

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

**BIOMARCADORES MOLECULARES NA REJEIÇÃO MEDIADA POR  
ANTICORPOS EM TRANSPLANTADOS RENAIIS**

**Tiago Dalpiaz**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Santos Gonçalves**

Dissertação de Mestrado

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**BIOMARCADORES MOLECULARES DA REJEIÇÃO MEDIADA POR  
ANTICORPOS EM TRANSPLANTADOS RENAIIS**

Dissertação para obtenção do Título de Mestre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Faculdade de Medicina.

**Tiago Dalpiaz**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Santos Gonçalves

Porto Alegre

2011

### CIP - Catalogação na Publicação

Dalpiaz, Tiago  
BIOMARCADORES MOLECULARES NA REJEIÇÃO MEDIADA POR  
ANTICORPOS EM TRANSPLANTADOS RENAIIS / Tiago Dalpiaz.  
-- 2011.  
67 f.

Orientador: Luis Felipe Santos Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2011.

1. Transplante renal. 2. Rejeição mediada por  
anticorpos. 3. Biomarcadores. 4. PCR Real Time. I.  
Gonçalves, Luis Felipe Santos, orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Luiz Felipe Santos Gonçalves, pela sua orientação, paciência e dedicação durante estes últimos dois anos.

Ao grupo de pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Nefrologia, pela colaboração e companheirismo.

A todos os colegas do Serviço de Nefrologia, pelo auxílio nas coletas de amostras.

Aos meus amigos, pela compreensão e amizade.

A toda minha família, pelo incentivo em todos os momentos.

Ao FIPE-HCPA, FUNDONEFRO e CAPES, pelo auxílio financeiro.

*“O mundo é como um espelho que devolve  
a cada pessoa o reflexo de seus próprios pensamentos.  
A maneira como você encara a vida é que faz toda diferença.”*

Luis Fernando Veríssimo

## SUMÁRIO

<b>ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>1 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>11</b>
1.1 TRANSPLANTE RENAL.....	11
1.2 REJEIÇÃO AO TRANSPLANTE RENAL .....	13
1.2.1 <i>Rejeição aguda</i> .....	14
1.2.2 <i>Rejeição aguda celular</i> .....	15
1.2.3 <i>Rejeição aguda mediada por anticorpos</i> .....	17
1.2.3.1 <i>Fragmento C4d</i> .....	19
1.2.3.2 <i>Anticorpos específicos contra o doador (DSA)</i> .....	20
1.2.2. <i>Rejeição crônica</i> .....	21
1.3 BIOLOGIA MOLECULAR NA DISFUNÇÃO DO ENXERTO RENAL.....	22
1.3.1 <i>Marcadores moleculares da rejeição humoral</i> .....	25
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>39</b>
<b>4 ARTIGO ORIGINAL.....</b>	<b>40</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>61</b>
<b>6 APÊNDICES.....</b>	<b>63</b>
A – PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS .....	63
B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	65

## ABREVIATURA E SIGLAS

**APC:** *Antigen presenting cells* – Células apresentadoras de antígenos

**ABMR** – Acute antibody mediated rejection - Rejeição aguda mediada por anticorpos.

**DSA:** *Donor specific antibodies* – Anticorpos específicos contra o doador

**HLA:** *Human leukocyte antigen* - Antígenos leucocitários humano

**IL:** *Interleukin* – Interleucina

**mRNA:** RNA mensageiro

**NCE:** Nefropatia crônica do enxerto

**NTA:** Necrose Tubular Aguda

**PTCs:** *Peritubular capillaries* - Capilares peritubulares

**RA:** rejeição aguda

**RAC:** rejeição aguda celular

**RAMA:** Rejeição aguda mediada por anticorpos

**TCR:** *T cell receptor* - Receptor de célula T

**Th1 e 2:** Células T Helper 1 e 2

**vWF:** *Von Willebrand Factor* - Fator de Von Willebrand

## RESUMO

**Introdução:** A rejeição aguda mediada por anticorpos (RAMA) representa atualmente uma importante limitação para o sucesso do transplante renal. Seu diagnóstico é complexo e impreciso e avaliações moleculares com o desenvolvimento de biomarcadores não invasivos podem representar métodos promissores para seu diagnóstico. O objetivo do estudo foi avaliar, em pacientes transplantados renais, a expressão de genes relacionados à rejeição medida por anticorpos e celular, em tecido renal e no sangue periférico. **Métodos:** Estudo transversal com 56 pacientes transplantados renais divididos nas seguintes categorias diagnósticas de acordo com a classificação Banff 2007: RAMA, rejeição aguda celular (RAC), necrose tubular aguda (NTA), RAMA+RAC e normal. Foi utilizada a técnica de PCR Real-Time para a quantificação relativa dos genes: CD20, CD138, Fator de von Willebrand (FVW), TIM-3 e FOXP-3. **Resultados:** Pacientes com RAMA apresentaram, tanto no tecido renal quanto no sangue periférico, transcritos de mRNA para CD20 e TIM-3 significativamente aumentados ( $P < 0,01$ ), em relação aos grupos NTA e normal. Outros resultados com expressão significativamente maior na RAMA em relação ao grupo normal foram FOXP-3 no sangue ( $P < 0,01$ ), CD138 na biópsia ( $P < 0,01$ ) e FVW na biópsia e no sangue ( $P < 0,05$ ). As curvas ROC demonstraram áreas sobre a curva (ASC) de 0,950 ( $P < 0,001$ ) para CD20 no sangue periférico. Utilizando o ponto de corte 6,0 obteve-se sensibilidade 94% e especificidade 88% para o diagnóstico de RAMA. CD138 no tecido renal apresentou ASC de 0,905 ( $P < 0,001$ ), e com ponto de corte 6,0 encontrou-se sensibilidade 91% e especificidade 85%. **Conclusão:** A expressão de CD20, tanto em tecido renal como no sangue periférico, e de CD138 no tecido foram significativamente maiores em pacientes com RAMA. Mais estudos poderão confirmar estes achados e possibilitar a utilização da expressão destes e de outros genes como biomarcadores para o diagnóstico de RAMA.

**Palavras-chave** – transplante renal, biomarcadores, mRNA, rejeição mediada por anticorpos.



## ABSTRACT

**Introduction:** Acute antibody mediated rejection (ABMR) is currently a major limitation to the success of renal transplantation. Its diagnosis is complex and inaccurate and the development of non-invasive biomarkers can represent promising methods for that. The aim of this study was to evaluate, in kidney transplant patients, the expression of genes related to the antibody mediated rejection and cellular, in renal tissue and peripheral blood. **Methods:** Cross-sectional study with 56 kidney transplant patients divided into the following diagnostic categories according by the Banff 2007 classification: ABMR, acute cellular rejection (ACR), acute tubular necrosis (ATN), ACR+ABMR and normal. We used Real Time PCR to quantify relative expression of genes: CD20, CD138, von Willebrand factor (vWF), FOXP-3 and TIM-3. **Results:** Patients with ABMR presented, both in renal tissue and in peripheral blood, CD20 and TIM-3 mRNA transcripts significantly increased ( $P < 0.01$ ), in relation to groups ATN and normal. Other results with significantly higher expression in ABMR in relation to the normal group were FOXP-3 in the peripheral blood ( $P < 0.01$ ), CD138 in tissue ( $P < 0.01$ ) and vWF renal tissue and blood ( $P < 0.05$ ). The ROC curves demonstrated area under the curve (AUC) of 0.950 ( $P < 0.001$ ) for CD20 in peripheral blood. Using the 6.0 cutoff point was obtained 94% sensitivity and 88% specificity for the diagnosis of RAMA. CD138 in renal tissue showed AUC 0, 905 ( $P < 0.001$ ), and 6.0 cutoff point was found 91% sensitivity and specificity 85%. **Conclusion:** The expression of CD20, both in renal tissue and in peripheral blood, and CD138 in tissue were significantly higher in patients with ABMR. More studies can confirm these findings and enable the use of the expression of these and other genes as biomarkers for the diagnosis of ABMR.

**Keywords** - kidney transplantation, biomarkers, mRNA, antibody mediated rejection.

## INTRODUÇÃO

O transplante renal é atualmente a melhor alternativa no tratamento da insuficiência renal crônica terminal. Esta opção possibilita a melhoria da qualidade de vida dos pacientes que apresentam esta patologia. Porém os transplantes realizados, embora crescentes a cada ano, são insuficientes para suprir a grande lista de espera de pacientes renais crônicos.

Considerando toda a complexidade que envolve o processo do transplante renal e todo o cuidado que deve ser dispensado ao receptor, a rápida e precisa identificação dos episódios de rejeição é fundamental para o sucesso desse procedimento e a obtenção de uma maior sobrevida do enxerto. Dentre as principais formas de rejeição, a mediada por anticorpos ou humoral é a mais agressiva e requer um tratamento rápido e eficiente.

Nesta forma de rejeição, a presença de anticorpos anti-HLA (*human leucocyte antigen*), adquiridos pré ou pós transplante, podem ocasionar respostas imunológicas graves ao enxerto, levando a sua perda se não tratadas adequadamente e descobertas em tempo hábil. O diagnóstico preciso e imediato é fundamental para iniciar rapidamente o tratamento, cujo principal objetivo é baixar a titulação destes anticorpos, reduzindo a produção dos mesmos pelos plasmócitos, dessa forma diminuindo as severas respostas imunológicas contra o enxerto.

Atualmente os critérios diagnósticos da rejeição mediada por anticorpos, tanto aguda como crônica, definidos pela classificação Banff, levam em consideração a avaliação da presença de anticorpos específicos contra o doador (DSA), a deposição de complemento C4d na biópsia renal e a presença de achados histopatológicos.

Com o avanço da biologia molecular e o crescimento da utilização de biomarcadores, torna-se crescente a procura por novas alternativas aos métodos tradicionais. A quantificação da expressão de marcadores celulares indicando assinaturas moleculares deverá se tornar uma ferramenta considerável no diagnóstico de rejeição. Assim, buscando o diagnóstico precoce e não-invasivo da rejeição humoral, o objetivo principal do presente trabalho foi quantificar a expressão gênica de marcadores envolvidos no processo de rejeição ao enxerto, utilizando amostras de sangue e tecido renal.

Este projeto contou com o apoio financeiro do FIPE (Fundo de Investimento a Pesquisa e Eventos do HCPA), FUNDONEFRO e da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob o número 09-382.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Transplante renal

A insuficiência renal crônica é caracterizada pela perda progressiva e irreversível da função renal. No estado avançado da doença o melhor método de tratamento é o transplante renal (1). No Brasil, no ano passado, 73,2% dos transplantes de órgãos realizados foram renais, segundo a Associação Brasileira de Transplantes (ABTO). O número de transplantes vem aumentando: em 2010, foram 4630 transplantes renais, o que significa um aumento de 8% em relação a 2009 e, desse total 64,6% dos transplantes foram realizados com doador falecido (2).

Do ponto de vista clínico, o transplante renal apresenta desafios como tratamento e rápido diagnóstico dos episódios de rejeição aguda (RA). O precoce diagnóstico e tratamento da RA pode contribuir para prolongar a sobrevida do enxerto a longo prazo, evitando o desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto (NCE) (3). Esta resulta de um conjunto de fatores, imunológicos prévios (como as rejeições agudas) ou mantidos (rejeição crônica), além de insultos não-imunológicos resultantes da hiperfiltração, hipertensão e toxicidade de drogas (4).

Durante a década de 1960, fase da imunossupressão com corticoesteróide e azatioprina, a sobrevida de enxerto em um ano era de apenas 40%, sendo a maioria das perdas por rejeição aguda ou hiperaguda (5). Com a utilização da prova cruzada (“cross-match”) e os primeiros relatos da detecção de anticorpos anti-HLA do doador pré-formados, circulantes no

soro do receptor, a rejeição hiperaguda tornou-se um evento raro (6-8). No entanto, as taxas de rejeição aguda continuavam altas, aproximadamente 50% dos transplantados apresentavam algum episódio de rejeição aguda (9). O uso de protocolos potentes de imunossupressão, nos dias de hoje, fez com que o número de rejeições agudas seja reduzido (10). Porém, dependendo do tipo de rejeição, o período pós-transplante em que ocorre, e a resposta terapêutica, a rejeição aguda pode resultar em redução significativa da sobrevida do enxerto. Em análise recente, rejeições no primeiro trimestre pós-transplante apresentam risco relativo de perda de enxerto aos 3 anos de 1,35, quando comparados aos pacientes sem rejeição. Após 6 meses o risco relativo sobe para 2,74 (11). Um aumento proporcional do número de rejeições graves parece estar ocorrendo mais recentemente. É possível que esse aumento esteja relacionado com o perfil do paciente que está sendo transplantado. Um longo tempo de diálise aliado a transfusões sanguíneas prévias, gestações, e um número crescente de retransplantes faz com que cada vez mais pacientes sensibilizados estejam recebendo enxertos renais (12). Uma vez que as medicações imunossupressoras atuais têm sua atividade principal sobre a imunidade celular, o componente humoral envolvido nesses processos passa a ter relevância maior, e sua presença está associada a rejeições de pior prognóstico (13, 14). Ainda assim, os resultados da transplantação nos dias de hoje são excelentes a curto prazo. O já citado avanço na imunossupressão, o aprimoramento dos cuidados pré e pós-operatórios, a profilaxia para infecções e o tratamento agressivo das mesmas, associado ao manejo mais preciso dos diferentes tipos de injúrias ao enxerto, leva a uma taxa de sobrevida renal que chega a 90%, no primeiro ano (15).

O controle do sistema imune está diretamente relacionado à sobrevivência do enxerto. A vigilância deste sistema depende do Complexo Principal de Histocompatibilidade - CPH (ou MHC do inglês - major histocompatibility complex), uma região genética ampla que codifica as moléculas HLA (antígenos leucocitários humanos). O sistema HLA tem a função de apresentar peptídeos antigênicos, estes são reconhecidos pelos linfócitos T, e levam a uma resposta imunológica (16). Fatores como uma maior compatibilidade HLA do doador com o receptor, favorecem a tolerância do sistema imune e aumentam a sobrevivência do enxerto tanto em transplantes intervivos quanto em doador falecido (17). Outros aspectos relacionados ao doador, como idade, sexo, raça, causa da morte e tempo de isquemia (quando doador falecido), também causam influência nas taxas de disfunção inicial e na sobrevivência do enxerto (18).

## 1.2 Rejeição ao enxerto renal

O grande desafio, após o transplante, é evitar complicações que possam comprometer o funcionamento do enxerto e levar à sua perda. Os principais problemas estão relacionados aos quadros de rejeição, que aparecem nas formas hiperaguda, aguda e crônica, e são causados geralmente por células ou por um componente humoral. A monitorização dos enxertos renais é feita pela dosagem de creatinina sérica, principal marcador para avaliar a função do rim e detectar alguma disfunção renal (19), e pela biópsia por indicação clínica, o método “padrão-ouro” para avaliar a condição do enxerto, uma técnica altamente invasiva que pode provocar complicações e até mesmo levar à perda do órgão (20).

As biópsias também podem ser protocolares, cujo objetivo é diagnosticar rejeições subclínicas (21). São realizadas em pacientes sem alterações da função renal e identificam precocemente a forma subclínica, permitindo o tratamento preventivo antes de o paciente apresentar creatinina alterada, favorecendo a redução de lesões histológicas no enxerto (22).

### 1.2.1 Rejeição aguda

A ocorrência de rejeição aguda historicamente sempre foi o principal obstáculo para o funcionamento dos enxertos (23). Quando associada à disfunção inicial representa um fator negativo na sobrevida a longo prazo do enxerto (24). Além da rejeição aguda, outros eventos podem causar disfunção aguda do enxerto, conforme apresentado na tabela 1 (25).

Tabela 1. Disfunção Aguda de Enxerto Renal – diagnóstico diferencial

<b>Evento</b>	<b>Método Diagnóstico</b>
Estenose/trombose de artéria ou veia renal	Cintilografia Renal; Ecodoppler de enxerto
Fatores urológicos: estenose de ureter, fístula urinária	Ecografia do enxerto; Urotomografia ou ressonância magnética
Necrose tubular aguda	Biópsia Renal
Infecções: pielonefrite aguda, citomegalovirose, polioma vírus	EQU/Urocultura, antigenemia para CMV, imunohistoquímica para polioma, Biópsia renal
Toxicidade por medicação (Ciclosporina/Tacrolimus)	Biópsia Renal, dosagem dos níveis séricos
Microangiopatia Trombótica	Biópsia Renal
Rejeição Aguda Celular	Biópsia Renal
Rejeição Aguda Humoral	Biópsia Renal + C4d + anticorpos anti-HLA do doador
Rejeição Hiperaguda	Clínica + exames de perfusão + Biópsia Renal
Rejeição Crônica	Biópsia Renal
Recidiva de glomerulopatia	Biópsia Renal
Glomerulopatia de novo	Biópsia Renal

A rejeição aguda é subdividida em dois tipos principais de acordo com os mecanismos fisiopatológicos envolvidos: rejeição aguda celular, com infiltrado de células T no tecido renal, principalmente nos túbulos, causando tubulite (26);

e rejeição aguda mediada por anticorpos, quando há reconhecimento de anticorpos contra os antígenos do doador, levando a ativação da via clássica do complemento (27).

### 1.2.2 Rejeição aguda celular

A rejeição aguda celular é caracteristicamente uma resposta imune mediada por linfócito T, a partir do reconhecimento de antígenos HLA do doador expostos na superfície de suas células apresentadoras de antígenos (APC – antigen presenting cells) ou pela apresentação dos mesmos junto às moléculas HLA pelas APC do receptor, após esses antígenos terem sido processados e ligados juntos ao HLA (28). A essas duas maneiras de expressão denomina-se apresentação direta ou indireta, respectivamente (figura1) (29).

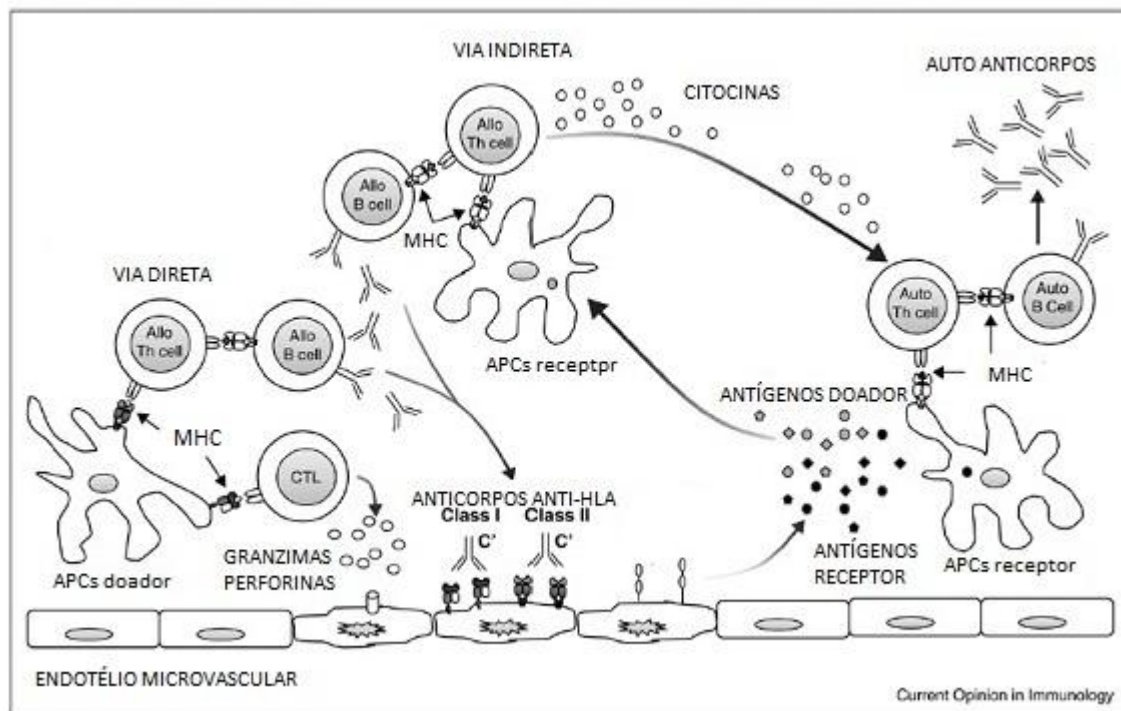


Figura 1: Vias direta e indireta na rejeição ao enxerto.  
\*Adaptado de Zhang e Reed, *Curr Opin Immunol*, 2010.



Os antígenos HLA do doador, apresentados pelas APCs, são reconhecidos pelos linfócitos T, e ligam-se ao TCR (T Cell-Receptor). Além desta ligação, para ativação dos linfócitos T são necessários sinais co-estimulatórios realizados pelas moléculas B7.1 e B7.2, que estão presentes na superfície das APCs e ligam-se aos receptores CD28 dos linfócitos T. Essas ligações induzem ao desencadeamento de vias intra-celulares, que resultam em ativação da calcineurina e esta, por sua vez, promove ativação do fator de ativação nuclear das células T (NFAT) que estimula a proliferação dos linfócitos T pela síntese de IL-2 e pelo aumento da expressão do receptor de IL-2 (IL-2R) na superfície linfocitária. O resultado é expansão clonal de linfócitos T que migram para o enxerto, onde irão exercer sua função efetora (30).

O reconhecimento do antígeno na ausência de co-estímulo inativa as células T, induzindo a um estado de não responsividade ao antígeno, é conhecido com anergia. As células anérgicas são incapazes de produzir IL-2, o que impede a proliferação e a diferenciação em células efetoras. A população de linfócitos T ativados produz uma série de citocinas que regulam o sistema imunológico. Pode-se dividir os linfócitos ativados em dois perfis: Th1 e Th2. Linfócitos Th1 secretam IL-2, interferon alfa, IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF). Essa subpopulação promove: reação de hipersensibilidade tardia, atividade citolítica, opsonização e produção de anticorpos fixadores de complemento tipo IgG. Os linfócitos Th2 sintetizam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, e estimula eosinófilos e produção de IgE.

Os linfócitos T CD8+ são responsáveis pelo reconhecimento e destruição das células-alvo. Promovem destruição da célula do enxerto através da liberação de mediadores citolíticos na direção da célula-alvo (granzinas e

perforinas), que morre por necrose ou apoptose. Outra via de ataque citolítico utilizada pelas células T CD8+ é a indução de morte celular por interação Fas/Fas ligante, que leva a apoptose da célula-alvo (31). Em paralelo, citocinas produzidas pelos linfócitos T CD4+, principalmente via estimulação pela IL-4, promovem ativação de linfócitos B e plasmócitos, promovendo a formação de anticorpos e memória celular.

A caracterização diagnóstica de rejeição aguda envolve avaliação da inflamação que ocorre no interstício, túbulos e vasos renais. Em geral, uma biópsia é considerada representativa quando possui pelo menos 10 glomérulos e 2 vasos renais (artérias). A rejeição aguda celular é caracterizada essencialmente pela presença de infiltrado inflamatório intersticial focal ou difuso com predomínio de mononucleares e evidências de agressão tecidual, ou seja, invasão de túbulos (tubulite) ou vasos (vasculite) por células inflamatórias (32).

### 1.2.3 Rejeição aguda mediada por anticorpos

A rejeição aguda humoral diz respeito ao processo de agressão ao enxerto mediada por anticorpos, é associada a mau prognóstico, pois o seu potencial destrutivo ao enxerto é grande (33). Como necessita da formação de anticorpos, é bem mais comum em pacientes previamente sensibilizados (34).

A prova cruzada pré-transplante eliminou, na prática, as reações hiperagudas, que são aquelas mediadas por anticorpos pré-formados contra antígenos HLA do enxerto, presentes no momento da transplantação, e que resultam em perda imediata do órgão logo após o início da perfusão sanguínea (35). Deste modo a prova cruzada pré-transplante dos casos de rejeição

humoral é geralmente negativa por citotoxicidade, mas pode ser positiva por citometria de fluxo, significando a presença de anticorpos pré-formados em baixa concentração. Além disso, antígenos que são expressos em células endoteliais e não em leucócitos, células alvos na prova cruzada, podem causar respostas imunológicas na presença de complemento e causar rejeição (36). A ligação do anticorpo em antígenos do enxerto promove a ativação da cascata do complemento e coagulação, com envolvimento microvascular e evolução freqüente para perda do enxerto se não for adequadamente tratada, e mesmo quando tratada, resulta via de regra em lesão grave ao enxerto (37). Atualmente considera-se que para o diagnóstico de rejeição humoral seja feito com segurança, é necessário: (a) detecção de atividade humoral anti-doador, demonstrado pela positividade da prova cruzada ou pelo surgimento de anticorpo anti-doador (DSA); (b) demonstração de depósito da fração C4d do complemento nos vasos do enxerto; (c) danos histopatológicos, como glomerulite, capilarite ou endotelite com infiltrado de neutrófilos ou monócitos (38, 39).

O tratamento para rejeição humoral baseia-se no racional de que é necessária a retirada de anticorpos pré-formados e que se iniba a síntese de novos (40). A terapêutica atual consiste em: plasmaferese, infusão de plasma de forma isolada, infusão de imunoglobulinas totais ou anti-CMV (associada ou não à plasmaferese) (41). Além desses métodos, o uso de medicamentos que causam deleção de plasmócitos (células formadoras de anticorpos) e a monitorização constante dos níveis de anticorpos circulantes após o transplante têm sido empregados com sucesso, e apesar do elevado custo, deverão se tornar aliados à terapia tradicional (42, 43).

### 1.2.3.1 Fragmento C4d

A origem do fragmento C4d está na via clássica de ativação do complemento, que pode ocorrer a partir da ligação antígeno-anticorpo (44). A ativação da via clássica inicia pela interação do imunocomplexo com a fração C1q que promove ativação de C1s. O C1s ativado cliva C4 gerando C4a e C4b, este último é responsável pela formação de C4d (figura 2) (45). Pela capacidade de ligação covalente na membrana celular, o C4d permanece fixado no tecido permitindo sua detecção mesmo em fases mais tardias quando outros componentes do complemento não são mais detectados (46).

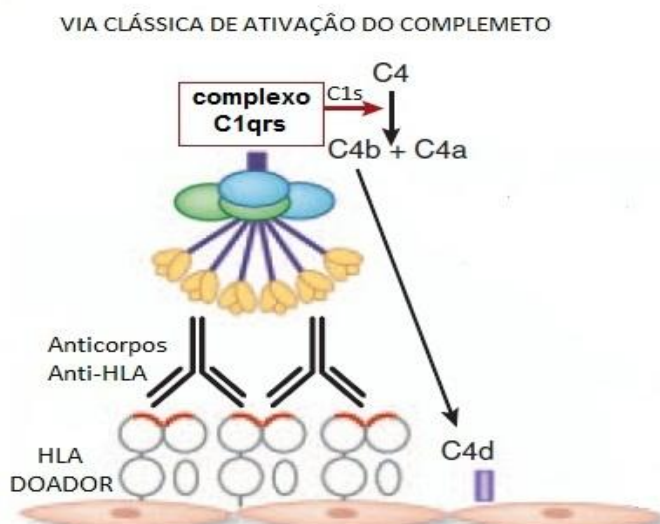


Figura 2:

Formação do complemento C4d.  
\*Adaptado de Heeger, *Kidney Int*, 2010.

Em aloenxertos renais, o C4d é detectado nos capilares peritubulares. Ele se tornou um importante marcador para avaliar se houve interação entre os aloanticorpos e a microcirculação do enxerto (47). Sua detecção é possível pelas técnicas de imunofluorescência ou por imunohistoquímica, com a utilização de anticorpos monoclonais ou policlonais (48).

Feucht *et al*, foram os primeiros a demonstrar a associação entre a coloração C4d, rejeição mediada por anticorpos e redução da sobrevivência de enxertos renais. No mesmo estudo, houve associação do C4d+ com

retransplantes e presença de anticorpos anti-HLA, sugerindo a correlação do marcador com a imunidade humoral (49).

Diversos estudos posteriores confirmaram estas implicações de Feucht entre C4d e rejeição humoral. Por fim, a marcação C4d foi estabelecida, pela classificação Banff, como marcador diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos, junto a aspectos histológicos e sorológicos, quadro 1 (50).

Quadro 1: Métodos para o diagnóstico de rejeição aguda mediada por anticorpos.

<b>Métodos diagnósticos da RAMA</b>		
<i>Deposição de C4d nos capilares peritubulares</i>	<i>Presença de anticorpos</i>	<i>Histopatologia</i>
Positivo focal - >25% Positivo difuso - >50%	Formação pré ou pós transplante de anticorpos específicos contra o doador.	Glomerulite, capilarite e vasculite. Infiltrado de células polimorfonucleares.

#### 1.2.3.2 Anticorpos específicos contra o doador (DSA)

A sensibilização prévia de pacientes contra antígenos HLA, adquirida em transfusões, gestações ou transplantes prévios, ou a formação pós transplante desses anticorpos representa uma barreira para o sucesso do transplante (51). Pacientes sensibilizados apresentam uma menor sobrevida do enxerto quando comparados a não sensibilizados (52, 53).

Halloran *et al*, foram os primeiros a relatar a formação de anti-HLA Classe I no pós transplante como fator de risco para o desenvolvimento de rejeição aguda. Os pacientes não sensibilizados que tiveram formação de anticorpos, no período pós transplante, apresentaram este tipo de evento (54). Os níveis de anticorpos circulantes também estão associados à gravidade da rejeição aguda. O envolvimento vascular, glomerulite e infarto renal são predominantemente observados na presença de anticorpos (55).

A combinação C4d e DSA como sinal de pior prognóstico e a associação com redução da sobrevida de enxertos também está descrita em outros tipos de transplante (56).

#### 1.2.4 Rejeição crônica

A rejeição crônica, historicamente definida como nefropatia crônica do enxerto (NCE), é caracterizada por uma evolução lenta, resultando em atrofia dos túbulos e fibrose no interstício do enxerto, é a principal causa de perda do órgão a longo prazo (57). As causas da NCE não estão claramente elucidadas, sabe-se que fatores não imunológicos e fatores imunológicos estão envolvidos. Os fatores com bases imunológicas são rejeição aguda, rejeição subclínica, compatibilidade HLA com o doador, sensibilização prévia e imunossupressão insuficiente (58). Os não imunológicos podem estar relacionados à toxicidade por drogas, hipertensão e doenças recorrentes (59, 60).

Existem evidências que este tipo de rejeição ocorre a partir de danos vasculares nas células endoteliais. Estas células ativadas aumentam a expressão de moléculas MHC e de moléculas de adesão além de produzirem diversos mediadores inflamatórios, promovendo um fenômeno de inflamação local com recrutamento de linfócitos e monócitos que se acumulam no espaço subendotelial (61). Ocorre proliferação de células musculares lisas, que migram para o mesmo espaço subendotelial, produzindo fatores de crescimento que, por sua vez, estimulam a produção de fibras colágenas e deposição de matriz extracelular, resultando em espessamento concêntrico da íntima com subsequente obliteração vascular parcial ou total (62, 63).

A presença de anticorpos anti doador é freqüente na rejeição crônica, estima-se que mais de 60% das disfunções crônicas em órgãos transplantados possam ser causadas por estes anticorpos. Piazza *et al*, avaliaram 120 receptores 2 anos pós transplante, e monitoraram a presença desses anticorpos, a circulação de DSA foi fortemente associada a rejeição crônica (64).

A marcação do C4d em capilares peritubulares é frequentemente descrita como um marcador da rejeição aguda mediada por anticorpos (65). A presença desse marcador em rejeição crônica é controversa. Regele *et al*, em um estudo com 213 biopsias, todas com mais de 1 ano, encontraram associação de deposição C4d com glomerulopatia crônica, mas não houve associação com outras morfologias referentes a nefropatia crônica do enxerto (66). Em decorrência da marcação do C4d estar presente em outras condições da disfunção crônica do enxerto, sugere-se que essa marcação em um contexto de fibrose tubulo-intersticial crônica implicaria em um episódio de rejeição aguda/ativa ao invés de um marcador da rejeição crônica (67, 68). Entretanto, um estudo de Mauiyedi *et al*, demonstrou associação entre presença de C4d e morfologia histopatológica evidente de rejeição crônica sendo 61% das biopsias C4d+ (69).

### 1.3 Biologia molecular na disfunção do enxerto renal

O emprego de técnicas de biologia molecular no diagnóstico de doenças vem se aperfeiçoando e direcionando a novos métodos, mais precisos e acurados, para detecção precoce de determinadas patologias. A expressão gênica de moléculas envolvidas no processo de rejeição aos aloenxertos pode

nos levar a descoberta de novos biomarcadores, possibilitando o diagnóstico preciso e rápido dos episódios de rejeição. Além disso, é bastante atrativa a possibilidade de desenvolver métodos diagnósticos não-invasivos que tenham capacidade de evidenciar e diferenciar os fenômenos que acometem o enxerto. Diversas tentativas neste sentido vêm sendo testadas, com determinações qualitativas e principalmente quantitativas, utilizando técnicas como a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (“*Real-Time Polymerase Chain Reaction*”) e microarranjos de DNA (“*DNA Microarrays*”). Nos processos de rejeição aguda, alguns genes já foram estudados e parecem estar envolvidos (70). O mRNA do gene FOXP-3, gene importante na regulação da atividade linfocitária, foi medido na urina em conjunto com mRNA para CD25, CD3epsilon. Neste estudo, o aumento da expressão do FOXP-3 foi associado à RA e estiveram inversamente correlacionados com os níveis de creatinina plasmática no momento da biópsia do enxerto (71). Outros estudos têm descrito aumento da expressão de FOXP-3 em rejeição aguda e diminuição em rejeição crônica, e a expressão em tecido apresentou melhores resultados que em sangue periférico (72).

Estudos recentes mostram expressão aumentada de TIM-3, molécula expressa em células Th1 diferenciadas, em rejeição aguda e sugerem a bons resultados com a sua quantificação em amostras de sangue e urina. Além disso, a correlação com os níveis de creatinina sérica, o principal marcador de disfunção renal até o momento, reforça a associação da expressão desta molécula com disfunção do enxerto (73).

Perforina, Granzima e Fas-Ligante são moléculas associadas à atividade citolítica, com resposta final da cascata de eventos imunológicos



desencadeada pelo reconhecimento de aloantígenos. A avaliação do mRNA destes genes foi feita por grupos diferentes. Estudo francês demonstrou aumento da expressão em 162 amostras de urina de 37 pacientes transplantados. Embora tenha havido elevação da expressão nas rejeições, situações clínicas como infecção urinária, doença citomegálica e disfunção inicial de enxerto também elevaram a expressão (74). A elevação da expressão destes genes também foi observada em linfócitos periféricos através PCR competitivo de modo prospectivo, com coletas de sangue nos dias 2, 4, 6, 8, 10 e 12 pós-transplante. Os pacientes com disfunção de enxerto por rejeição tiveram níveis mais elevados em relação aos controles (75). Outro estudo francês, em material de biópsia renal, demonstrou que a expressão de granzima B estava associada à rejeição aguda e alteração limítrofe na histopatologia. A elevação de Fas-ligante simultânea foi preditiva de mau prognóstico na rejeição (76). O nosso grupo demonstrou que transcritos dos genes que codificam para o ataque citolítico são detectáveis em tecido renal de pacientes com rejeição subclínica (77). A expressão gênica de quimoquina ligante e receptor em monócitos periféricos (CCL3, CCL4, CXCL10 e CCR1, CCR5 e CXCR3) foi estudada diariamente (pré-operatório e 14 dias pós-transplante) em 106 transplantados consecutivamente. A expressão de mRNA CCR1 e CXCL10 foi aumentada nos pacientes que desenvolveram rejeição aguda e sua elevação precedeu a manifestação clínica de rejeição (78).

A dosagem de CD30 solúvel (sCD30) em sangue periférico é outro candidato a biomarcador de rejeição aguda. O CD30 é um marcador imunológico de ativação de células T, principalmente Th2 e participa do processo de produção de citocinas. A possibilidade de utilização de testes mais

acessíveis, como técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e citometria de fluxo, e sua dosagem sérica são fatores relevantes. A elevação de sCD30, pré ou pós transplante, pode indicar risco de desenvolver RA, além de ser um sinal de pior prognóstico para a sobrevida do enxerto. Autores sugerem que a elevação de sCD30 na 1 ou 2ª pode ser avaliado como um risco para rejeição do enxerto, especialmente em pacientes com mais de 3 mismatches (79). Os níveis de sCD30 também parecem bastante elevados no momento da rejeição, sugerindo que a dosagem sérica deste marcador seja um método eficiente para a identificação precoce de RA (80).

Nosso grupo tem estudado a possibilidade de controle da imunossupressão baseado na expressão de marcadores como TIM-3 e Perforina. A avaliação do aumento ou diminuição do mRNA de moléculas envolvidas no processo de rejeição, através de coletas seriadas de urina e sangue, podem ser utilizadas para o monitoramento da eficácia do tratamento no pós transplante. Outra molécula estudada por nosso grupo, KIM-1 (Kidney Injury Molecule-1), mostrou bons resultados e correlação de sua expressão em urina e tecido renal de pacientes. Houve aumento de seu mRNA em pacientes com dano tubular relacionado à nefrotoxicidade e fibrose intersticial (81).

### 1.3.1 Marcadores da Rejeição Humoral

A pesquisa da expressão de genes candidatos, em amostras de tecido renal e não invasivas (sangue e urina), com a utilização de técnicas envolvendo biologia molecular, pode ajudar nas etapas de compreensão dos eventos genéticos regulatórios e contra regulatórios que ocorrem no enxerto, além de ser potencialmente importante no diagnóstico precoce dos tipos de rejeição.

Nosso grupo recentemente demonstrou a possibilidade de diagnosticar rejeição aguda celular com disfunção inicial de enxerto, através da expressão de FOXP-3 em linfócitos periféricos e urina (82). A identificação da expressão gênica associada a rejeições mediadas por anticorpos seria importante do ponto de vista de diagnóstico e de compreensão fisiopatológica. No entanto, a literatura a este respeito é escassa. Em estudo recente, através da técnica de microarranjos, foi quantificada em expressão gênica em biópsias de enxerto feitas por indicação clínica. A expressão de transcritos de células B e imunoglobulinas foi aumentada nas rejeições, mas não houve diferença significativa entre rejeições humorais e celulares (83). Outro estudo utilizou amostra de células urinárias para avaliar expressão gênica, por Real Time - PCR, de mRNA CD20 e correlacionou com infiltrado de células CD20 positivas no tecido renal. Os níveis de CD20 na urina tiveram alta sensibilidade com CD20 na biópsia, porém a especificidade foi baixa. O aumento de células CD20 positivas foi relacionado com altos níveis de creatinina, mas não houve diferenças de expressão quanto à diferenciação dos episódios de disfunção do enxerto (84). Aliás, a presença de mRNA CD20 também tem sido avaliada como um biomarcador de tolerância aos transplantes, a monitorização dos níveis de expressão desta molécula, em sangue e urina, podem ser utilizados para avaliar a eficácia do tratamento imunossupressor (85).

Hidalgo e colaboradores relataram o estudo por microarranjos de grupo de transcritos endoteliais (“endothelial cell-associated transcripts”- ENDATs). A expressão foi diferente nas rejeições humorais e celulares ( $p < 0,05$ ). Outros grupamentos de transcritos como transcritos de célula T, de macrófagos e de INF $\gamma$  (interferon gama), não foram diferentes entre os grupos. ENDATs incluem

marcadores estabelecidos de lesão endotelial, como fator de von Willebrand (VWF), molécula de adesão plaquetária endotelial-1 (PECAM-1), molécula de adesão intercelular 2 (ICAM2), e endotelina 1 (86).

O BAFF, fator de ativação de células B relacionado ao fator de necrose tumoral (TNF), tem um papel importante no desenvolvimento das células B. Através da técnica de imunohistoquímica, Xu e colaboradores, realizaram um estudo com o objetivo de verificar a associação da presença de BAFF e C4d em biópsias renais de pacientes com rejeição aguda e crônica. Como resultado, os autores identificaram correlação entre os dois marcadores, além de associar BAFF ao desenvolvimento de anticorpos na rejeição humoral (87). Em outro estudo, foi avaliado os níveis séricos e a expressão de mRNA deste marcador em relação ao tratamento com alemtuzumab, um deletor de células T e B que pode ser utilizado na rejeição humoral. Houve associação entre as expressões de BAFF e rejeição mediada por anticorpos em pacientes tratados com este medicamento (88).

Como já citado anteriormente, a deposição de complemento C4d no tecido renal é técnica padrão ouro para o diagnóstico de RAMA. É atrativa a possibilidade de detecção do C4d circulante no soro de pacientes transplantados. Bartel e colaboradores mostraram uma boa correlação para a presença de C4d no sangue periférico de pacientes com C4d positivo no tecido renal. Os autores avaliaram 105 biópsias, 17 positivas com deposição de C4d, e utilizaram a técnica C4dFlowPRA para avaliar a presença de complemento C4d circulante no soro de pacientes transplantados renais, a especificidade foi de 92% (89).

Com o uso de uma técnica baseada na espectrofotometria de massas aliada à bioinformática, Yang et al, avaliaram a expressão de peptídeos na urina de transplantados renais identificando marcadores (como o complemento C4d) que podem diferenciar as disfunções que acometem o enxerto. Algumas proteínas, de acordo com os diferentes pesos moleculares, podem estar presentes em determinado tipo de rejeição (87). Em outro estudo, também com espectrofotometria de massas, foi desenvolvido um painel de biomarcadores peptídicos para amostras de urina. A conclusão principal foi a possibilidade de diferenciar rejeição crônica de aguda. O aumento da expressão de proteínas relacionadas à produção do colágeno foram observados na rejeição crônica, devido à fibrose intersticial (90).

Estudo de um grupo francês indica uma molécula, expressa em APCs como potencial marcador da rejeição crônica mediada por anticorpos. O gene Tribbles-1 (TRIB-1) tem seus transcritos aumentados significativamente em sangue periférico e tecido de transplantados renais com deposição de C4d ou presença de DSA (91).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Cortesini R. Transplantation in the new millenium. *Transplant Proc* 2001; 33: 47-48.
2. Registro Brasileiro de Transplantes ABTO. Jan/Dez 2010; Ano XVI - n<sup>o</sup>4.
3. Martin L, Guignier F, Mousson C, Rageot D, *et al.* Detection of donor-specific anti-HLA antibodies with flow cytometry in eluates and sera from renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2003; 76: 395-400.
4. Goodman WG. 4th ed.,. *Options for Patients with Kidney Failure*, 4 ed. edn. Lippincott Williams & Wilkins: Filadélfia, Estados Unidos, 2005.
5. Fifteen years of HL-A: what is the importance of HL-A compatibility for clinical outcome of renal transplantations? *Vox Sang* 1978; 34: 171-188.
6. Halloran PF. The clinical importance of alloantibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2003; 3: 639-640.
7. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969; 280: 735-739.
8. van RJ, van L, Eernisse JG. Leucocyte antibodies in sera of pregnant women. *Vox Sang* 1959; 4: 427-444.
9. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, *et al.* Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 2002; 346: 580-590.
10. Knight SR, Russell NK, Barcena L, Morris PJ. Mycophenolate mofetil decreases acute rejection and may improve graft survival in renal transplant recipients when compared with azathioprine: a systematic review. *Transplantation* 2009; 87: 785-794.
11. Opelz G, Dohler B. Influence of time of rejection on long-term graft survival in renal transplantation. *Transplantation* 2008; 85: 661-666.
12. Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 807-817.

13. Demirci C, Sen S, Sezak M, Sarsik B, *et al.* Incidence and importance of c4d deposition in renal allograft dysfunction. *Transplant Proc* 2008; 40: 174-177.
14. Koo DD, Roberts IS, Quiroga I, Procter J, *et al.* C4d deposition in early renal allograft protocol biopsies. *Transplantation* 2004; 78: 398-403.
15. Kaneku HK, Terasaki PI. Thirty year trend in kidney transplants: UCLA and UNOS Renal Transplant Registry. *Clin Transpl* 2006: 1-27.
16. ABBAS AKL, A. H; PILLAI, S. . *Imunologia celular e molecular*, 6<sup>a</sup> ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2008.
17. Opelz G, Dohler B. Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades. *Transplantation* 2007; 84: 137-143.
18. Gjertson DW. Impact of delayed graft function and acute rejection on kidney graft survival. *Clin Transpl* 2000: 467-480.
19. Coca SG, Yalavarthy R, Concato J, Parikh CR. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: a systematic review. *Kidney Int* 2008; 73: 1008-1016.
20. Beckingham IJ, Nicholson ML, Bell PR. Analysis of factors associated with complications following renal transplant needle core biopsy. *Br J Urol* 1994; 73: 13-15.
21. Veronese FV, Noronha IL, Manfro RC, Edelweiss MI, *et al.* Protocol biopsies in renal transplant patients: three-years' follow-up. *Transplant Proc* 2002; 34: 500-501.
22. Snanoudj R, Martinez F, Sberro Soussan R, Thervet E, *et al.* [Screening biopsies in kidney transplantation: from subclinical acute rejection to chronic allograft lesions]. *Nephrol Ther* 2008; 4 Suppl 3: S192-199.
23. Almond PS, Matas A, Gillingham K, Dunn DL, *et al.* Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 1993; 55: 752-756.
24. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004; 4: 378-383.

25. D. H. *Kidney Transplantation – Principles and Practice*, 5th ed edn. WB Saunders Company: Philadelphia, USA, 2001.
26. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, *et al.* Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008; 8: 753-760.
27. Colvin RB, Cohen AH, Saiontz C, Bonsib S, *et al.* Evaluation of pathologic criteria for acute renal allograft rejection: reproducibility, sensitivity, and clinical correlation. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1930-1941.
28. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI. Pathways of major histocompatibility complex allorecognition. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13: 438-444.
29. Zhang Q, Reed EF. Non-MHC antigenic targets of the humoral immune response in transplantation. *Curr Opin Immunol* 2010; 22: 682-688.
30. Dias ECA, Camara, N. O. S., Pacheco E Silva Filho, A. e Manfro, R. C. . Monitorização Molecular da Rejeição de Transplantes Renais. *J Bras Nefrol* 2005; 27: 76 - 83.
31. Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 365-376.
32. Tafllin C, Nochy D, Hill G, Frouget T, *et al.* Regulatory T cells in kidney allograft infiltrates correlate with initial inflammation and graft function. *Transplantation* 2010; 89: 194-199.
33. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1046-1056.
34. Mauiyyedi S, Colvin RB. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; 11: 609-618.
35. Chang AT, Platt JL. The role of antibodies in transplantation. *Transplant Rev (Orlando)* 2009; 23: 191-198.
36. Zou Y, Mirbaha F, Lazaro A, Zhang Y, *et al.* MICA is a target for complement-dependent cytotoxicity with mouse monoclonal antibodies and human alloantibodies. *Hum Immunol* 2002; 63: 30-39.



37. Saadi S, Takahashi T, Holzknrecht RA, Platt JL. Pathways to acute humoral rejection. *Am J Pathol* 2004; 164: 1073-1080.
38. Fahim T, Bohmig GA, Exner M, Huttary N, *et al.* The cellular lesion of humoral rejection: predominant recruitment of monocytes to peritubular and glomerular capillaries. *Am J Transplant* 2007; 7: 385-393.
39. Higgins R, Hathaway M, Lowe D, Lam F, *et al.* Blood levels of donor-specific human leukocyte antigen antibodies after renal transplantation: resolution of rejection in the presence of circulating donor-specific antibody. *Transplantation* 2007; 84: 876-884.
40. Rowshani AT, Bemelman FJ, Lardy NM, Ten Berge IJ. Humoral immunity in renal transplantation: clinical significance and therapeutic approach. *Clin Transplant* 2008; 22: 689-699.
41. Rocha PN, Butterly DW, Greenberg A, Reddan DN, *et al.* Beneficial effect of plasmapheresis and intravenous immunoglobulin on renal allograft survival of patients with acute humoral rejection. *Transplantation* 2003; 75: 1490-1495.
42. Everly MJ, Terasaki PI. Monitoring and treating posttransplant human leukocyte antigen antibodies. *Hum Immunol* 2009; 70: 655-659.
43. Flechner SM, Fatica R, Askar M, Stephany BR, *et al.* The role of proteasome inhibition with bortezomib in the treatment of antibody-mediated rejection after kidney-only or kidney-combined organ transplantation. *Transplantation* 2010; 90: 1486-1492.
44. Zwirner J, Felber E, Burger R, Bitter-Suermann D, *et al.* Classical pathway of complement activation in mammalian kidneys. *Immunology* 1993; 80: 162-167.
45. Heeger PS. A complementary approach to treating antibody-mediated transplant rejection. *Kidney Int* 2010; 78: 125-127.
46. Moll S, Pascual M. Humoral rejection of organ allografts. *Am J Transplant* 2005; 5: 2611-2618.
47. Bohmig GA, Exner M, Habicht A, Schillinger M, *et al.* Capillary C4d deposition in kidney allografts: a specific marker of alloantibody-dependent graft injury. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1091-1099.

48. Mauiyyedi S, Crespo M, Collins AB, Schneeberger EE, *et al.* Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 779-787.
49. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, *et al.* Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int* 1993; 43: 1333-1338.
50. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, *et al.* Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003; 3: 708-714.
51. Stegall MD, Gloor JM. Deciphering antibody-mediated rejection: new insights into mechanisms and treatment. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15: 8-10.
52. Mizutani K. HLA mismatches and PRA in kidney retransplants. *Clin Transpl* 2007: 19-27.
53. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3: 665-673.
54. Halloran PF, Schlaut J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I response. II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I-like antibody. *Transplantation* 1992; 53: 550-555.
55. Trpkov K, Campbell P, Pazderka F, Cockfield S, *et al.* Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody, Analysis using the Banff grading schema. *Transplantation* 1996; 61: 1586-1592.
56. Colvin RB. Dimensions of antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2010; 10: 1509-1510.
57. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, *et al.* The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55: 713-723.
58. Cosio FG, Pelletier RP, Falkenhain ME, Henry ML, *et al.* Impact of acute rejection and early allograft function on renal allograft survival. *Transplantation* 1997; 63: 1611-1615.

59. Paul LC, de Fijter J, Boom H. Prolonged cold ischemia, late graft dysfunction, and cyclosporine in renal transplantation. *Transplantation* 1999; 68: 925-926.
60. Kreis HA, Ponticelli C. Causes of late renal allograft loss: chronic allograft dysfunction, death, and other factors. *Transplantation* 2001; 71: S5-9.
61. Oliveira SG, Oliveira IB, Abensur H, Araujo MR, *et al.* Differential expression of cytokines, growth factors, and alpha-smooth muscle actin in renal allograft biopsies. *Transplant Proc* 2002; 34: 479-481.
62. Lemstrom K, Koskinen P, Hayry P. Molecular mechanisms of chronic renal allograft rejection. *Kidney Int Suppl* 1995; 52: S2-10.
63. Sund S, Reisaeter AV, Fauchald P, Bentdal O, *et al.* Living donor kidney transplants: a biopsy study 1 year after transplantation, compared with baseline changes and correlation to kidney function at 1 and 3 years. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 2445-2454.
64. Piazza A, Poggi E, Borrelli L, Servetti S, *et al.* Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: posttransplant analysis using flow cytometric techniques. *Transplantation* 2001; 71: 1106-1112.
65. Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, *et al.* Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2208-2214.
66. Regele H, Bohmig GA, Habicht A, Gollowitzer D, *et al.* Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2371-2380.
67. Nicleleit V, Zeiler M, Gudat F, Thiel G, *et al.* Detection of the complement degradation product C4d in renal allografts: diagnostic and therapeutic implications. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 242-251.
68. Nicleleit V, Mihatsch MJ. Kidney transplants, antibodies and rejection: is C4d a magic marker? *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 2232-2239.

69. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S, Collins AB, *et al.* Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 574-582.
70. Hartono C, Muthukumar T, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of acute rejection of renal allografts. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15: 35-41.
71. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, *et al.* Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 2005; 353: 2342-2351.
72. Heidt S, San Segundo D, Shankar S, Mittal S, *et al.* Peripheral blood sampling for the detection of allograft rejection: biomarker identification and validation. *Transplantation* 2011; 92: 1-9.
73. Renesto PG, Ponciano VC, Cenedeze MA, Saraiva Camara NO, *et al.* High expression of Tim-3 mRNA in urinary cells from kidney transplant recipients with acute rejection. *Am J Transplant* 2007; 7: 1661-1665.
74. Yannaraki M, Rebibou JM, Ducloux D, Saas P, *et al.* Urinary cytotoxic molecular markers for a noninvasive diagnosis in acute renal transplant rejection. *Transpl Int* 2006; 19: 759-768.
75. Shin GT, Kim SJ, Lee TS, Oh CK, *et al.* Gene expression of perforin by peripheral blood lymphocytes as a marker of acute rejection. *Nephron Clin Pract* 2005; 100: c63-70.
76. Desvaux D, Schwarzingler M, Pastural M, Baron C, *et al.* Molecular diagnosis of renal-allograft rejection: correlation with histopathologic evaluation and antirejection-therapy resistance. *Transplantation* 2004; 78: 647-653.
77. Aquino Dias EC, Veronese FJ, Santos Goncalves LF, Manfro RC. Molecular markers in subclinical acute rejection of renal transplants. *Clin Transplant* 2004; 18: 281-287.
78. Dalton RS, Webber JN, Peard P, Gibbs PJ, *et al.* Immunomonitoring of renal transplant recipients in the early posttransplant period by sequential analysis of chemokine and chemokine receptor gene expression in peripheral blood mononuclear cells. *Transplant Proc* 2005; 37: 747-751.

79. Slavcev A, Lacha J, Honsova E, Sajdlova H, *et al.* Soluble CD30 and HLA antibodies as potential risk factors for kidney transplant rejection. *Transpl Immunol* 2005; 14: 117-121.
80. Domingues EM, Matuck T, Graciano ML, Souza E, *et al.* Panel reactive HLA antibodies, soluble CD30 levels, and acute rejection six months following renal transplant. *Clin Transplant* 2009; 24: 821-829.
81. Nogare AL, Joelsons G, Pedroso JA, Veronese FJ, *et al.* Quantitative analyses of kidney injury molecule-1 messenger RNA in kidney transplant recipients with graft dysfunction. *Transplant Proc* 2010; 42: 473-474.
82. Aquino-Dias EC, Joelsons G, da Silva DM, Berdichevski RH, *et al.* Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney Int* 2008; 73: 877-884.
83. Einecke G, Reeve J, Mengel M, Sis B, *et al.* Expression of B cell and immunoglobulin transcripts is a feature of inflammation in late allografts. *Am J Transplant* 2008; 8: 1434-1443.
84. Ponciano VC, Soares MF, Naka EL, Arruda EF, *et al.* Urinary CD20 mRNA as a surrogate of CD20-positive cells infiltration during allograft dysfunction in renal transplant patients. *Int Immunopharmacol* 2009; 9: 663-667.
85. Newell KA, Asare A, Kirk AD, Gisler TD, *et al.* Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; 120: 1836-1847.
86. Hidalgo LG, Einecke G, Allanach K, Mengel M, *et al.* The transcriptome of human cytotoxic T cells: measuring the burden of CTL-associated transcripts in human kidney transplants. *Am J Transplant* 2008; 8: 637-646.
87. Xu H, He X, Sun J, Shi D, *et al.* The expression of B-cell activating factor belonging to tumor necrosis factor superfamily (BAFF) significantly correlated with C4D in kidney allograft rejection. *Transplant Proc* 2009; 41: 112-116.
88. Bloom D, Chang Z, Pauly K, Kwun J, *et al.* BAFF is increased in renal transplant patients following treatment with alemtuzumab. *Am J Transplant* 2009; 9: 1835-1845.

89. Bartel G, Wahrmann M, Exner M, Regele H, *et al.* In vitro detection of C4d-fixing HLA alloantibodies: associations with capillary C4d deposition in kidney allografts. *Am J Transplant* 2008; 8: 41-49.
90. Ling XB, Sigdel TK, Lau K, Ying L, *et al.* Integrative urinary peptidomics in renal transplantation identifies biomarkers for acute rejection. *J Am Soc Nephrol* 2009; 21: 646-653.
91. Ashton-Chess J, Giral M, Mengel M, Renaudin K, *et al.* Tribbles-1 as a novel biomarker of chronic antibody-mediated rejection. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1116-1127.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo Geral*

- Aplicar técnica de Real Time PCR – *Polimerase Chain Reaction*, para quantificação da expressão gênica de marcadores da rejeição celular e mediada por anticorpos e humoral em tecido renal e sangue periférico de transplantados renais.

### 2.2 *Objetivos Específicos:*

- Verificar correlação entre os níveis de expressão gênica dos marcadores no tecido renal com aqueles encontrados no sangue.
- Estabelecer pontos de corte diagnósticos de rejeição humoral com a quantificação da expressão gênica em tecido renal e sangue.
- Verificar a associação entre o diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos através da quantificação da expressão gênica em biópsia renal e sangue com o diagnóstico padrão-ouro de rejeição humoral (achados histopatológicos, identificação de C4d na imunohistoquímica da biópsia renal e presença de anticorpos anti-HLA do doador).

### **3 JUSTIFICATIVA**

A rejeição mediada por anticorpos é caracterizada por um diagnóstico complexo e impreciso. A pesquisa e o desenvolvimento de novos métodos para sua identificação poderá auxiliar no tratamento precoce evitando complicações que podem levar a perda do órgão. A quantificação da expressão de genes por PCR Real-Time parece ser um meio eficiente para avaliar os elementos envolvidos em disfunções do enxerto renal como RAMA.

A utilização de amostras não invasivas, como sangue periférico e urina, e a busca por biomarcadores específicos podem colaborar facilitando o diagnóstico das rejeições, principalmente nas formas subclínicas. Atualmente a biópsia renal é o método padrão-ouro para avaliar os danos no enxerto, uma técnica altamente invasiva e nem sempre representativa. A possibilidade de identificar os mecanismos envolvidos nas disfunções do enxerto por meio de amostras facilmente coletadas, quando comparadas a biópsia renal, terá um importante papel no sentido de monitorar a tolerância imunológica e o risco de rejeição.



#### 4 ARTIGO ORIGINAL

### “Molecular biomarkers of acute antibody mediated rejection in renal transplant patients”

Tiago Dalpiaz<sup>1</sup>

Aline de Lima Nogare<sup>1</sup>

Virna Carpio<sup>1</sup>

Luiz Felipe Santos Gonçalves<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Post-Graduated Medical Sciences Program. School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. Brazil. <sup>2</sup> Division of Nefrology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, RS. Brazil. <sup>3</sup> Corresponding author.

**Correspondence:** Luiz Felipe Santos Gonçalves M.D, Division of Nefrology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos Street, 2350, Room 2030, CEP 90035-903, Porto Alegre, Brazil. Telephone/Fax: +55 51 3359-8295. Email: lfgoncalves@hcpa.ufrgs.br.

Supported by FIPE-HCPA and CAPES.

**Keywords:** biomarkers, mRNA, antibody mediated rejection, kidney transplantation.

Word counts abstract - 250

Word counts text – 2.943

Tables: 2 Total figures: 2

## ABSTRACT

**Background:** Several molecular markers for acute rejection has been described, but the need for biomarkers that differentiate rejection forms and the mechanisms involved is crucial to find a more accurate diagnosis. The purpose of this study is to evaluate the expression of genes related to acute antibody mediated rejection (ABMR) in renal tissue and peripheral blood, in renal allograft recipients.

**Methods:** The recipients were divided in categories according to the Banff 07 classification: ABMR, acute cellular rejection (ACR), ABMR+ACR, acute tubular necrosis (ATN) and normal. We analyzed, by Real-Time PCR, the quantitative expression of genes: CD20, CD138, von Willebrand factor (vWF), FOXP-3 and TIM-3.

**Results:** Patients with ABMR presented in renal tissue and on peripheral blood mRNA transcripts for CD20 and TIM-3 significantly increased ( $P<0.01$ ), in comparison to the groups ATN and normal. Other results with significantly higher expression in ABMR comparing to the normal group were FOXP-3 in the blood ( $P<0.01$ ), CD138 on tissue ( $P<0.01$ ) and vWF on tissue and blood ( $P<0.05$ ). ROC curves showed areas under the curve (AUC) of 0.950 ( $P<0.001$ ) for CD20 in peripheral blood. Sensitivity of 94% and 88% specificity was obtained. CD138 in kidney tissue ROC curve showed an AUC of 0.905 ( $P<0.001$ ), and the sensitivity and specificity were respectively 91% and 85% for the diagnosis of ABMR.

**Conclusion:** These results plus the good accuracy demonstrated in the evaluation by ROC curves suggest that CD20, in peripheral blood, and CD138, on tissue, are potential molecular biomarkers for the diagnosis of ABMR.

**Keywords:** biomarkers, mRNA, antibody mediated rejection, kidney transplantation.

## Introduction

Antibody mediated rejection (ABMR) has been increasingly recognized in recent years as a limitation to successful kidney transplantation. The overall incidence of ABMR is estimated to be 2-10% in kidney transplant recipients [1]. The detection of donor specific antibodies (DSA) formed either before or after transplantation, is a well known risk-factor for ABMR and has been associated to lower rates of graft survival [2-4]. Nowadays, with the development of more accurate tests that allow the detection of complement split products in the renal allograft (C4d) and the presence of circulating DSA have improved the ability to diagnose and treat ABMR. The deposition of C4d in peritubular capillaries (PTCs) combined with the presence of DSA and histopathological findings are the accepted methods for the diagnosis of ABMR [5-7], although the need of a invasive procedure as the kidney biopsy.

So, many studies are seeking to identify molecular signatures using the expression of certain genes to differentiate between types of rejection and the components involved. The use of techniques such as RT-PCR and microarrays, evaluating mRNA expression of genes involved in allograft rejection, are the main focus in enabling non-invasive biomarkers to aid in early diagnosis, identifying the mechanisms and directing to the most appropriate treatment [8, 9]. These alternative evaluations comprise the use of new assays and samples that may avoid biopsy and even contribute to the identification of subclinical rejection [10].

Some molecules of cytolytic attack such as granzyme B, perforin and fas-ligand has been evaluated as possible biomarkers of acute cellular rejection

[11, 12]. The high expression of their mRNA and the good correlation obtained among renal tissue, blood and urine makes these molecules as good candidates to help in the diagnosis of acute rejection. Other molecules also appearing as potential markers for acute rejection are TIM-3 and FOXP-3. TIM-3 is specifically expressed on Th1 differentiated T cells and has been associated with autoimmune diseases, tolerance induction and to the regulation of Th1 immune responses. Recent studies showed high expression of TIM-3 in acute rejection and suggest that these methods can be used in noninvasive samples. Moreover, the correlation with serum creatinine levels, the main marker of renal dysfunction to date, reinforces the association of expression of this molecule with graft dysfunction [13, 14]. Genes related to regulatory T cells, as FOXP-3, have been associated with immune tolerance and long-term graft survival in transplantation. An increased mRNA expression in acute rejection was observed that appears to decrease in chronic rejection, but the correlation between the expression in peripheral blood and renal tissue have been controversial [15].

However, molecular markers that differentiate the forms of acute rejection and are specific to the ABMR diagnosis are not clearly established. The expression of some genes may be related to the ABMR development and worth investigation. The presence of B cells and the increased CD20 expression have been reported in acute rejection [16, 17]. Also, a correlation of expression of CD20 mRNA in urinary cells, with the presence of B cells in biopsies was described [18]. CD138 expressed on the cell surface of plasma cells, may be another potential biomarker of ABMR. Its involvement in the production of antibodies suggests that there may be increased expression in

this situation [19]. The von Willebrand factor (vWF), a marker of vascular involvement in the process of thrombotic microangiopathy, may be related to humoral graft rejection [20]. Recent study with microarrays has suggested that vWF could be related to ABMR [21].

In this study, we evaluated the expression of genes CD20, CD138, vWF, FOXP-3 and TIM-3 in samples of renal tissue and peripheral blood of patients with graft dysfunction. In addition, we seek parameters for the diagnosis of ABMR and the possible different components involved in these processes. We also evaluated the correlation between the expression of these markers in renal tissue and blood, in order to develop non-invasive methods.

## **Results**

### *Clinical data*

The demographic characteristics and clinical information of the 56 Patients are listed in Table 1. The presence of DSA in the recipients of each group was 42.1% (ABMR), 18.2% (ACR), 16.7% (ACR+ABMR), 25.0% (ATN) and no normal patient had DSA. C4d positivity was more frequent in patients with ABMR ( $p < 0,001$ ). The overall rate of first transplantation was 81,4%, without difference between groups. The average age of donors was  $44 \pm 15$  and most patients with ABMR performed transplants with deceased donor (80.0%,  $p < 0.05$ ). The underlying diseases as causes of the development of chronic renal failure were hypertension (21.4%), diabetes (17.2%), chronic glomerulonephritis (10.7%), polycystic kidney disease (10.7%), undetermined (17.9%) and other causes (22.1%). Ninety-six percent of the patients were maintained on a calcineurin inhibitor-based regimen. Plasmapheresis was administered for 95% of patients with ABMR. Forty-one patients received induction, being treated with

ATG (58.5%), basiliximab (36.7%) and OKT3 (4.8%). There was a statistically significant increase in the incidence of delayed graft function in ABMR patients when compared to ACR and normal groups (85% x 33% x 22%  $p < 0.01$ ).

### *Expression of genes*

CD20 mRNA on renal tissue was highly expressed in patients with ABMR when compared with the groups ATN and normal. The median CD20 mRNA expression in the ABMR group was 12.72, while in the ATN was 0.27, and normal 1.6 ( $p < 0.01$ ). The median in ACR group was 4.23 and in the ACR+ABMR was 0.50. Expression of CD20 in the peripheral blood was significantly higher in ABMR when compared to ACR, ACR+ABMR, ATN and normal (18.8 x 8.4 x 2.34 x 0.79 x 1.6, respectively,  $p < 0.05$ ). Also, there was a significant correlation between expression on PBMC and tissue samples ( $r = 0.40$ ,  $p < 0.05$ ). TIM-3 mRNA transcripts in renal tissue were also higher in ABMR (17.57) than in ATN (0.87) and normal (0.84),  $p < 0.05$ . The same increased expression in ABMR cases was found in peripheral blood (15.88) when compared to ATN (0.89) and normal group (1.01),  $p < 0.001$ . A weaker correlation was found between peripheral blood and kidney tissue for expression of TIM-3 transcripts ( $r = 0.39$ ,  $p = 0.05$ ).

In the analysis of von Willebrand Factor (vWF) mRNA transcripts on tissue we found a higher expression in ABMR group (25.03) as compared to the ACR (16.29), ACR+ABMR (4.56), ATN (7.52) and normal (1.45) with  $p < 0.05$ . Also, there was a significant difference in PBMC samples expressions: ABMR (22.76), ACR (5.27), ACR+ABMR (9.65), ATN (4.97) normal (1.87),  $p < 0.01$ . Other results with significantly higher expression in ABMR in comparison to

ATN and normal groups were FOXP-3 in PBMC (median = 7.40, 0.62, 0.5, respectively,  $p < 0.01$ ) and CD138 on biopsy sample: ABMR median = 23.75, ACR = 7.46, ACR+ABMR = 3.34, ATN = 5.25, normal 1.51,  $p < 0.01$ . CD138 in peripheral blood did not show good results because in more than 60% of the samples there was no expression of mRNA. Gene quantifications are shown in the box-plots graphics with logarithmic transformations of the data (Figure 1).

The area under curve (AUC) of ROC curves for CD20 in the peripheral blood was 0.950. Using a cutoff of 6.0 a 94% sensitivity and 88% specificity was achieved. For CD138 in the tissue the AUC was 0.905, and employing the same 6.0 cutoff point a 91% sensitivity and 85% specificity was found. The cutoff points were determined only for the results of AUC over 0.900 ( $p < 0.001$ ). Results of the ROC curves are shown on table 2.

## **Discussion**

Acute rejection, mainly antibody mediated rejection, is a important risk factor for worse graft function and survival [22]. Currently, the most employed method for clinical evaluation of graft function is the measurement of serum creatinine, a nonspecific and late marker of renal dysfunction. So, research and development of new noninvasive biomarkers are being intensively studied to the early identification of rejection episodes and the possibility to aid in the rapid onset of its treatment [23-25]. In this study ABMR diagnosis was defined by suggestive histopathological changes plus C4d detection and the presence in some cases of DSA, as described in other studies [26, 27].

In the gene expression analysis of this study good results were obtained with CD20 mRNA transcripts in blood and renal tissue. The ROC curves generated and the good accuracy with the cutoff points used suggest that the

significant increase of CD20 mRNA could be utilized as a tool in ABMR diagnosis. Matl *et al.* had already described CD20 transcripts increase on peripheral blood in acute subclinical rejections, which reinforces its role as a potential biomarker [28]. Kirk *et al.* have tried another approach reporting the possible association of CD20 mRNA and tolerance to the graft [29, 30]. B cells are targets of current therapies against ABMR, however the previously described B cell involvement in the regulation of alloimmune response and tolerance is unclear [31]. Such as CD20+ lymphocytes can differentiate into CD138+ plasma cells, new ABMR treatments are directed to deplete plasma cells, the effectively antibodies forming cells [32]. In this sense, we evaluated the expression of molecular markers of these cells. We found that CD138 mRNA expression was significantly higher in ABMR, with good parameters of accuracy in its diagnosis. Tsai *et al.* evaluated CD138+ cells infiltrating the renal tissue and have noted that these cells may represent an additional antibody mediated process present in the setting of ACR and could play an important role in characterization and treatment of transplant rejection [33]. The not so good results obtained in this study with the expression of CD138 transcripts in peripheral blood when compared to renal tissue could be explained by the low presence of plasma cells circulating in peripheral blood, and its higher localization in sites with inflammation, such as renal interstitium.

Hidalgo and colleagues reported a microarray study with endothelial cell-associated transcripts (ENDATs). ENDATs include established markers of endothelial damage such as von Willebrand Factor (vWF), platelet endothelial adhesion molecule-1 (PECAM-1), intercellular adhesion molecule 2 (ICAM2) and endothelin 1 [34]. They found that their expression was higher in humoral



than in cellular rejection ( $p < 0.05$ ). Cesari *et al.* evaluated clotting factors in kidney transplant patients and they found higher vWF plasma levels than in normal patients [35]. Another possibility is that the increased vWF mRNA expression, as demonstrated in our study, could be related to thrombotic microangiopathy and vascular involvement in ABMR group [36]. Additionally, other authors suggest that the increased expression of vWF can be used as a marker of acute vascular rejection [37].

TIM-3 is a molecule that is expressed by Th1 differentiated effector cells, being an important element in central cell-mediated immunity [38]. Some studies have shown promising results on TIM-3 expression on urinary cells for the diagnosis of acute rejection, suggesting that this molecule could be a noninvasive marker in this clinical situation [14, 39]. Another study of Manfro *et al.* showed similar findings in the evaluation of TIM-3 in acute graft dysfunction. Also there was a good correlation between blood and urine expression [40]. In the present study the same correlation between the expression of this molecule in renal tissue and peripheral blood were identified. There was increased expression of TIM-3 in ABMR group, but without significant difference when compared to cellular rejection group.

Regarding FOXP-3 expression, a well known marker of T regulatory (Tregs) cells, there were no significant differences in its expression on biopsy samples among the studied groups. Veronese *et al.* in a study with immunohistochemistry, found low detection of FOXP3+ cells in ABMR [41]. Muthukumar *et al.* described higher FOXP-3 mRNA expression in urine of patients with acute cellular rejection cases [42]. In our study there was a higher in ABMR FOXP-3 mRNA expression in PBMC when compared to ATN and

normal patients. However, this molecule expression could not differentiate ABMR from cellular rejections groups. Iwase and colleagues proposed the monitoring of FOXP3 transcripts as a method to assess rejection risk and to modulate the immunosuppression [43]. Thus, most studies suggest that FOXP-3 mRNA expression on renal tissue is characteristic of time-dependent inflammatory infiltration. So, time-dependent entry of FOXP3-positive cells could represent a mechanism to stabilize inflammatory sites [44].

As limitations of this study, we can cite the difficulty in getting a fairly large sample set, due to the low incidence of ABMR. The total number of patients generating solid results is very important to support the findings and conclusions described. We also face problems in collecting the biopsy samples and peripheral blood, concomitantly, thus justifying some non-paired samples. Despite these limitations, we describe relevant data that can be object of further studies, regarding non-invasive biomarkers as new diagnostic methods.

In conclusion, our study suggests potential biomarkers that may help to differentiate between cellular and humoral rejection. Although we did not find significant differences between the two forms of acute rejection, though the expressions of all genes in ABMR were higher than in ACR, may be more robust studies may confirm these findings and determine differences between the rejections. The increased expression of CD20, both in kidney tissue as peripheral blood, and CD138 in the tissue may be used in the diagnosis of ABMR. These preliminary results plus the good accuracy demonstrated in the evaluation by ROC curves suggest that these genes are potential molecular biomarkers for the diagnosis of ABMR.

## **Materials and Methods**

### *Patients*

Fifty-six kidney transplant recipients who underwent biopsy for clinical indications were included in this cross-sectional study between January 2008 and January 2010, at Nephrology Division of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil. Patients were classified into five groups, according to the results of kidney biopsy using Banff 07 criteria: acute antibody mediated rejection (ABMR; n = 20), acute cellular rejection (ACR; n = 12), acute cellular rejection with humoral component (ABMR+ACR; n = 6), acute tubular necrosis (ATN; n = 9) and non rejection (normal; n = 9). Sufficient material for molecular analysis was obtained in 31 renal tissue samples and 50 blood samples. The kidney biopsies were performed through ultrasonography guidance, using a semi-automatic gun with a 16-G needle. One and a half fragments were used for histological analysis and a half fragment was immediately frozen in liquid nitrogen and maintained as -70°C for molecular analysis. Before each biopsy, peripheral blood samples were collected in tubes containing EDTA. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained through erythrocyte lysis with a hypotonic buffer and stored at -70°C for later RNA isolation.

The institutional Ethical Committee approved this study and each patient gave written informed consent.

### *Isolation of RNA and design of primers and probes*

Peripheral blood mononuclear cells RNA was obtained using the RNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Tissue renal fragments were defrosted, macerated and processed for the RNA isolation by using the same method as for PBMC.

Total RNA was quantified by Nano'Drop<sup>®</sup> 100 Spectrophotometer v.3.7 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) and RNA purity was observed as a ratio of absorbance at two different wave lengths (260/280). Only samples with optical density ratio higher than 1.7 were analyzed. Total RNA was 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 20  $\mu$ L and stored at -20°C. Amplification was performed with an ABI PRISM 7500 Sequence Detection System using the 5'- nuclease method and Taqman Universal Master Mix, composed by AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primers and fluorogenic probes for target genes and endogenous control mRNA were purchased from Taqman<sup>®</sup> Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA) and had already been tested and validated previously by the manufacturer. The assays IDs of the probes used in the study are: Hs00544818\_m1 (CD20), Hs00169795\_m1 (von Willebrand Factor), Hs00262170\_m1 (TIM-3), Hs00203958\_m1(FOXP3), Hs00174579\_m1 (CD138). The 18s gene was used as an endogenous control (Taqman<sup>®</sup> PDAR Endogenous Control, Applied Biosystems). Gene Expression Assays consisted of 20 times concentrated (360 $\mu$ L) mix of PCR primers and Taqman<sup>®</sup> MGB (Minor Groove Binding) probes. The assays are designed for the detection and amplification of specific genetic sequences. All primers utilized are intro-spanning to avoid genomic DNA amplification (Gene Expression Assays/Custom Primers and Probes, Applied Biosystems, USA). The Taqman<sup>®</sup> probes were labeled with FAM<sup>®</sup> as the reporter dye and TAMRA as the quencher dye, except for the 18s, which was labeled with VIC as the reporter dye and TAMRA as the quencher dye. Briefly, the amount of the

targets genes was normalized first to an endogenous control, and to relative calibrator using the formula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Hence, steady-state mRNA levels were expressed as an n-fold difference relative to the calibrator.

#### *C4d staining and detection of donor-specific antibodies (DSA)*

The complement fraction C4d was detected by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded sections with a peroxidase technique and polyclonal antibody (American Research Products™, Palo Alto, CA, USA). Linear and circumferential staining in >50% of peritubular capillaries (PTC) was the criteria for diffuse C4d positivity and the same staining in 25-50% of PTC was considered a focal positivity.

The presence of antibodies against donor HLA was determined by flow cytometry (Luminex platform), using the Labscreen® *Single Antigen* (One Lambda, Inc. Canoga Park, CA, USA). Assays were performed according to the manufacturer's instructions. DSA analysis was performed in 50 patients whose serum was obtained before the biopsy.

#### *Statistical analyses*

Data are presented as absolute numbers, means  $\pm$  standard deviations, medians or percentages. The mRNA levels were analyzed using Kruskal-Wallis non-parametric test for comparisons between groups. Fisher's exact test was used to compared qualitative variables. Sperman's test was employed to evaluate correlations between gene expression on tissue and blood samples. Receiver operating characteristics (ROC) curves analyses were performed for all genes, in PMBC and renal tissue sample to evaluate diagnostic parameters of ABMR and to calculate the cutoff values. All analyses were performed using

the SPSS software (version 18.0, SPSS Inc, Chicago). A P-value of less than 0.05 was considered significant.

## Bibliographic References

1. Moll S, Pascual M. Humoral rejection of organ allografts. *Am J Transplant.* 2005; **5**: 2611-8.
2. Zhang Q, Liang LW, Gjertson DW, et al. Development of posttransplant antidonor HLA antibodies is associated with acute humoral rejection and early graft dysfunction. *Transplantation.* 2005; **79**: 591-8.
3. Reinsmoen NL, Cornett KM, Kloehn R, et al. Pretransplant donor-specific and non-specific immune parameters associated with early acute rejection. *Transplantation.* 2008; **85**: 462-70.
4. Chang AT, Platt JL. The role of antibodies in transplantation. *Transplant Rev (Orlando).* 2009; **23**: 191-8.
5. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int.* 1993; **43**: 1333-8.
6. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant.* 2003; **3**: 708-14.
7. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol.* 2007; **18**: 1046-56.
8. Bestard O, Cruzado JM, la Franquesa M, Grinyo JM. Biomarkers in renal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010; **15**: 467-73.
9. Hartono C, Muthukumar T, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of acute rejection of renal allografts. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010; **15**: 35-41.
10. Aquino Dias EC, Veronese FJ, Santos Goncalves LF, Manfro RC. Molecular markers in subclinical acute rejection of renal transplants. *Clin Transplant.* 2004; **18**: 281-7.
11. Li B, Hartono C, Ding R, et al. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med.* 2001; **344**: 947-54.

12. Carstens J, Ozbay A, Tarring C, Hansen HE. Intragraft mRNA cytotoxic molecule expression in renal allograft recipients. *Transpl Immunol.* 2009; **20**: 212-7.
13. Aquino-Dias EC, Joelsons G, da Silva DM, et al. Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney Int.* 2008; **73**: 877-84.
14. 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**: 1661-5.
15. Heidt S, San Segundo D, Shankar S, et al. Peripheral blood sampling for the detection of allograft rejection: biomarker identification and validation. *Transplantation.* 2011; **92**: 1-9.
16. Einecke G, Reeve J, Mengel M, et al. Expression of B cell and immunoglobulin transcripts is a feature of inflammation in late allografts. *Am J Transplant.* 2008; **8**: 1434-43.
17. Martins HL, Silva C, Martini D, Noronha IL. Detection of B lymphocytes (CD20+) in renal allograft biopsy specimens. *Transplant Proc.* 2007; **39**: 432-4.
18. Ponciano VC, Soares MF, Naka EL, et al. Urinary CD20 mRNA as a surrogate of CD20-positive cells infiltration during allograft dysfunction in renal transplant patients. *Int Immunopharmacol.* 2009; **9**: 663-7.
19. Raghavan R, Jeroudi A, Achkar K, Gaber AO, Patel SJ, Abdellatif A. Bortezomib in kidney transplantation. *J Transplant.* 2010; **2010**.
20. Chiurciu C, Ruggenti P, Remuzzi G. Thrombotic microangiopathy in renal transplantation. *Ann Transplant.* 2002; **7**: 28-33.
21. Sis B, Halloran PF. Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010; **15**: 42-8.
22. Rowshani AT, Bemelman FJ, Lardy NM, Ten Berge IJ. Humoral immunity in renal transplantation: clinical significance and therapeutic approach. *Clin Transplant.* 2008; **22**: 689-99.



23. Coca SG, Yalavarthy R, Concato J, Parikh CR. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: a systematic review. *Kidney Int.* 2008; **73**: 1008-16.
24. Sawitzki B, Pascher A, Babel N, Reinke P, Volk HD. Can we use biomarkers and functional assays to implement personalized therapies in transplantation? *Transplantation.* 2009; **87**: 1595-601.
25. Oberbauer R. Biomarkers-a potential route for improved diagnosis and management of ongoing renal damage. *Transplant Proc.* 2008; **40**: S44-7.
26. Higgins R, Zehnder D, Chen K, et al. The histological development of acute antibody-mediated rejection in HLA antibody-incompatible renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2010; **25**: 1306-12.
27. Worthington JE, McEwen A, McWilliam LJ, Picton ML, Martin S. Association between C4d staining in renal transplant biopsies, production of donor-specific HLA antibodies, and graft outcome. *Transplantation.* 2007; **83**: 398-403.
28. 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**: 7-14.
29. Newell KA, Asare A, Kirk AD, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest.* 2010; **120**: 1836-47.
30. Kirk AD, Turgeon NA, Iwakoshi NN. B cells and transplantation tolerance. *Nat Rev Nephrol.* 2010; **6**: 584-93.
31. Stegall MD, Gloor JM. Deciphering antibody-mediated rejection: new insights into mechanisms and treatment. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010; **15**: 8-10.
32. Everly MJ, Terasaki PI. Monitoring and treating posttransplant human leukocyte antigen antibodies. *Hum Immunol.* 2009; **70**: 655-9.
33. Tsai EW, Wallace WD, Gjertson DW, Reed EF, Ettenger RB. Significance of intragraft CD138+ lymphocytes and p-S6RP in pediatric kidney transplant biopsies. *Transplantation.* 2010; **90**: 875-81.

34. Hidalgo LG, Einecke G, Allanach K, et al. The transcriptome of human cytotoxic T cells: measuring the burden of CTL-associated transcripts in human kidney transplants. *Am J Transplant.* 2008; **8**: 637-46.
35. Cesari F, Marcucci R, Gori AM, et al. High platelet turnover and reactivity in renal transplant recipients patients. *Thromb Haemost.* 2010; **104**: 804-10.
36. Benz K, Amann K. Thrombotic microangiopathy: new insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2010; **19**: 242-7.
37. Ozdemir BH, Sar A, Haberal M. The importance of glomerular deposits of von Willebrand factor in human renal allografts. *Ren Fail.* 2006; **28**: 315-21.
38. Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature.* 2002; **415**: 536-41.
39. Ponciano VC, Renesto PG, Nogueira E, et al. Tim-3 expression in human kidney allografts. *Transpl Immunol.* 2007; **17**: 215-22.
40. Manfro RC, Aquino-Dias EC, Joelsons G, Nogare AL, Carpio VN, Goncalves LF. Noninvasive Tim-3 messenger RNA evaluation in renal transplant recipients with graft dysfunction. *Transplantation.* 2008; **86**: 1869-74.
41. Veronese F, Rotman S, Smith RN, et al. Pathological and clinical correlates of FOXP3+ cells in renal allografts during acute rejection. *Am J Transplant.* 2007; **7**: 914-22.
42. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med.* 2005; **353**: 2342-51.
43. Iwase H, Kobayashi T, Kodera Y, et al. Clinical significance of regulatory T-cell-related gene expression in peripheral blood after renal transplantation. *Transplantation.* 2011; **91**: 191-8.
44. Bunnag S, Allanach K, Jhangri GS, 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.

## Tables

Table 1. Demographic and clinical data.

Parameter	Group					P
	ABMR	ACR	ACR+ABMR	NTA	Normal	
Number of patients	20	12	6	9	9	
Gender distribution (M/F)	9/11	10/2	5/1	8/1	7/2	0.056
Recipient age <sup>a</sup>	41±13	43±14	37±12	49±12	36±14	0.258
Donor (living/deceased)	4/16	7/5	3/3	1/8	6/3	0.022
HLA mismatches <sup>a</sup>	3.3±1.5	3.5±1.7	3.7±1.2	3.3±0.7	2.1±2.0	0.090
Delayed graft function (DGF) <sup>b</sup>	85	33	33	78	22	0.002
<i>Panel reactive antibodies</i> <sup>c</sup>						0.514
Negative	10	8	5	6	7	
Positive < 50%	3	3	0	1	1	
Positive ≥ 50%	7	1	1	2	1	
<i>C4d staining</i>						0.007
Negative	0	12	0	0	9	
Positive focal	5	0	5	7	0	
Positive diffuse	15	0	1	2	0	
DSA <sup>c,d</sup> (positive/negative)	8/11	2/9	1/5	2/6	0/6	0.032

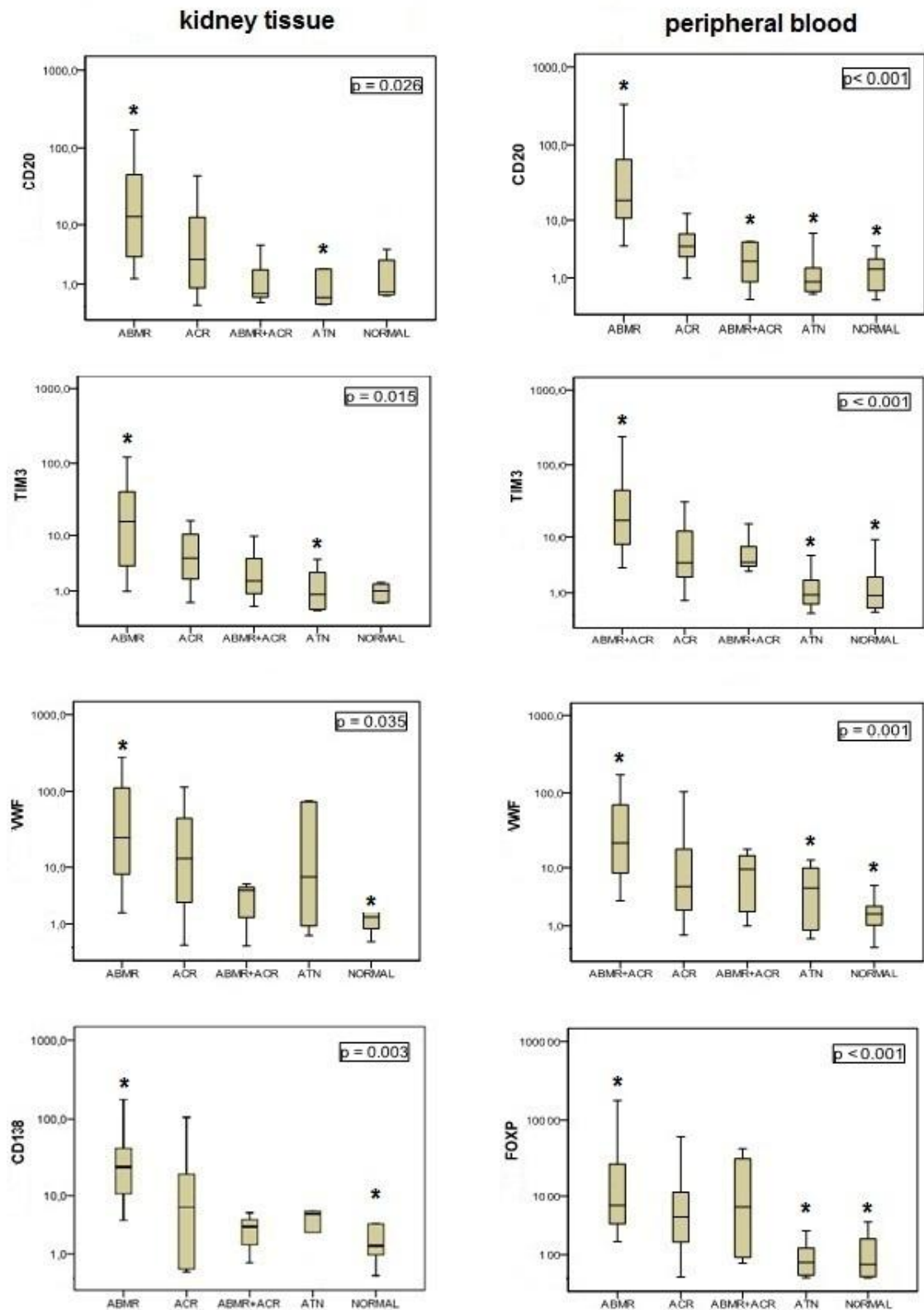
<sup>a</sup> Means ± SD, <sup>b</sup> Percentage of cases, <sup>c</sup> Class I or Class II, <sup>d</sup> Results for 50 patients.

Table 2. ROC Curves data.

Gene	Renal Tissue					Blood Peripheral				
	AUC <sup>1</sup>	SE <sup>2</sup>	SP <sup>3</sup>	CI <sup>4</sup>	P	AUC <sup>1</sup>	SE <sup>2</sup>	SP <sup>3</sup>	CI <sup>4</sup>	P
CD20	0.836	82%	70%	0.698 – 0.975	0.002	0.950	94%	88%	0.874 – 1.000	<0,001
CD138	0.905	91%	85%	0.771 – 1.000	<0.001	0.607	50%	68%	0,432 – 0,781	0.228
VWF	0.764	73%	70%	0.594 – 0.933	0.017	0.835	81%	71%	0.721 – 0.948	<0,001
TIM-3	0.818	82%	65%	0.657 – 0.979	0.004	0.899	87%	80%	0.816 – 0.982	<0,001
FOXP3	0.695	73%	55%	0.497 – 0.894	0.076	0.779	75%	74%	0.654 – 0.905	<0,001

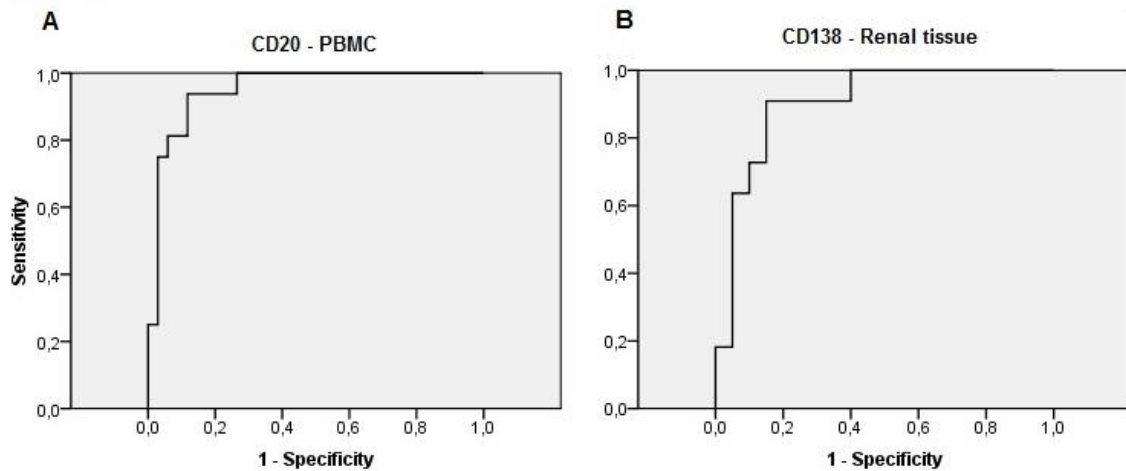
<sup>1</sup> Area under curve, <sup>2</sup> Sensibility, <sup>3</sup> Specificity, <sup>4</sup> Confidence interval

## Figures



**Figure 1.** Quantification mRNA expression of genes in kidney tissue and PBMC, according to the histological diagnosis. The box-plots representation shows the medians and the percentile values. Expressions of genes without

significant differences were not described in figure. ABMR - acute antibody mediated rejection; ACR - acute cellular rejection, ABMR+ACR - acute cellular rejection with humoral; ATN – acute tubular necrosis; NORMAL - without rejection.



**Figure 2.** ROC curves. Curve A: CD20 in the peripheral blood AUC = 0.950 (0.874 – 1.000,  $p < 0.001$ ). Curve B: CD138 in the tissue AUC = 0.905 (0.771 – 1.000,  $p < 0.001$ ).

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, encontramos marcadores que podem auxiliar para diferenciar rejeição celular e rejeição humoral. A quantificação de mRNA de CD20, em sangue periférico, e CD138, no tecido renal, apresentaram bons resultados. Estes dados preliminares, demonstrados na avaliação pelas curvas ROC, sugerem estes genes como potenciais biomarcadores para o diagnóstico de RAMA. Não encontramos diferenças estatísticas das expressões entre as duas formas de rejeições agudas avaliadas, entretanto a expressão dos genes foi maior em RAMA do que na rejeição celular aguda. Quando comparadas aos grupos necrose tubular aguda e normal, as expressões de RAMA foram significativas na maioria dos genes.

Em relação a amostra não invasivas, sangue periférico apresentou bons resultados. A avaliação da expressão gênica destes marcadores em amostras de urina poderá ser objetivo de outros estudos. Houve correlação entre amostras de sangue periférico e tecido renal quanto à expressão de transcritos de mRNA CD20 e TIM-3.

Como sabemos, os resultados de pesquisas não estão somente ligados a metodologia adotada, como também aos objetivos propostos e ao tempo disponível para execução. Podemos citar a dificuldade em chegar a um conjunto amostral razoavelmente grande devido à incidência de RAMA. O total de pacientes avaliados gerando resultados mais sólidos é importante para fundamentar os achados e as conclusões do estudo. Outro fator limitante foi à obtenção de amostras para detecção de DSA, não conseguimos amostras de

soro de todos pacientes para realizar os testes. Também enfrentamos problemas para coletar as amostras de biópsia e sangue periférico concomitantemente, justificando assim o não pareamento de amostras. Não obstante estas limitações, pudemos descrever dados relevantes que poderão objetivar novos estudos, no que se refere à biomarcadores não invasivos como ferramenta de diagnóstico. Com mais estudos poderão se confirmar estes achados, validando novos biomarcadores.

## 5 APÊNDICES

### A – PROTOCOLO DE PESQUISA DE DADOS

Projeto: **Componente humoral em rejeições do enxerto renal: Análise molecular em tecido e sangue.**

Amostra:                      Prontuário:                      Classificação no estudo:

#### Dados do receptor:

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Etnia: ( ) Caucasóide ( ) Negróide ( ) Oriental

Data biópsia: \_\_/\_\_/\_\_\_\_ DGF: ( ) Sim ( ) Não

Doença de base:

( ) DM ( ) HAS ( ) GNC ( ) Doença Policística ( ) Pielonefrite crônica

( ) Nefrite intersticial crônica ( ) Indeterminada ( ) Outros

CMV receptor IgM: ( ) Negativo ( ) Positivo

HCV: ( ) Negativo ( ) Positivo

HLA: A \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_; B \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ DR \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ Mismatches: \_\_\_\_\_

PRA Pré-tx: Classe I \_\_\_\_\_ Classe II \_\_\_\_\_

Tx anterior: \_\_\_\_\_ Gravidez: \_\_\_\_\_ Transfusões: \_\_\_\_\_ Tempo de diálise: \_\_\_\_\_

	Pré	6mês	1ºano	2ºano	3ºano	4ºano	5ºano
Creatinina							
IPC							

Resultado **C4d**: \_\_\_\_\_

**DSA**: ( ) Negativo ( ) Positivo PRA Pós-tx: Classe I \_\_\_\_\_ Classe II \_\_\_\_\_

	1ºano	2ºano	3ºano	4ºano	5ºano
TFG					
Sobrevida Paciente					
Sobrevida Enxerto					

**Desfecho paciente**: ( ) Segue transplantado ( ) Retornou a lista ( ) Óbito

#### Dados do doador

Idade: \_\_\_\_\_ Doador: ( ) Vivo ( ) Falecido

HLA: A \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_; B \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ DR \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_



**Dados da cirurgia e do transplante:**

Data do transplante: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Tempo de isquemia fria: \_\_\_\_\_

Tempo de anastomose: \_\_\_\_\_

Imunossupressão:

 Prednisona;  Micofenolato;  Tacrolimus;  CyA;  Everolimus ;  AzatioprinaIndução:  ATG;  Basiliximab  NenhumImunoglobulina:  Sim  NãoPlasmaferese:  Sim  Não**Dados das análises moleculares:**

Índice 260/280 nM tecido renal: \_\_\_\_\_

Índice 260/280 nM sangue: \_\_\_\_\_

Índice 260/280 nM urina: \_\_\_\_\_

<b>GENE</b>	<b>Quant. Tecido</b>	<b>Quant. Sangue</b>	<b>Quant. Urina</b>

Observações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

A unidade de Transplante Renal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo presente termo de consentimento convida o (a) Sr (a) \_\_\_\_\_ a participar de um estudo que tem como objetivo desenvolver melhores métodos para o diagnóstico da rejeição de transplantes renais e de forma mais rápida e segura. Os procedimentos a que os (as) Sr (as) serão submetidos são coleta de biópsias renais que forem necessárias por indicação do médico. Um fragmento do material da biópsia assistencial será para a pesquisa, junto com a biópsia será necessária a coleta de sangue. O objetivo principal do estudo é uma análise molecular que poderá indicar o diagnóstico de rejeição em amostras consideradas não invasivas. O risco representado pelas biópsias renais é mínimo. Pode ocorrer em até 5% dos casos, sangue na urina depois da coleta, que não necessita tratamento específico. Risco de hemorragia grave é raro ocorrendo em menos de 0,5% dos pacientes submetidos à biópsias. As coletas de sangue (por punção da veia do braço) não oferecem risco, podendo ocorrer apenas um pequeno hematoma na área da punção da veia. Nenhum benefício financeiro será obtido na participação no presente estudo, tanto para a unidade de transplante renal, quanto para os (as) Sr (as), mas sua ajuda será importante na pesquisa de tratamentos melhores para a rejeição de futuros pacientes. Para seu esclarecimento a qualquer momento ou em caso de necessidade o Sr (a) poderá entrar em contato com os membros da equipe da unidade de transplante renal pelos telefones 3359-8295, 3359-8121, 3359-8878 ou ainda pelos telefones celulares do Dr. Luiz Felipe Santos Gonçalves (99814954).

Eu, \_\_\_\_\_ aceito a participar do estudo **Componente humoral em rejeições do enxerto renal: Análise molecular em tecido, sangue e urina**, e declaro que fui também informado:

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

- Da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo à continuação de meu cuidado e tratamento;
- Do caráter confidencial das informações relacionadas com minha privacidade;
- Da disponibilidade de tratamento médico caso existam complicações causadas por esta pesquisa;
- De que não terei despesas por participar do estudo.

---

Assinatura do paciente

---

Assinatura do pesquisador  
Luiz Felipe S. Gonçalves (51) 3359-8295

## **7 ANEXOS**

### **ANEXO I – INSTRUÇÕES AO AUTOR**

#### ***“TRANSPLANTATION”***