.16 (0.029 – 0.56) ($p = 0.04$), respectively for the IF/TA and all other dysfunctions groups, excluding the acute rejection group.

Receiver operating characteristic (ROC) curves were generated to analyze the diagnostic parameters of mRNA gene expression and are shown in figure 3. Table 5 shows the analyses of the diagnostic parameters obtained from the ROC curve for the genes that presented AUCs analyzed individually and simultaneously. Perforin, TIM3

and FOXP3 genes mRNA evaluation provided AUCs above baseline and statistically significant results of their diagnostic parameters. Individually the best performing genes were TIM3 and Perforin. The significantly performing genes were combined for the analyses but the increment in accuracy of the combined genes analyzes did not increase diagnostic accuracy substantially.

Discussion

Kidney transplantation has evolved tremendously since its development nearly sixty years ago. However in the past two decades no significant improvement in grafts half-lives has been accomplished. (1,3,4) In spite of not being entirely clear the mechanisms that lead to graft deterioration, it seems that almost all the grafts reach the same destiny, chronic graft function deterioration due to interstitial fibrosis and tubular atrophy, formerly known as chronic allograft nephropathy. (16) An usual culprit, clinical acute rejection episodes, have been minimized and its incidence has dropped significantly to around 15% under modern immunosuppressive therapy (4,5). Also the current rates of graft loss are in the order of 2% per year, including patient death. (17) One possible explanation for the late lack of improvement resides in the occurrence of sub-clinical graft injuries since protocol biopsies have shown that inflammatory signals, subclinical acute rejections, are found in stable kidney allografts, suggesting a plausible cause. (18,19,20).

Protocol biopsies may be performed, regardless of renal function, at predetermined times post renal transplantation or in stable grafts. Taking biopsies of stable grafts allowed the discovery of previously unsuspected diseases or conditions since a substantial portion of them present unexpected subclinical pathologies. The main pathologies detected with this approach have been acute lesions, such as cellular and antibody mediated rejection, and chronic lesions, such as interstitial fibrosis and tubular atrophy, and transplant glomerulopathy. The initial description of lymphocytic infiltrates in renal allografts at one week and one month after transplantation in patients with normal kidney function was made by Burdick et al. (21) Following this initial description protocol biopsies have become a routine in many kidney transplant centers around the world (22).

The use of protocol biopsies has provided insights into the pathogenesis of many renal allograft diseases. It is now widely accepted that acute and chronic immune injury,

as well as other pathologies associated with eventual graft loss, may occur initially in the absence of graft dysfunction. Indeed, renal transplant biopsies performed at the time of graft dysfunction may disclose advanced stages of renal injury that may not be amenable to treatment. However, protocol biopsies have several limitations that include their morbidity, cost, potential for sampling error and the oversimplification of the complexity of the distinct mechanisms leading to graft injury (22). Furthermore, the prevalence of early subclinical rejection is decreasing in the modern era of immunosuppression, which argues against their use in patients of low immunological risk. Conversely, the transplantation community has, perhaps unadvisedly, embarked upon protocols of immunosuppressive drug minimization. The consequences of these practices may result in late inflammation in the graft that could prove deleterious to its function in the long term (23). Currently protocol biopsies are performed under the assumption that identifying and properly managing subclinical conditions would potentially lead to improvements in long-term outcomes. Moreover, it has been suggested that the diagnosis of normal histology is helpful in understanding that the patient is being managed correctly and it might inform that it is safe to reduce and/or modulate immunosuppression (24).

In the present study we found that a substantial percentage, around one-half of our biopsied patients, presented abnormal graft histology. This is in accordance with previous studies such as the one by Buchmann et al., in which protocol biopsies in stable patients revealed pathological findings that were associated with a significant decrease in long-term graft function and lead to therapeutic interventions in many patients (25). Other studies, including previous data from our center, also revealed elevated percentages of sub-clinical injuries, half of them being acute rejections (13,26-28). However, in a more recent north-american cohort of kidney transplant recipients under modern immunosuppressive therapy it was found a much lower frequency of sub-clinical rejection, at a sixth month protocol biopsy. The authors concluded that in this scenario protocol biopsies would be of no benefit, allegedly to the low prevalence of subclinical rejection (29).

In support to a possible relevant role of these sub-clinical findings in graft deterioration we observed that overtime estimated GFR was always higher in patients with normal graft histology. In the present work we found a high incidence of borderline rejection episodes, which remains a challenge in the clinical practice,

because many times clinicians may have doubts on the actual meaning of this finding (30-32). In our cohort patients with subclinical borderline rejection presented with lower mean estimated GFR, suggesting a detrimental effect on the graft and perhaps a rejection-like behavior. Also to be considered in the observation that treating subclinical rejections, including borderline inflammation, may lead to more favorable graft outcomes (33). In support, Matl et al, found that patients with subclinical rejection in the third month protocol biopsy, including those with borderline changes and with higher intrarenal expression of RANTES and IP-10, were at higher risk of premature kidney graft loss (34).

However due to the risks and costs involved in performing protocol biopsies a considerable effort has been taken to establish accurate non-invasive methods for allograft monitoring. Among these methods the molecular approaches have been intensely studied to evaluate the immunological status mainly in renal transplant recipients (35-40)

Molecular monitoring of the immunological status of the graft can be divided into strategies for each type of rejection and/or dysfunction. Cellular rejection can be approached by profiling molecular markers of cytotoxic T lymphocytes (such as granzyme A/B, perforin, Fas ligand, and serpin B9), regulatory T cells (FOXP3) and CD4 T cells (the chemokines CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2, and fractalkine, as well as TIM-3) (41). Antibody mediated rejection may be profiled by RANTES, TGF-B1 and CD20 (42) and IF/TA by Vimentin, NKCC2 and E-Cadherin (43). Finally, these novel approaches for monitoring the immune status of the transplanted allografts have the potential of leading to early therapeutic intervention and as consequence improved kidney transplant outcomes (41).

In the choice of the gene panel for the present study we considered the known physiopathologic role of the gene, the previous literature in the subject and the experience from our laboratory. The perforin gene encodes for a pore-forming protein and it is integral component of the lytic machinery of cytotoxic cells. It was successfully studied by Strehlau et al. regarding intragraft gene expression, (44) by Li et al. in the urine (36) and by our group in the peripheral blood leukocytes, urine and renal tissue. (40) TIM3 was selected because it encodes a Th1-specific cell surface protein that regulates macrophage activation. Previous studies by Renesto et al. and Manfro et al.

showed the diagnostic utility of profiling this gene in the kidney transplant setting (45,46). FOXP3 is expressed in regulatory T cells (Treg cells) and it is involved in down-regulating the acute rejection process (38,47). Finally, TGF- β and CTGF gene expression analysis of fibrosis-related genes may be important in the early identification of fibrosis processes, such as IF/TA (48,49)

Immune activation demonstrated by increased mRNA signaling observed in the tissue of stable grafts was initially demonstrated by Lipman and co-workers (50). This work provided evidence that histologic features of rejection were often accompanied by enhanced expression of pro-inflammatory gene transcripts. More recently Matl et al, they evaluated, by real-time RT-PCR, intragraft mRNA expression of several cytokines and chemokines obtained from kidney tissue from three-month protocol biopsies. These authors found that, among other molecules in their gene set, elevated expression of RANTES and IP-10 were significantly related to histologic sub-clinical rejection and perhaps more important were predictive of premature kidney graft loss (34).

In the present study we took the approach of using the protocol graft biopsy as a gold-standard evaluate peripheral blood mRNA transcripts as biomarkers of graft dysfunction, in special acute rejection. We found a significantly lower mRNA expression of perforin, TIM3, FOXP3 and TGF-B in patients affected by other dysfunctions compared with patients with sub-clinical acute rejection and normal histology. Of note, the negative predictive values (NPV) in this study were more robust than the positive predictive values (PPV) and accuracy, leading to the conclusion that, with the current approach, this molecular tool can be useful as a ruling out strategy in the follow up of kidney allograft status. We also tested a combined two and three gene strategy to evaluate the diagnostic parameters and found that they are very similar to those of perforin and TIM3 isolated. Our findings are in agreement with those of Hricik et al, (51) including the low gene expression of the episodes of acute dysfunctions not related to rejection. In the evaluation of fibrosis related genes we were able to distinguish between IF/TA and other dysfunctions through the higher gene expression of CTGF and TGF-B. This finding could be of clinical value in the presence of graft dysfunction associating the results of gene profiling of low expression of mRNA transcripts of rejection gene related and high expression of fibrosis related genes.

The present study has limitations that deserve mention. Initially only half of the patients that went through transplantation were biopsied. Even though this may be

partially inherent to the study design, enrolling only stable patients, the losses of unwilling patients could potentially create a bias in the results. Another limitation refers to arbitrary, hypothesis driven, choice of genes for analyzes. Here the use of high throughput platforms for the efficient discovery and/or selection of noninvasive biomarkers could have been ideal for picking up more relevant and perhaps more biologically involved in the complex processes evaluated (52). In spite of these limitations many of our results reached statistical and perhaps clinical significance.

In conclusion, in the present study we found an elevated incidence of sub-clinical abnormalities in protocol renal biopsy at the third post-transplant month which seems to provide a role for protocol biopsies of stable kidney transplant recipients. However, even if the histological analysis remains the gold standard for diagnostics of graft status and guiding therapeutic decisions at present times, it has major limitations (22,53). In that sense the development of non-invasive biomarkers is of paramount importance and non-invasive mRNA gene expression studies in the urine and peripheral blood may also provide valuable results. Considering the current body of knowledge, we believe that the time has come to test molecular markers in the clinical arena, for guiding therapeutic decisions in renal transplant patients. At the minimum the negative predictive values shown in the present study and others (51) indicates that these techniques might be useful at ruling out acute kidney allograft rejection. In spite of the fact that some of our results did not meet our best expectations, we believe that with constant development and perfectioning of the current techniques and the discovery of novel markers, accurate molecular non-invasive tests may become a clinically useful strategy perhaps in the near future.

References

- 1) Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B. Long-term renal allograft survival: Have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant* 2004; 4:1289–1295
- 2) Nankivell B, Alexander S. Rejection of the Kidney Allograft. *N Engl J Med* 2010; 363:15
- 3) Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche HU. Long-Term Renal Allograft Survival in the United States: A Critical Reappraisal 2011; 11: 450–462
- 4) Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, Thompson B, Gustafson SK, Schnitzler MA, Stewart DE, Cherikh WS, Wainright JL, Snyder JJ, Israni AK, Kasiske BL. OPTN/SRTR 2012 Annual Data Report: kidney. *Am J Transplant* 2014;14 Suppl 1:11-44
- 5) Cecka JM. The UNOS renal transplant registry. *Clin Transpl* 2001:1-18
- 6) Nankivell BJ, Chapman JR. The significance of subclinical rejection and the value of protocol biopsies. *Am J Transplant* 2006;6:2006-2012
- 7) Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolloff-Rubin N, Cosimi AB. [Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation.](#) *N Engl J Med* 2002;346(8):580-90
- 8) Prince O, [Savic S](#), [Dickenmann M](#), [Steiger J](#), [Bubendorf L](#), [Mihatsch MJ](#). Risk factors for polyoma virus nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24(3):1024-33
- 9) Audard V, Matignon M, Dahan K, Lang P, Grimbert P. [Renal transplantation from extended criteria cadaveric donors: problems and perspectives overview.](#) *Transpl Int* 2008;21(1):11-7
- 10) Merion RM. [What can we learn from discarded deceased donor kidneys?](#) *Transplantation* 2006;81(7):973
- 11) Nickerson P, Jeffery J, Gough J et al. Effect of increasing baseline immunosuppression on the prevalence of clinical and subclinical rejection: A pilot study. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1801–1805

- 12) Rush D; Winnipeg Transplant Group. [Insights into subclinical rejection.](#) Transplant Proc 2004;36(2 Suppl):71S-73S
- 13) Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR, Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. Transplantation 2004;78 (2):242-9
- 14) Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. Am J Transplant 2008;8(4):753-60
- 15) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. Methods 2001;25:402-8
- 16) Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. Natural history of chronic allograft nephropathy. N Engl J Med 2003;349(24):2326-33
- 17) Ekberg H, Bernasconi C, Tedesco-Silva H, et al. Calcineurin inhibitor minimization in the Symphony Study: Observational results 3 years after transplantation. Am J Transplant 2009;9(8):1876-85
- 18) Rush DN, Henry SF, Jeffery JR, Schroeder TJ, Gough J. Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. Transplantation 1994;57(2):208-11
- 19) Roberts IS, Reddy S, Russell C et al. Subclinical rejection and borderline changes in early protocol biopsy specimens after renal transplantation. Transplantation 2004; 77: 1194–1198
- 20) Kee TY, Chapman JR, O'Connell PJ, Fung CL, Allen RD, Kable K, Vitalone MJ, Nankivell BJ. Treatment of subclinical rejection diagnosed by protocol biopsy of kidney transplants. Transplantation 2006; 15;82(1):36-42
- 21) Burdick JF, Beschorner WE, Smith WJ, et al. Characteristics of early routine renal allograft biopsies. Transplantation 1984;38(6):679-84
- 22) Mengel M, Sis B, Halloran PF. SWOT analysis of BANFF: Strengths, weaknesses, opportunities and threats of the international Banff consensus

- process and classification system for renal allograft pathology. *Am J Transplant* 2007; 7: 2221–2226
- 23) Rush D. Can protocol biopsy better inform our choices in renal transplantation? *Transpl Proc* 2009; 41(6 Suppl):S6-8
- 24) Rush D. Protocol Biopsies for Renal Transplantation. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2010; 21(1):1-9
- 25) Buchmann TN, Wolff T, Bachmann A, Guerke L, Steiger J, Mihatsch MJ, Dickenmann M. Repeat true surveillance biopsies in kidney transplantation. *Transplantation* 2012;93(9):908-13
- 26) Rush D. Protocol biopsies should be part of the routine management of kidney transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 2002; 40(4):671-3
- 27) Veronese FV, Noronha IL, Manfro RC, Edelweiss MI, Goldberg J, Gonçalves LF. Prevalence and immunohistochemical findings of subclinical kidney allograft rejection and its association with graft outcome. *Clin Transplant* 2004;18(4):357-64
- 28) Choi BS, Shin MJ, Shin SJ, et al. Clinical significance of an early protocol biopsy in living donor renal transplantation: Ten-year experience at a single center. *Am J Transplant* 2005;5(6):1354-60
- 29) Rush D, Arlen D, Boucher A, Busque S, Cockfield SM, Girardin C, et al. Lack of benefit of early protocol biopsies in renal transplant patients receiving TAC and MMF: a randomized study. *Am J Transplant* 2007;(11):2538-45
- 30) Wu K, Budde K, Lu H, Schmidt D, Liefeldt L, Glander P, Neumayer HH, Rudolph B. The severity of acute cellular rejection defined by banff classification is associated with kidney allograft outcomes. *Transplantation* 2014; 97(11):1146-54
- 31) Yamanaka K, Kyo M, Okumi M, Kato T, Kakuta Y, Ichimaru N, Takahara S, Nonomura N. The impact on graft survival of interstitial inflammation in borderline change of allograft kidneys. *Nephrology (Carlton)* 2014;19 Suppl 3:17-20

- 32) Hatoum HH, Patel A, Venkat KK. The Utility of Serial Allograft Biopsies during Delayed Graft Function in Renal Transplantation under Current Immunosuppressive Regimens. *ISRN Nephrol* 2014;2014:292305
- 33) Rush D, Nickerson P, Gough J, McKenna R, Grimm P, Cheang M, Trpkov K, Solez K, Jeffery J. Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9(11):2129-34
- 34) Matl I, Hribova P, Honsova E, Brabcova I, Viklicky O. Potential predictive markers in protocol biopsies for premature renal graft loss. *Kidney Blood Press Res* 2010;33(1):7-14
- 35) Suthanthiran M, Schwartz JE, Ding R, et al. Urinary-Cell mRNA Profile and Acute Cellular Rejection in Kidney Allografts. *N Engl J Med* 2013; 369:1
- 36) Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, Serur D, Mouradian J, Schwartz JE, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* 2001;344(13):947-54
- 37) Anglicheau D, Sharma VK, Ding RC, et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:5330
- 38) Muthukumar T, Dadhania D, Ding RC, et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 2005;353:2342
- 39) Simon T, Opelz G, Wiesel M, et al. Serial peripheral blood perforin and granzyme B gene expression measurements for prediction of acute rejection in kidney graft recipients. *Am J Transplant* 2003;3:1121
- 40) Aquino-Dias EC, Joelsons G, da Silva DM, Berdichevski RH, Ribeiro AR, Veronese FJ, Gonçalves LF, Manfro RC. Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney Int* 2008;73(7):877-84
- 41) Ho J, Wiebe C, Gibson IW, Rush DN, Nickerson PW. Immune monitoring of kidney allografts. *Am J Kidney Dis* 2012;60(4):629-40

- 42) Viklicky O, Hribova P, Volk HD, Slatinska J, Petrasek J, Bandur S, et al. Molecular phenotypes of acute rejection predict kidney graft prognosis. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:173–80
- 43) Anglicheau D, Muthukumar T, Hummel A, Ding R, Sharma VK, Dadhania D, et al. Discover and validation of a molecular signature for the noninvasive diagnosis of human renal allograft fibrosis. *Transplantation* 2012;93(11):1136-46
- 44) Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, et al. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:695-700
- 45) Renesto PG, Ponciano VC, Cenedeze MA, Saraiva Camara NO, Pacheco-Silva A. High Expression of Tim-3 mRNA in Urinary Cells from Kidney Transplant Recipients with Acute Rejection. *Am J Transplant* 2007; 7: 1661–1665
- 46) Manfro RC, Aquino-Dias EC, Joelsons G, Nogare AL, Carpio VN, Gonçalves LF. Noninvasive Tim-3 messenger RNA evaluation in renal transplant recipients with graft dysfunction. *Transplantation* 2008;86(12):1869-74
- 47) Dummer CD, Carpio VN, da Silva Loreto M, Joelsons G, Carraro DM, Olivieri ER, Manfro RC, Gonçalves LF, Veronese FV. Analysis of FOXP3 gene and protein expressions in renal allograft biopsies and their association with graft outcomes. *Ren Fail* 2013;35(4):521-30
- 48) Cheng O, Thuillier R, Sampson E, Schultz G, Ruiz P, Zhang X, Yuen PS, Mannon RB. Connective tissue growth factor is a biomarker and mediator of kidney allograft fibrosis. *Am J Transplant* 2006;6(10):2292-306
- 49) Nogare AL, Dalpiaz T, Pedroso JA, Montenegro RM, Pegas KL, Veronese FV, et al. [Expression of fibrosis-related genes in human renal allografts with interstitial fibrosis and tubular atrophy.](#) *J Nephrol* 2013;26(6):1179-87
- 50) Lipman ML, Shen Y, Jeffery JR, Gough J, McKenna RM, Grimm PC, et al. Immune-activation gene expression in clinically stable renal allograft biopsies: molecular evidence for subclinical rejection. *Transplantation* 1998;66(12):1673-81

- 51) Hricik DE, Nickerson P, Formica RN, et al. Multicenter Validation of Urinary CXCL9 as a Risk-Stratifying Biomarker for Kidney Transplant Injury. *Am J Transplant* 2013; 13(10): 2634–2644
- 52) Naesens M, Sarwal MM. Molecular diagnostics in transplantation. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6(10):614-28
- 53) Reeve J, Sellares J, Mengel M, et al. Molecular diagnosis of T cell-mediated rejection in human kidney transplant biopsies. *Am J Transplant* 2013; 13: 645–655

Legends to the figures

Figure 1. Study flow chart

Figure 2. mRNA expression box-plot demonstrating levels of perforin, TIM3, FOXP3, CTGF, TGF-B and CD138 in peripheral blood according to the histological diagnosis. The box-plot representation shows the medians and the percentile values 10, 25, 75 and 90 for the quantification levels of normalized mRNA (2-DDCT). 18S rRNA quantification was used for normalizing the mRNA amounts present in the peripheral blood leukocytes. The expression levels of Perforin, TIM3 and FOXP3 were significantly higher in patients with AR as compared to patients with other dysfunctions and with normal histology. P-values are the lowest of the comparisons between each group.

Figure 3. Receiver operator characteristic curves obtained from mRNA expression analysis of the peripheral blood of kidney transplant recipients draw at the moment of the 3rd month protocol biopsy.

Figure 1.

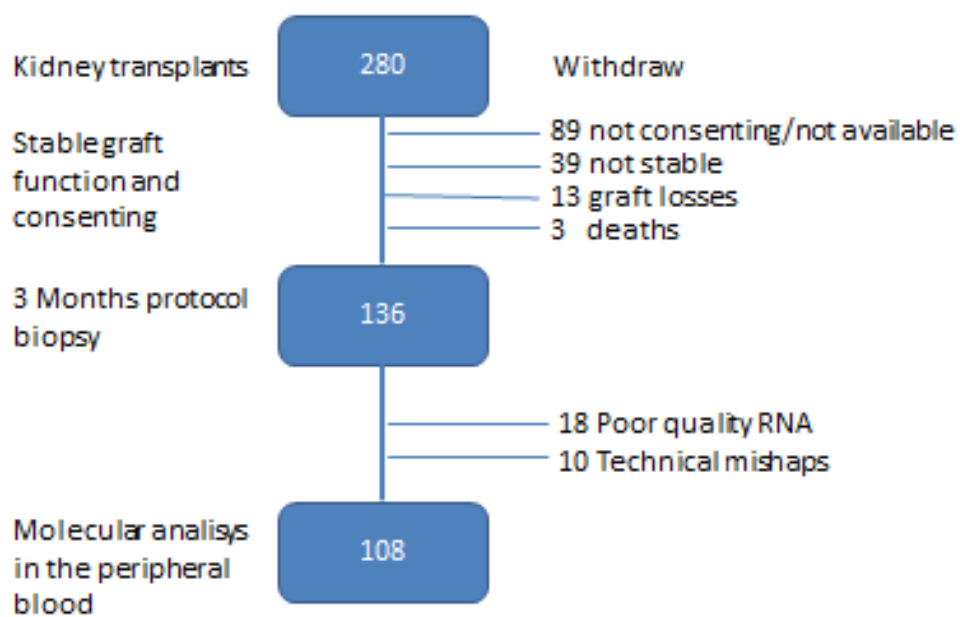


Figure 2.

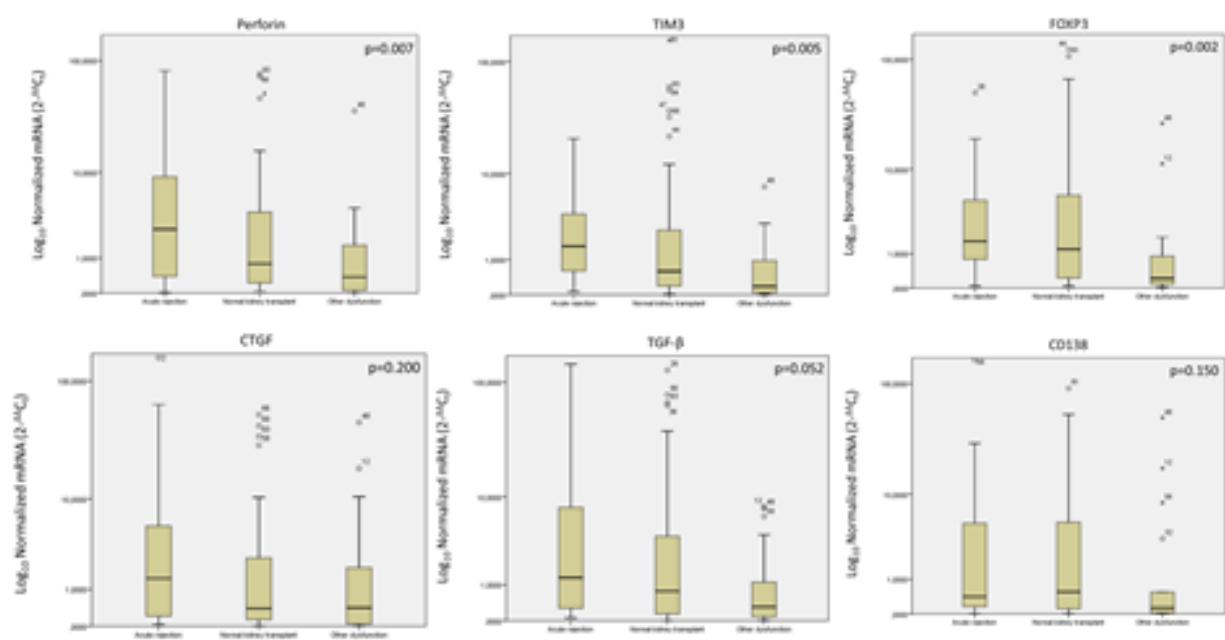


Figure 3.

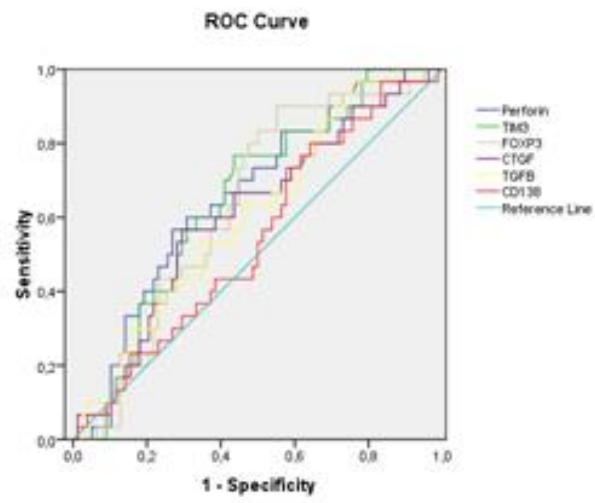


Table 1. Demographic data and transplant related variables

Demographic Data	All n=136	Rejectors n=39	Non-Rejectors n=97	P value
Age b,c	47.6 ± 13.4	47.8 ± 14	47.6 ± 13.2	.935
Gender (Female) ^a	53 (49.1%)	17 (43.6%)	54 (55.7%)	.202
Race (white/non-white)	116/20	31/8	85/12	.589
Donor				
Deceased	92 (85.2%)	33 (84.6%)	81 (83.5%)	
Living related	11 (10.2%)	4 (10.2%)	13 (13.4%)	.764
Living unrelated	5 (4.6%)	2 (5.2%)	3 (3.1%)	
DGF a	58 (53.7%)	26 (66.6%)	51 (52.6%)	.134
Blood transfusions	1.2 ± 2	1.4 ± 2.5	1.1 ± 1.8	.315
HLA mismatches (A, B, DR)	3.8 ± 1.5	3.9 ± 1.8	3.7 ± 1.4	.636
Time of transplantation at biopsy (days)	90 ± 17	90.5 ± 15.9	90.1 ± 17.9	.899
Pregnancies b,c	1.2 ± 1.8	1.1 ± 1.8	1.3 ± 1.8	.510
Cold Ischemia Time (hours) b,c	20.1 ± 10.1	20.8 ± 10.1	19.9 ± 10.1	.634
Previous kidney transplant a	5 (4.6%)	0	7 (7.1%)	.085
Peak pre-transplant HLA b,c		14.35 ±		
PRA Class I	18 ± 28.9%	27.5%	19.4 ± 29.5%	.367
PRA Class II	13 ± 19.2%	10.4 ± 13.9%	14 ± 20.8%	.327
Immunosuppression				
Steroids + MFS + CI	7 (6.5%)	3 (7.7%)	6 (6.2%)	
Steroids + MFS + CI + Basiliximab	52 (48.1%)	20 (51.3%)	48 (49.5%)	.912
Steroids + MFS + CI + ATG	49 (45.4%)	16 (41%)	43 (44.3%)	
Primary kidney disease				
Hypertensive nephropathy	23(21.3%)	14 (35.9%)	19 (19.6%)	
Diabetes	16 (14.8%)	6 (15.4%)	17 (17.5%)	
Adult polycystic disease	13 (12%)	2 (5.1%)	14 (14.4%)	
Primary glomerulonephritis	4 (3.7%)	2 (5.1%)	3 (3.1%)	.578
Others	24 (22.2%)	7 (17.9%)	18 (18.6%)	
Unknown/Undetermined	28 (25.9%)	8 (20.4%)	26 (26.8%)	

^aFisher's Exact Test^bMean ± SD^cStudent's T test^dPearson's Chi-Square Test

MFS = sodium mycophenolate; CI = calcineurin inhibitor

Table 2. Histopathological diagnoses at the third month protocol biopsies

Demographic Data	n	%
Normal graft histology	66	48.5
Acute cellular rejection	39	28.7
Borderline	33	84.6
Banff IA	5	12.8
Banff IB	1	2.6
C4d +	7	17.9
IF/TA	20	14.7
I	18	90.0
II	2	10.0
ATN	7	5.1
Polyomavirus (α SV40 positivity)	3	2.2
Calcineurin inhibitor toxicity	1	0.8

IF/TA = Interstitial fibrosis and tubular atrophy; ATN = Acute tubular necrosis

Table 3. Serum creatinine and estimated GFR up to one year after transplantation according to the histological diagnosis at the third month protocol biopsy

Graft function	Rejectors n=39	Normal Transplant Histology n=66		Other Alterations n=31	P value
Creatinine at biopsy (mg/dL)	1.65 ± 0.58	1.42 ± 0.47		¹ 1.76 ± 0.60	.011
Lower creatinine (mg/dL)	1.45 ± 0.50	² 1.18 ± 0.35		² 1.48 ± 0.58	.002
Creatinine 30 days prior to the biopsy (mg/dL)	1.79 ± 0.71	³ 1.39 ± 0.43		⁴ 1.71 ± 0.58	.001
Creatinine 6 months post transplantation (mg/dL)	1.83 ± 1.1	1.48 ± 0.6		1.79 ± 0.73	.059
Creatinine 12 months post transplantation (mg/dL)	1.88 ± 1.26	⁵ 1.33 ± 0.47		1.68 ± 0.67	.009
MDRD eGFR at biopsy (mL/min)	55.7 ± 23.5	64.2 ± 22.3		⁶ 50.4 ± 17.5	.011
Highest MDRD eGFR (mL/min)	63.3 ± 23.8	⁷ 78.4 ± 26		⁸ 63.3 ± 24.3	.003
MDRD eGFR 30 days prior to biopsy (mL/min)	51.8 ± 21.6	⁹ 65.4 ± 23.4		¹⁰ 52 ± 18.4	.002
MDRD eGFR 6 month post transplantation (mL/min)	44.5 ± 18.1	48.9 ± 14.6		41.9 ± 17.8	.122
MDRD eGFR 12 month post transplantation (mL/min)	48.3 ± 19.6	53.4 ± 15.6		44.5 ± 24.9	.142

ANOVA with Tukey's test Post-Hoc

¹ Normal vs Other Alterations (p=0.014)

² Rej vs Normal / Normal vs Other Alterations (both p=0.009)

³ Rej vs Normal (p=0.001)

⁴ Normal vs Other Alterations (p=0.025)

⁵ Rej vs Normal (p=0.009)

⁶ Normal vs Other Alterations (p=0.013)

⁷ Rej vs Normal (p=0.009)

⁸ Normal e Other Alterations (p=0.019)

⁹ Rej vs Normal (p=0.007)

¹⁰ Normal vs Other Alterations (p=0.017)

Table 4. mRNA expression analysis of selected genes in the peripheral blood of renal transplant patients at the third month protocol biopsy

Gene expression	Rejectors n=31	Normal Transplant Histology n=52	Other Alterations n=25	p value
Perforin ¹	2.58 (0.38-9.43)	0.79 (0.22-4.46)	0.38 (0.05-1.96)	.007
TIM3 ²	1.62 (0.53-4.12)	0.59 (0.19-2.7)	0.18 (0.04-1.19)	.005
FOXP3 ³	1.57 (0.76-5.08)	1.19 (0.22-5.78)	0.21 (0.08-0.93)	.002
CTGF	1.46 (0.20-5.64)	0.39 (0.12-2.76)	0.41 (0.04-2.71)	.200
TGF-B ⁴	1.30 (0.25-8.07)	0.77 (0.13-4.46)	0.31 (0.08-1.63)	.052
CD138	0.41 (0.15-6.82)	0.56 (0.11-5.41)	0.13 (0.2-1.29)	.150

Values expressed are medians and interquartile interval (P25-P75)

Kruskal-Wallis test

Mann-Whitney between groups

¹ Rejection vs Other Alterations p=0.003 / Normal vs Other Alterations p=0.041

² Rejection vs Other Alterations p=0.001 / Normal vs Other Alterations p=0.024

³ Rejection vs Other Alterations p=0.001 / Normal vs Other Alterations p=0.005

⁴ Rejection vs Other Alterations p=0.013

Table 5. Diagnostic parameters from isolated and simultaneous gene expression measurements for the diagnosis of acute sub-clinical rejection of renal allografts.

Genes	AUC	Lower Bound	Upper Bound	p value	SE	SP	PPV	NPV	AC	p value
Perforin ¹	.657	.547	.768	.011	63	62	35	83	62	.025
TIM3 ¹	.648	.539	.756	.018	63	67	37.2	83	64.8	.017
FOXP3 ¹	.634	.526	.742	.032	55	58	30.6	79.6	57.4	.220
Perforin and TIM3 ¹	.599	.476	.721	.113	46.6	73.1	40	78.1	65.7	.050
Perforin and FOXP3 ¹	.563	.440	.686	.313	43.3	69.2	48.1	76	62	.218
TIM3 and FOXP3 ¹	.592	.470	.715	.138	46.6	71.8	53.8	77.7	64.8	.068
1 Gene Hyperexpressed ¹	.644	.532	.755	.021	80	48.7	37.5	86.4	57.4	.007
3 Genes Hyperexpressed ¹	.572	.448	.695	.249	40	74.3	37.5	76.3	64.8	.143

¹Positive scoring was determined from relative gene expression above (+) the gene and time-interval specific threshold values.

²Values given are gene expression values relatives to the postoperative set to 1.

Se: sensitivity; Sp: specificity; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value; Ac: accuracy. Presented as percentages

x2

6 Considerações finais

As considerações finais do presente estudo serão apresentadas de acordo com os objetivos inicialmente propostos e as conclusões a que se pode chegar a partir dos mesmos.

Em relação ao objetivo geral *“Avaliar métodos diagnósticos moleculares não invasivos que possam produzir resultados acurados em termos de detectar agressões sub-clínicas aos aloenxertos renais”*, conclui-se que ao final deste estudo, esta metodologia parece estar avançando para o momento em que poderá ser testada na prática clínica. Em um apanhado geral, até o momento, faltam estudos que mostrem um bom valor preditivo positivo. Os valores preditivos negativos, úteis para a exclusão da possibilidade de rejeição, já seriam adequados para a testagem clínica. Acreditamos que já possam ser planejados estudos, ensaios clínicos randomizados, que avaliem o impacto das metodologias moleculares em resultados obtidos na prática clínica já que essas metodologias se encontram há um longo tempo apenas no campo da pesquisa.

Em relação aos objetivos específicos, as considerações serão apresentadas a seguir:

Objetivos secundários

3.2.1. *Avaliar a incidência de alterações histopatológicas em biópsias renais de pacientes estáveis no terceiro mês pós-transplante;*

- Foi observada neste estudo uma incidência de 51,5% de alterações histológicas em pacientes com função estável no terceiro mês pós-transplante. Estes achados consolidam a importância do acompanhamento rigoroso dos pacientes transplantados renais, apesar da estabilidade da função do enxerto na vigência de processos que podem ser deletérios a sua função tardia.

3.2.2. *Avaliar a expressão gênica de FOXP3, TIM3 e Perforina no sangue periférico e verificar a sua acurácia para o diagnóstico de rejeição aguda;*

- A análise da expressão gênica de FOXP3, TIM3 e Perforina permitiu diferenciar o grupo de pacientes com rejeição do grupo de pacientes com outras disfunções, sendo que nos pacientes com rejeição os genes apresentaram aumento de expressão em relação aos pacientes com outras disfunções. As acurácias diagnósticas foram: Perforina [62%], TIM3 [64,8%] e FOXP3 [57,4%] e os respectivos valores preditivos negativos de 83%, 83% e 79,6%. Na análise combinada dos três genes obteve-se o valor preditivo negativo de 86,4%.

3.2.3. *Avaliar a expressão gênica de TGF- β e CTGF no sangue periférico como potenciais marcadores moleculares de fibrose intersticial e atrofia tubular;*

- As medianas de expressão gênica de TGF- β e CTGF no grupo de pacientes com IF/TA foi significativamente superior às medianas no grupo de outras disfunções, qualificando estes genes como marcadores de fibrose intersticial e atrofia tubular e justificando a sua testagem em maior número de pacientes.

3.2.4. *Avaliar o impacto das alterações sub-clínicas histológicas e de suas expressões moleculares na função e sobrevida dos enxertos.*

- De acordo com os achados do estudo, as médias de creatinina do grupo dos pacientes sem alterações histológicas foram sempre menores do que as médias dos grupos com rejeição aguda e o grupo outras disfunções. Como esperado, as taxas de filtração glomerular estimada pelo método MDRD seguiram a tendência oposta e foram sempre maiores nestes pacientes sem alterações histológicas. O significado e o impacto das alterações *borderline* do enxerto renal ainda são bastante controversos. Entretanto nos parece, a partir do observado na função dos enxertos tanto no momento da biópsia como no seguimento de um ano, que esta situação possa ter impacto negativo ainda não adequadamente avaliado. Não pudemos avaliar o impacto nas sobrevidas de enxertos por esse desfecho ter sido muito infrequente. Acreditamos porém que o seguimento observacional da coorte desse estudo em médio e longo prazos possa demonstrar esse efeito, caso existente.

7 Anexos