

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

AVALIAÇÃO MOLECULAR DA DISFUNÇÃO INICIAL DO ENXERTO EM
TRANSPLANTES RENAIIS

ESTHER CRISTINA AQUINO DIAS

Porto Alegre

2007

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

AVALIAÇÃO MOLECULAR DA DISFUNÇÃO INICIAL DO ENXERTO EM
TRANSPLANTES RENAIIS

Tese de doutorado apresentada como
requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Ciências Médicas: Nefrologia

ESTHER CRISTINA AQUINO DIAS

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro

Porto Alegre

2007

Com amor aos meus filhos,

Pedro Henrique, Maria Joana e Isadora

Maravilhosas razões que me trouxeram até

aqui...

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais Wilson Pereira Dias e Gessy Aquino Dias, pelo carinho, dedicação e força dispensados; pela educação que serviu de base para que eu chegasse até aqui.

- Aos meus filhos Pedro Henrique Dias Ferreira, Maria Joana Dias Ferreira e Isadora Dias Siebiger, pelo afeto que nos une; pelo incentivo e compreensão nos momentos de ausência.

- A minha irmã Ivana Aquino Dias de Araújo e esposo Flávio de Araújo, pelo carinho, auxílio e incentivo.

- Ao meu genro Eduardo Torres Tomedi, pelo incentivo e suporte técnico em informática e a minha nora Tatiane Arrué Felix, pelo incentivo.

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

- Ao Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro, orientador deste trabalho. Agradeço a oportunidade, a confiança, o incentivo ao meu crescimento, a

valorização do meu trabalho, os ensinamentos e o exemplo de professor e pesquisador.

- Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Santos Gonçalves pelo apoio, pela disponibilidade constante, pelos ensinamentos, pelo convívio e amizade ao longo destes anos.

- Ao Prof. Dr. César Costa, exemplo de mestre, agradeço todo carinho, apoio e força espiritual que me trouxeram seus ensinamentos.

- Aos pacientes que participaram desse estudo, pela disponibilidade, entendimento e desprendimento.

- Às amigas, mais que amigas, Virna Nowotny Carpio, Ana Cristina Arámburu da Silva e Fernanda Franzoi pela indescritível solidariedade e apoio ao longo desses anos.

- Aos amigos Antônio Carlos Collar da Silva e Arthur Albella por todo incentivo e força.

- Aos amigos e colegas do serviço de Nefrologia do HCPA: Gabriela Corrêa Souza, Nisséia Jahn, Nícia Maria Romano Bastos, Adriana Reginato Ribeiro, Alessandra Vicari, Erwin Otero Garcés, Daniel Melquiades da Silva, Alessandra Sarturi Güeler, Maria Conceição Proença, Adriana Tessari, Cristina Karhol, Antônio Balbinotto, Cíntia Dallasta Caetano e Roberto Berdichevsky, pelo incentivo, apoio e auxílio.

- Ao aluno de iniciação científica Gabriel Joelsons, pelo auxílio com o banco de dados e com as coletas.

- Aos Drs. Francisco José Veríssimo Veronese e José Vanildo Morales, pelo incentivo e apoio.

- Aos colegas do laboratório de biologia molecular aplicada à Nefrologia do Curso de Pós Graduação em Nefrologia Ane Nunes, Liana Rosatto, Vagner Milani e Daiana Benck, pelo convívio e incentivo.

- À secretária do Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, Rute Helena dos Santos, pelo auxílio e amizade.

- Às secretárias do Serviço de Nefrologia: Jussara Cruz, Jaqueline da Rosa e Cristina Dal' Pra, pela amizade e disponibilidade.

- Às secretárias do ambulatório de transplante renal, Zona 12, Rosane Peixoto Figueiredo e Jane Cupper Medeiros, pela disponibilidade e auxílio.

- Aos técnicos em enfermagem do Serviço de Nefrologia do HCPA, pelo convívio e apoio ao longo desses anos.

- A todos os residentes que passaram pelo Serviço de Nefrologia do HCPA durante esses anos, pelo auxílio e respeito ao meu trabalho.

- Aos funcionários do oitavo andar sul e do centro cirúrgico ambulatorial, pela disponibilidade e auxílio.

- Às funcionárias do Grupo de Pós Graduação e Pesquisa (GPPG) Eliane Reisdorfer, Marta Regina Dotto, Rosimara Moura de Medeiros, Janice Maria Hollweg e Camila Barros Dutra da Silva, pelo auxílio e atenção dedicados.

- À Vânia Naomi Hirakata, pela disponibilidade e por todo suporte às análises estatísticas deste trabalho.

- À secretária do Centro de Pesquisas do HCPA Fabiana da Silva, pela disponibilidade e atenção.

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

- Ao Grupo de Pós Graduação e Pesquisa (GPPG) e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo suporte financeiro e editorial.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	09
LISTAS DE FIGURAS	11
LISTAS DE TABELAS	12
I. INTRODUÇÃO	13
A resposta imune ao enxerto	15
A rejeição aguda do enxerto	19
A disfunção inicial do enxerto	20
A avaliação imunológica de enxertos renais	23
Os estudos clínicos na monitorização imunológica	31
Referências bibliográficas	35
II. OBJETIVOS	51

III. ARTIGO: Avaliação molecular de transplantes renais com disfunção inicial do enxerto. Utilidade diagnóstica da quantificação dos genes de moléculas citolíticas, PI-9 e FOXP3 em sangue periférico e em células urinárias	52
Resumo	53
Introdução	55
Resultados	57
Discussão	59
Materiais e Métodos	66
Pacientes e coleta de amostras	66
Extração de RNA	67
Quantificação da expressão de RNAm	68
Análises estatísticas	69
Referências	70
IV. Conclusões	84

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADCC: citotoxicidade celular dependente de anticorpo
- APC: célula apresentadora de antígeno (*antigen presenting cell*)
- cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar
- CD: *cluster of differentiation*
- MHC: complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*)
- CT: ciclo do *threshold*
- DIE: disfunção inicial do enxerto
- DNA: ácido desoxirribonucléico (*Deoxyribonucleic Acid*)
- EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
- Fas-L: fas ligante
- FOXP3: *X-linked forkhead/winged helix transcription factor*
- GzB: granzima B
- HLA: antígeno leucocitário humano (*Human Leucocyte Antigen*)
- IFN γ : interferon gama
- IL: interleucina
- IP-10: *interferon inducible protein*
- NCE: nefropatia crônica do enxerto

- NIC: nefrotoxicidade por inibidores da calcineurina
- NTA: necrose tubular aguda
- NOR: normais
- PCR: reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
- PCR- TR: reação em cadeia da polimerase em tempo real
- Per: perforina
- PI-9: serpina proteinase inibidora 9
- RA: rejeição aguda
- RcT: receptor da célula T
- RNA: ácido ribonucléico
- RNAm: mensageiro do ácido ribonucléico
- ROC: *Receiver operating characteristic*
- RSC: rejeição sub-clínica
- RT: transcrição reversa (*Reverse Transcription*)
- RT-PCR: transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
- Th: linfócito T auxiliar (*T helper*)
- TIM-3: *T cell immunoglobulin-mucin*
- TNF: fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)
- TNF α : fator de necrose tumoral α
- *Treg cells*: linfócitos T reguladores

LISTAS DE FIGURAS

Introdução

- Figura 1. Mecanismos efetores da rejeição alogênica 18
- Figura 2. Gráfico de emissão de fluorescência na reação em cadeia da polimerase em tempo real a cada ciclo de reação 29

Artigo

- Figura 1. Níveis de RNAm de perforina, granzima B e fas ligante 80
- Figura 2. Níveis de RNAm de PI-9 e FOXP3 81

LISTA DE TABELAS

Introdução

Tabela 1. Fatores de risco para disfunção inicial do enxerto	22
--	----

Artigo

Tabela 1. Dados demográficos dos grupos em estudo e controles	76
---	----

Tabela 2. Coeficientes de correlação de Spearman das quantificações dos genes nos diferentes compartimentos	77
---	----

Tabela 3. Pontos de corte e parâmetros diagnósticos, em percentagens, das quantificações moleculares para o diagnóstico de rejeição aguda em sangue periférico de pacientes com disfunção inicial do enxerto	78
--	----

Tabela 4. Pontos de corte e parâmetros diagnósticos, em percentagens, das quantificações moleculares para o diagnóstico de rejeição aguda em células urinárias de pacientes com disfunção inicial do enxerto	79
--	----

I. INTRODUÇÃO

Os experimentos iniciais em transplantação de órgãos, realizados em animais, datam do princípio do século XX. O primeiro aloenxerto renal, em humanos, foi feito em 1936, na Ucrânia. Porém, a falta de êxito nas tentativas de transplantar órgãos entre seres humanos geneticamente diferentes e a falta de conhecimentos que elucidassem os problemas encontrados, levou ao abandono dos transplantes naquele momento (1-3).

No início da década de 50, os insipientes conhecimentos dos mecanismos imunológicos colocados em prática demonstraram que as dificuldades encontradas advinham da barreira imune. Ficou claro também que a identidade genética entre doador e receptor era facilitadora da transplantação. O primeiro transplante renal bem sucedido em humanos ocorreu em Boston, no ano de 1954 e foi realizado entre gêmeos idênticos (1, 2).

A imunossupressão eficiente passou a ser utilizada no início dos anos 60 com a prednisona e a azatioprina. Posteriormente, o emprego da ciclosporina A produziu um novo impulso aos transplantes e o uso de

anticorpos monoclonais a partir de 1980 possibilitou melhores resultados no tratamento e na profilaxia da rejeição. O crescente aprimoramento da imunossupressão farmacológica e biológica, da prova cruzada e das tipagens teciduais, contribuiu muito para o sucesso atual dos transplantes (1-3).

No decorrer do tempo, diferentes técnicas de manipulação do sistema imunológico foram utilizadas. Demonstrou-se que o prognóstico de sobrevida do órgão estava diretamente relacionado ao número de transfusões administradas antes do transplante. Passaram então a ser utilizadas as transfusões de doadores não relacionados ao doador do enxerto e, após, do doador do enxerto. Estas manobras foram, posteriormente abandonadas, em decorrência da melhoria na qualidade da imunossupressão (3).

A aplicação clínica da compatibilidade do sistema HLA-DR entre doador e receptor foi demonstrada e, ainda hoje, é de significativa importância para a sobrevida do enxerto (1, 2).

Atualmente, o transplante renal é o melhor tratamento para pacientes com insuficiência renal crônica terminal, oferecendo-lhes maior sobrevida e melhor qualidade de vida. Entretanto, a perda dos enxertos continua em níveis elevados, especialmente ao longo dos anos (4). A rejeição aguda (RA) ainda é, entre outras, uma das causas de perda de enxertos e um fator de impacto negativo na sobrevida tardia (5, 6). Os novos fármacos imunossupressores diminuíram os índices de rejeição aguda significativamente, embora a sobrevida a longo prazo permaneça quase inalterada (7). Ainda hoje, os mecanismos básicos da rejeição aguda não são totalmente entendidos. A melhor compreensão de sua fisiopatogenia para a detecção e monitorização é essencial, tanto na abordagem terapêutica do receptor, quanto na adequação de protocolos de imunossupressão (1, 4, 7-9). Falhas em reconhecer a etiologia da disfunção

do enxerto podem resultar em diminuição na imunossupressão, podendo levar a dano maior e menor sobrevida do enxerto. Por outro lado, o diagnóstico incorreto da rejeição pode levar a um tratamento imunossupressor agressivo, o que pode acarretar maiores riscos de infecções e outros eventos adversos decorrentes da imunossupressão. Torna-se assim indispensável a utilização de técnicas invasivas, como a biópsia renal, para o diagnóstico preciso da rejeição aguda (10).

A monitorização dos enxertos renais é feita pela medida de sua função, determinando-se rotineiramente a creatinina sanguínea, cujas variações não são específicas para a rejeição, e pela biópsia renal, um procedimento invasivo, com potencial de morbidade, caro e sujeito a erro de amostragem (10, 11). Desta forma, o desenvolvimento de métodos acurados e não invasivos (biomarcadores) têm sido objeto de estudos por vários grupos de pesquisadores (12, 13). A aplicação de técnicas de biologia molecular na identificação de RNA mensageiro (RNAm) tem fornecido informações importantes com relação ao diagnóstico da rejeição aguda, ao prognóstico e a resposta terapêutica do transplante renal (14).

A resposta imune ao enxerto

Com exceção da rejeição hiperaguda, que é mediada por aloanticorpos formados previamente ao transplante, os outros tipos de rejeição, em especial a rejeição aguda, são iniciados pelo reconhecimento aloantigênico pelo linfócito T. A reação de rejeição é mediada por uma variedade de leucócitos, incluindo macrófagos, células T citotóxicas (CD8+) e auxiliares (CD4+) e plasmócitos. Como conseqüência de uma rede de interações celulares e moleculares, que compreende também a secreção de diversas citocinas, quimiocinas e fatores de

crescimento, ocorre um recrutamento de células predominantemente inflamatórias para o enxerto que contribuem para a agressão ao órgão transplantado. A complexa rede de interações imunológicas leva a vários caminhos de agressão ao enxerto, às vezes, com algumas características predominantes, mas muitas vezes com sobreposição de mecanismos celulares e humorais (3, 15).

Os antígenos do sistema HLA (antígenos leucocitários humanos, do inglês *human leukocyte antigens*) – denominação do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*), em humanos, são geneticamente determinados e seus genes encontram-se no braço curto do cromossomo 6. Os antígenos são constituídos por glicoproteínas e têm importantes funções no sistema imune (1, 16, 17). Estes antígenos são também chamados de antígenos de transplante e são divididos em duas classes, denominadas I e II. Os antígenos de classe I, (HLA-A, B e C) estão presentes nas membranas citoplasmáticas da maioria das células nucleadas do organismo, incluindo os linfócitos T e B, plaquetas e células de órgãos parenquimatosos, sendo os alvos dos linfócitos T citotóxicos, e são facilmente detectados por métodos sorológicos. Os antígenos de classe II, principalmente HLA-DP, DQ e DR, são menos bem caracterizados e têm distribuição restrita. São normalmente encontrados em linfócitos B, células T ativadas, macrófagos, no endotélio vascular e em algumas células epiteliais. Assim como os antígenos de classe I podem ser detectados por métodos sorológicos e moleculares. A compatibilidade dos pares doador e receptor nos antígenos do MHC é importante para o sucesso dos transplantes (3, 18, 19).

O reconhecimento antigênico ocorre em órgão linfóide secundário, onde células apresentadoras de antígeno (APC, do inglês *antigen presenting*

cell) estimulam e ativam linfócitos T, que entram em expansão clonal e migram para o enxerto onde irão desenvolver sua função efetora. Após a estimulação do linfócito T pela interação receptor da célula T-RcT/CPH e moléculas de adesão/co-estimulação, os complexos RcT/CD3 e CD4 ou CD8 tornam-se fisicamente associados e ativam várias enzimas intracelulares denominadas tirosino-quinases, que elevam a concentração de cálcio intracelular e ativam várias proteínas nucleares regulatórias (fatores de transcrição). Entre esses fatores de transcrição destacam-se NF-kB (*nuclear factor kB*), Oct-1 e NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) que se ligam a regiões regulatórias dos genes de várias citocinas como a IL-2, IL-4, γ -interferon e TNF- α . A ativação da imunidade celular, seguida de resposta do tipo hipersensibilidade tardia com a ativação de macrófagos/monócitos e linfócitos citotóxicos parece ser o mecanismo final da agressão celular ao enxerto. Os linfócitos T CD8 ou citotóxicos são responsáveis pelo reconhecimento e destruição das células-alvo. Seus mediadores citolíticos são a perforina e as granzimas, que ficam estocadas no citoplasma dos linfócitos, em grânulos semelhantes aos lisossomos e, quando as células são ativadas, migram para a membrana citoplasmática, fundem-se a ela e liberam os grânulos na direção da célula-alvo. Após esse ataque citolítico a célula-alvo pode morrer por necrose (caracterizada por ruptura da membrana citoplasmática e destruição das organelas) ou apoptose (caracterizada por condensação da cromatina, fragmentação do DNA e bolhas de membrana com citoplasma condensado). Outra via de ataque citotóxico utilizado pelas células T CD8⁺ é a indução de morte celular via interação fas/fas ligante. Fazendo parte da família do TNF, esta interação também leva a apoptose das células alvos (20-22). O papel dos mecanismos de rejeição mediados por anticorpos vem sendo

debatido há algumas décadas e, recentemente, têm recebido renovado interesse (23, 24). Os linfócitos B ativados e diferenciados em plasmócitos exercem um importante papel na produção e manutenção de respostas a aloanticorpos, constituindo, assim, um potencial alvo terapêutico (25).

Na Figura 1 a seguir estão representados de forma esquemática os principais eventos das fases de montagem da resposta imune aos aloantígenos, desde o reconhecimento alogênico que irá desencadear uma série de interações entre diferentes células do sistema imunológico, levando à citotoxicidade, hipersensibilidade tardia e à produção de anticorpos capazes de causar dano ao tecido transplantado (15).

Figura 1. Mecanismos efetores da rejeição alogênica. INF γ = interferon γ ; IL-2 = interleucina-2; ADCC = citotoxicidade celular dependente de anticorpos; RcT = receptor de célula T; APC = célula apresentadora de antígeno (*antigen presenting cell*).

A rejeição aguda do enxerto

A rejeição aguda é um dos principais fatores deletérios ao enxerto renal, podendo levar à sua falência. Além disso a ela é atribuído um papel significativo no desenvolvimento da nefropatia crônica do enxerto (26). Atualmente, a RA ocorre em torno de 10 a 20% dos pacientes e é a única forma de rejeição para a qual existe possibilidade de tratamento efetivo, que é eficaz na maior parte dos casos. A rápida diminuição da função do enxerto caracteriza esse tipo de rejeição, onde o órgão é reconhecido e atacado pelo sistema imune do hospedeiro (3).

Embora possa ocorrer a qualquer momento no curso pós-transplante, o período entre a primeira semana e os três primeiros meses após o transplante é o mais crítico. A RA tem início rápido e pode manifestar-se por febre, mal estar, hipertensão arterial, oligúria e aumento da creatinina sérica. O enxerto pode estar aumentado de volume e ser doloroso à palpação. Na vigência de imunossuppressores potentes como a ciclosporina A ou o tacrolimus o quadro clínico é discreto e os sinais e sintomas podem ser frustrados ou mesmo ausentes (3). Geralmente associada com acometimento de vasos (vasculites) e de depósitos de imunoglobulinas ou ativação da cascata do complemento (depósito de C4d), a rejeição humoral tem um prognóstico mais reservado. Em muitos dos casos de rejeição aguda os componentes celular e humoral ocorrem simultaneamente. Porém, na maior parte dos casos de rejeição aguda o componente celular é, em geral, predominante (1, 3).

A apresentação clínica da rejeição aguda depende substancialmente da “quantidade” de imunossupressão a qual o paciente está submetido, ou seja, regimes imunossuppressores mais potentes, em geral, não se acompanham dos sinais e sintomas anteriormente citados. Assim, o diagnóstico da rejeição aguda

baseia-se no quadro clínico, quando presente, em exames de imagem e laboratoriais. A clínica e os exames laboratoriais são considerados pouco sensíveis e pouco específicos para o diagnóstico diferencial da disfunção aguda do enxerto (12, 27). Outros métodos não invasivos, como a ultrasonografia com efeito doppler e a cintilografia carecem de acurácia diagnóstica (12, 28, 29).

A disfunção inicial do enxerto

A disfunção inicial do enxerto (DIE), em geral atribuída à necrose tubular aguda (NTA) é um evento comum em pós-operatório imediato de transplantes renais feitos com órgãos de doador falecido (30, 31). No Brasil a incidência de DIE é ainda maior que a reportada na literatura norte-americana e européia (32-34). A ausência de função do enxerto implica na necessidade de diálise e complica sobremaneira o manejo dos pacientes dificultando o diagnóstico da rejeição aguda e de outras complicações relacionadas ao enxerto. Além disso, foi demonstrado em modelos experimentais e em transplantes clínicos que na vigência de DIE ocorre um aumento na probabilidade de episódios de rejeição aguda levando a menores sobrevidas dos enxertos (30, 31, 34-38).

Uma das barreiras para o estudo dessa patologia, bem como para comparações de resultados de estudos clínicos é a substancial ambigüidade em relação a uma definição comum. No que diz respeito à função dos enxertos, o *status* inicial pode variar em um espectro que vai da ausência completa de função, comumente chamada de NTA, função com recuperação lenta e função adequada. Mesmo assim, os termos DIE e NTA são freqüentemente usados

para definir a mesma desordem, embora o primeiro seja o diagnóstico clínico e o último o histopatológico (30).

A avaliação da necessidade de diálise no período pós-operatório é muitas vezes subjetiva. Algumas variáveis são consideradas nessa decisão, entre elas: a quantidade de urina produzida, os níveis séricos de uréia e creatinina, os eletrólitos sanguíneos e a sintomatologia atribuível à uremia. Recentemente, tentativas tem sido feitas para avaliar e quantificar a DIE de forma mais padronizada. A partir disso, como citado acima, diferentes descrições dos níveis de severidade de DIE foram introduzidas, tais como: (a) DIE requerendo diálise ou não, (b) disfunção intermediária e função retardada, (c) má função do enxerto (39-41). Entretanto, no contexto clínico, a DIE é, em geral, rotulada como tal pela necessidade de diálise na primeira semana pós-transplante (30, 38).

Devido à variabilidade da definição de DIE existe uma grande variação nas suas incidências relatadas (40). Porém, na maioria dos relatos a incidência varia entre 20-40% (42). No Brasil, conforme já referido, Azevedo e colaboradores avaliaram a frequência de DIE durante três anos, sendo a mesma maior do que a relatada em muitos estudos feitos em outros países (32, 42, 43).

Mecanismos patofisiológicos complexos são operantes nesta condição. Os fatores de risco que predisõem à DIE também são variáveis entre os centros transplantadores (44). Esses fatores podem ser categorizados em três áreas que compreendem características relacionadas ao doador, ao receptor e ao processo cirúrgico (38, 44).

Fatores de risco para o desenvolvimento da DIE relacionados ao doador e ao receptor foram descritos por Ojo e colaboradores, que se baseiam nos dados do Registro Científico de Transplante Renal dos Estados Unidos (US

Scientific Renal Transplant Registry), onde o aumento do tempo de isquemia fria apresentou forte associação à DIE (34).

A tabela abaixo sumariza os principais fatores de risco descritos para o desenvolvimento de DIE (30, 34, 38, 44-46).

Tabela 1. Fatores de risco para disfunção inicial do enxerto.

Órgão adquirido e processo cirúrgico
- Tipo de solução de preservação - Tempo de isquemia fria - Tempo das anastomoses vasculares
Doador
- Idade avançada - Histórico de hipertensão arterial - Morte por AVC (acidente vascular cerebral)
Receptor
- Idade - Doença de base - Hipertensão arterial - Transplantes prévios - Pré-sensibilização - Estado de hidratação - Incompatibilidades HLA

As manifestações clínicas da disfunção inicial do enxerto variam de acordo com a sua gravidade, desde o sutil e lento declínio dos níveis da creatininemia até a anúria prolongada, requerendo suporte dialítico. As conseqüências do desenvolvimento de DIE incluem hospitalização prolongada, necessidade de diálise no pós-operatório, aumento significativo dos custos do transplante, aumento da complexidade do manejo de fármacos imunossupressores, dificuldades aumentadas para o diagnóstico de rejeição aguda e de nefrotoxicidade por inibidores da calcineurina e a necessidade de

maior número de procedimentos diagnósticos muitas vezes invasivos (16, 34, 38).

Do ponto de vista prognóstico, a ocorrência da DIE está associada a piora na sobrevida do transplante renal, verificando-se que em grupos de pacientes com DIE, a sobrevida dos enxertos renais é significativamente menor do que as observadas em pacientes com função renal imediata (36).

O tipo de terapia imunossupressora parece influenciar substancialmente o tempo de recuperação da DIE (38). A nefrotoxicidade associada aos inibidores da calcineurina tem levado a sua não utilização inicial ou uso de doses reduzidas, juntamente com terapia de indução com anticorpos, em pacientes com DIE (47).

Uma vez estabelecida a DIE as estratégias que visam minimizar seus efeitos deletérios são a vigilância clínica e laboratorial aumentadas, consistindo principalmente da realização de ecografias com efeito doppler e/ou cintilografias renais, monitorização dos níveis sanguíneos dos imunossupressores e drogas nefrotóxicas e vigilância das infecções. Em muitos centros transplantadores biópsias renais de vigilância são efetuadas a cada 7 a 10 dias, até que ocorra a recuperação da função do enxerto renal (16). É, porém, necessário que se afaste outras causas potencialmente reversíveis de disfunção renal, tais como obstruções vasculares ou urológicas, fístulas urinárias e a nefrotoxicidade por drogas (48).

A avaliação imunológica de enxertos renais

A avaliação imunológica dos transplantes renais tem sido proposta levando-se em consideração os potenciais mecanismos da resposta imune ao aloenxerto. Objetiva-se basicamente revelar marcadores moleculares capazes

de identificar os processos inflamatórios da rejeição antes do surgimento da disfunção do enxerto, das alterações laboratoriais ou mesmo das lesões histológicas significativas.

Os ensaios para a monitorização imunológica dos enxertos podem ser: (a) específicos para os antígenos do doador (ensaios de diluição limitada, reação de hipersensibilidade tardia trans-vivo, ELISPOT e citometria de fluxo para células ativadas), que apresentam baixa sensibilidade e reprodutibilidade, são demorados e trabalhosos além de necessitarem células do doador; ou (b) não específicos (ELISA para citocinas/quimiocinas e métodos moleculares como a pesquisa por PCR ou *microarrays*), que apresentam resultados rápidos, são sensíveis, mas cujos resultados podem ser confundidos por processos inflamatórios sistêmicos ou infecções (revisado em 12).

Tradicionalmente, a demonstração de um processo inflamatório agressivo intra-enxerto é feita por análise citopatológica ou histopatológica, de aspirado renal ou fragmento de biópsia, respectivamente. O método diagnóstico da punção aspirativa seriada do rim transplantado, quantifica o infiltrado inflamatório intra-enxerto através do “incremento corrigido total”. Este índice é o somatório dos incrementos de células imunoativadas como plasmócitos, linfoblastos, monoblastos ou linfócitos ativados, e para cada tipo de célula é aplicado um fator de correção de acordo com a sua relevância na rejeição aguda (49, 50). Na prática atual este método perdeu utilidade devido a sua difícil reprodutibilidade e principalmente pela diminuição dos processos inflamatórios, resultando em infiltrados menos densos, decorrentes da imunossupressão mais eficiente.

Atualmente a biópsia do rim transplantado é largamente utilizada na avaliação da disfunção renal aguda e, apesar de suas limitações evidentes, é

considerada o padrão-ouro no diagnóstico diferencial da rejeição aguda. A classificação histopatológica denominada Banff tem por objetivo, padronizar as diversas lesões estruturais do rim transplantado e estabelecer de modo uniforme e reproduzível para clínicos e patologistas os diferentes graus de severidade das rejeições e de outras lesões (51-53). Recentemente, foi feita uma revisão desta classificação considerando-se os progressos no entendimento dos mecanismos de rejeição na montagem de padrões diagnósticos. Essa revisão realçou descobertas feitas nas áreas das tubulites, nas análises da expressão de genes por PCR em tempo real e *microarrays*, nos mecanismos de tolerância, acomodação, e imunomodulação, no papel dos monócitos e macrófagos na rejeição e na utilização do C4d como marcador de rejeição mediada por anticorpos (54).

A invasão do epitélio tubular por células mononucleares (tubulite) e da parede dos vasos (arterite intimal ou transmural) são consideradas as principais alterações indicativas de rejeição aguda. Também são achados associados, edema intersticial e endotelite ou edema das células endoteliais dos capilares glomerulares. Em rejeições severas ocorre necrose fibrinóide das pequenas artérias e arteríolas, agregados plaquetários, trombos de fibrina e hemorragia intersticial, todos sinais de mau prognóstico usualmente presentes em rejeições irreversíveis (55).

A rejeição sub-clínica (RSC) é caracterizada pela presença de infiltrado linfo-monocitário de localização túbulo-intersticial e mais raramente perivascular, com sinais de agressão tissular (em geral tubulite ou vasculite) observados em biópsias de protocolo de rins transplantados funcionalmente estáveis, sem evidências clínicas ou laboratoriais de agressão ao rim transplantado (27, 56, 57). O diagnóstico da rejeição sub-clínica depende da

realização de biópsias de protocolo. Estas, revelando a presença de rejeição sub-clínica podem indicar modificações no esquema imunossupressor e o seu tratamento possivelmente propicie melhor função e maior duração dos enxertos a longo prazo, sendo assim importante a sua detecção e manejo (27, 58-62). Estudo recente realizado por Nankivell e colaboradores demonstrou maior incidência de rejeição sub-clínica nos 3 primeiros meses pós-transplante e seu impacto negativo na incidência diagnóstico de nefropatia crônica do enxerto (63).

A nefropatia crônica do enxerto é a principal causa de perda tardia de rins transplantados. A etiopatogenia da nefropatia crônica do enxerto envolve mecanismos imunológicos e não imunológicos, sendo os achados histopatológicos fundamentais para sua confirmação diagnóstica (64-66).

Fica claro, portanto que o diagnóstico destas condições necessitam de avaliações histológicas a partir da obtenção de fragmentos renais, sendo este um método agressivo, caro e sujeito a complicações significativas. Além disso, a análise histopatológica apresenta problemas de acurácia diagnóstica devido à natureza focal dos processos inflamatórios intra-enxerto (10, 11). Desta forma, tornam-se importantes às pesquisas sobre outros métodos, preferencialmente não invasivos, que possam contribuir para uma maior precisão no diagnóstico e na monitorização das rejeições.

Métodos mais sensíveis e específicos como a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês: *polymerase chain reaction*), permitem a identificação e quantificação de transcritos de genes presentes no enxerto, no sangue ou na urina, podendo indicar a existência de um processo patogênico (58, 59). A PCR realizada a partir do ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA) sintetizado a partir do ácido ribonucléico (RNA) extraído de amostras

biológicas e submetido à transcrição reversa (RT-PCR) é a técnica mais utilizada, especialmente em situações em que somente pequenas quantidades de material são disponíveis para análise. O cDNA é amplificado através de uma reação que consta de três fases que ocorrem em diferentes temperaturas: (a) abertura das fitas de DNA; (b) anelamento dos iniciadores (*primers*) específicos para uma região do gene de interesse e (c) síntese com incorporação dos nucleotídeos presentes na reação. O produto final da PCR é, em geral, separado em gel de agarose ou acrilamida. O gel é corado com brometo de etídeo, que tem a capacidade de intercalar-se nas hélices duplas do DNA ligando-se às pontes de hidrogênio existentes na molécula e tornando possível a sua visualização sob luz ultravioleta (67, 68). O resultado final pode ser qualitativo denotando a presença ou ausência de ativação do gene. Este resultado pode também ser semi-quantitativo, executado por um ensaio competitivo (PCR competitivo) onde a quantificação é feita por densitometria óptica em reações onde a quantidade do competidor é conhecida permitindo inferir-se a quantidade do gene de interesse nas amostras examinadas que são previamente normalizadas a partir da quantidade de um gene de expressão conhecida. Por fim o ensaio pode ser de fato quantitativo utilizando-se a técnica da PCR em tempo real descrita em maior detalhe a seguir.

Diversos estudos empregando estes métodos têm demonstrado a presença de transcritos de genes citotóxicos na rejeição aguda acompanhada de disfunção do enxerto (69, 70) e também no enxerto com função estável (66, 71). Recentemente, a aplicação de técnicas mais precisas e reprodutíveis como a da PCR em tempo real e a técnica de DNA *microarrays* permitiram avanços significativos respectivamente na quantificação e identificação dos genes envolvidos na resposta aloimune e poderão vir a se constituir em importantes

métodos auxiliares na identificação e monitorização dos eventos inflamatórios relacionados aos enxertos renais (72, 73).

A técnica de PCR em tempo real permite a quantificação dos produtos da reação com elevada precisão. O método é bastante sensível e reprodutível, permitindo a detecção simultânea da expressão de genes de ativação de células T em um curto período de tempo. A aplicação deste método na avaliação de transplantes renais já foi iniciada e poderá vir a se constituir em um importante método na monitorização dos eventos inflamatórios intra-enxerto (72, 74, 75). Por esta técnica é possível quantificar a concentração inicial do gene alvo, ao contrário de outras formas de RT-PCR que analisam somente o produto final da reação. A quantificação dos produtos da reação é feita ciclo a ciclo e o sistema é baseado na detecção e quantificação de um *reporter* fluorescente. O sinal aumenta na proporção direta da quantidade de produto formado na reação. Os equipamentos disponíveis para esta técnica são compostos por um termociclador, um sistema ótico de detecção e um computador munido do programa que permite avaliar em tempo real a reação e foram idealizados primeiramente por Higuchi e colaboradores (76). Entre os métodos utilizados para a detecção quantitativa dispõe-se de técnica que utiliza sondas fluorescentes (por exemplo: *Taqman*[®] *probes e molecular beacons*); e DNA não específico marcado (por exemplo: *SYBR*[®] *Green*) (77). Pela gravação da quantidade de fluorescência emitida a cada ciclo torna-se possível correlacionar a quantidade inicial do alvo com a fase exponencial da reação, o ciclo onde ocorre o primeiro aumento significativo do produto da PCR (Figura 2).

Figura 2. Gráfico de emissão de fluorescência na reação em cadeia da polimerase em tempo real a cada ciclo de reação.

Às reações é também adicionado um controle endógeno a fim de normalizar e corrigir as diferentes quantidades de RNA consumidas nas reações. A escolha do controle endógeno é importante para a padronização da técnica para diferentes tipos de amostra (78-80). As quantificações por PCR em tempo real podem ser absolutas ou relativas. As quantificações absolutas de transcrição permitem a determinação precisa do número de cópias por célula, concentração total de RNA ou unidades de massa de tecido. Isto requer a construção de uma curva padrão absoluta, para assegurar a acurácia da transcrição reversa e dos perfis de amplificação da PCR. Em contraste, as quantificações relativas descrevem as mudanças na expressão do gene alvo relativo a algum grupo de referência, tais como um grupo controle, ou ainda uma amostra no tempo zero (78, 81). O método do $2^{-\Delta\Delta CT}$ requer equações e é

utilizado para calcular as mudanças relativas na expressão dos genes determinadas nos experimentos de PCR em tempo real. O CT (*ciclo do threshold*) indica a fração numérica em que a quantidade do alvo alcança um limiar fixo. A partir do valor do CT, calcula-se o Δ CT, que é a diferença entre os CTs do alvo e do controle endógeno, subtrai-se então o Δ CT resultante do Δ CT do calibrador escolhido. O resultado é apresentado em dados exponenciais, que são convertidos a lineares pela equação $2^{-\Delta\Delta CT}$. A derivação da equação em questão, desenho experimental e testes de validação estão disponíveis na literatura especializada (81).

Avanços tecnológicos recentes possibilitaram a detecção simultânea de centenas ou de milhares de genes utilizando uma pequena amostra de tecido. Dentre os novos métodos inclui-se a tecnologia dos *oligoarrays* de alta densidade ou *microarrays* (82, 83). O interesse desta tecnologia para a monitoração pós-transplante é muito grande por que a comparação do padrão de expressão dos genes em amostras de biópsias com e sem rejeição, por exemplo, permitiria a identificação de genes, ou de conjuntos de genes, que apresentam as maiores amplitudes de variação de expressão entre as duas condições. Diversos estudos vêm sendo feitos buscando avaliar o potencial desta técnica em revelar genes relevantes à resposta imune ao transplante. Assim, a técnica de DNA *microarray* tem o potencial de revelar genes participantes dos processos de rejeição, aceitação e tolerância aos aloenxertos, além de fornecer subsídios para o manuseio do evento imune (73, 82, 84-89).

Quaisquer moléculas que participem na ativação, desenvolvimento, regulação ou fase efetora da resposta imune são candidatas a fornecerem informações sobre a resposta do receptor contra o enxerto. Na rejeição aguda do transplante renal e de outros órgãos, estuda-se principalmente a expressão

dos genes que codificam para a formação de moléculas co-estimulatórias, citocinas e moléculas efetoras de citotoxicidade mediada por células, na busca de biomarcadores para a rejeição aguda (69, 70, 90-93). Essas moléculas são, em geral, pesquisadas em amostras de células sanguíneas, células obtidas de urina ou ainda aspirado do enxerto. A urina por refletir os eventos intra-renais e ser de fácil obtenção, vem sendo usada mais freqüentemente na busca de biomarcadores de rejeição.

Os estudos clínicos de monitorização imunológica.

A identificação de linfócitos T citotóxicos foi inicialmente demonstrada por Strom e colaboradores, através da fenotipagem do infiltrado mononuclear em rins com rejeição irreversível (94). Posteriormente, utilizando a técnica do PCR competitivo em rins com rejeição aguda, os mesmos autores quantificaram o aumento da expressão dos genes de perforina e granzima B, que atuam na fase cito-destrutiva da resposta imune (70). Do mesmo grupo, Strehlau e colaboradores detectaram em rins com critérios histológicos de rejeição aguda aumento significativo da expressão dos genes que codificam para a síntese de IL-7, IL-10, IL-15, fas ligante, perforina e granzima B (69). Neste estudo a análise simultânea de perforina, granzima B e fas ligante foi capaz de identificar rejeição aguda mesmo em órgãos com infiltrados leves, com sensibilidade e especificidade absolutas. Achados semelhantes foram descritos por Sharma e colaboradores que demonstraram a co-expressão intra-enxerto de duas vias citolíticas distintas, fas e fas ligante, granzima B e perforina, correlacionando positivamente o nível de RNAm dos genes que codificam para estas moléculas com a severidade histológica da rejeição aguda (95). Mais recentemente, estes autores mensuraram por PCR quantitativo o

RNA mensageiro das proteínas citotóxicas, perforina e granzima B, em células de urina, com o objetivo de testar um método adicional não invasivo para o diagnóstico de rejeição aguda. A transcrição do RNA mensageiro de ambas as moléculas estava significativamente aumentada nos enxertos com rejeição aguda em comparação aos enxertos sem esta condição (91). No Brasil, Netto e colaboradores obtiveram resultados semelhantes em amostras de aspirado renal e de sangue periférico (92) a exemplo do que fizeram previamente Vasconcellos e colaboradores que avaliaram a expressão gênica de perforina, granzima B e fas ligante em linfócitos, cotejando com a expressão dos mesmos a obtida a partir de material de biópsias pareadas dos enxertos renais. Foi encontrada correlação significativa entre a presença de transcritos destes genes no sangue e nas biópsias. Este estudo revelou também diferença significativa na expressão destes genes em material obtido a partir de linfócitos de sangue periférico em pacientes com e sem rejeição aguda (93).

Alguns estudos exploraram a hipótese de que a serpina proteinase inibidora-9 (PI-9) apresentaria maior expressão na rejeição aguda. A PI-9 é uma antagonista natural da granzima B e está expressa em altos níveis em linfócitos T citotóxicos sendo assim potencialmente útil na detecção dos eventos citodestrutivos (96-99).

Ding e colaboradores avaliando os níveis de CD103, um marcador de superfície de linfócitos citotóxicos, em células de urina, utilizando a técnica de PCR em tempo real demonstraram ser este gene um excelente preditor de rejeição aguda (100).

A descoberta recente de uma proteína denominada Tim-3 (*T cell immunoglobulin-mucin*) presente apenas na superfície de linfócitos com o fenótipo Th1, com função de inibir a resposta imune, poderá ter importantes

implicações no transplante de órgãos, no que se refere à investigação de processos imunes e a indução de tolerância imunológica (101-104). Renesto e colaboradores demonstraram que a molécula Tim-3 está expressa em células na urina de pacientes com rejeição aguda 428 vezes mais do que em pacientes sem esta condição, apresentando sensibilidade superior a 97% para o seu diagnóstico. De forma ainda mais interessante, a expressão de Tim-3 correlacionou com os critérios de Banff para rejeição aguda (105).

Estudos recentes mostram o papel de uma sub-população de linfócitos, chamados “reguladores de expressão” (*Treg cells*) na supressão da autoimunidade. Essas células expressam o fator de transcrição FOXP3 (*X-linked forkhead/winged helix transcription factor*). Células regulatórias apresentam fenótipo CD4+CD25+ e o FOXP3 é o marcador específico conhecido para essas células. No sangue humano 97,5% destas, expressam FOXP3. Em vista da especificidade do gene, ele tem sido proposto como marcador molecular de eventos imunológicos (106-108). O RNAm do gene tem sido identificado também em células urinárias, podendo oferecer um método não invasivo acurado na predição de rejeição aguda em transplantes renais (109, 110).

Outros genes têm sido avaliados em células urinárias, como a granulosa e a quimiocina proteína de indução de interferon (*interferon inducible protein - IP10*) (111-113). A primeira foi descrita como preditora de episódios de rejeição nos primeiros dias pós-transplante (111). Recentemente, investigações da expressão de IP10 revelaram não somente uma correlação do seu aumento em amostras de urina em casos de rejeição aguda do enxerto (112), como também a diferenciação de sua expressão nos primeiros dias pós

transplante e em casos de infecção urinária e infecção por citomegalovírus (113).

Na rejeição sub-clínica, dois estudos avaliaram a expressão molecular de genes envolvidos no ataque citolítico em biópsias renais de pacientes com rejeição sub-clínica. No primeiro, Lipman e colaboradores, usando técnica de PCR competitivo, observaram um aumento significativo na transcrição dos genes do receptor de célula T (cadeia beta), IFN- γ , IL-4, IL-15 e perforina nas biópsias de enxertos estáveis com rejeição sub-clínica, comparativamente a rins histologicamente normais. A expressão aumentada de IL-15 discriminou melhor rins normais daqueles com infiltrado limítrofe ou com rejeição sub-clínica. Analisando a função destes enxertos em 5 anos, observou-se que a expressão precoce de TCR cadeia β , IL-15, perforina e fas ligante em biópsia aos 3 meses pós-transplante se correlacionou positivamente com o nível de creatinina sérica (114). Em outro estudo, Aquino-Dias e colaboradores demonstraram que mesmo com técnicas menos sensíveis, como a PCR qualitativa, é possível evidenciar a expressão diferenciada dos genes que codificam para o ataque citolítico em enxertos renais com rejeição sub-clínica (115).

O presente trabalho foi conduzido para testar a hipótese de que é possível diagnosticar rejeição aguda em rins com disfunção inicial do enxerto, a partir da quantificação em urina e sangue periférico de genes marcadores ou envolvidos fisiopatologicamente no processo de rejeição aguda.

Referências Bibliográficas

1. Morris P. Results of renal transplantation. In: Morris P, editor. *Kidney Transplantation: Principles and Practice*. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2001.
2. Kuss R. *An illustrated history of organ transplantation: the great adventure of the century*; 1992.
3. Manfro R, Gonçalves, LFS. Transplante renal: imunologia e farmacologia das drogas imunossupressoras. In: Barros E, Manfro, RC, Thomé FS, Gonçalves, LFS e col., editor. *Nefrologia: Rotinas e diagnóstico*. 3^a ed. Porto Alegre: Artemed; 2006.
4. Cecka JM. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. *Clin Transpl* 1999;1-21.
5. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004;4(3):378-83.
6. Cosio FG, Pelletier RP, Falkenhain ME, Henry ML, Elkhammas EA, Davies EA, et al. Impact of acute rejection and early allograft function on renal allograft survival. *Transplantation* 1997;63(11):1611-5.
7. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant* 2004;4(8):1289-95.
8. Jordan SC, Quartel AW, Czer LS, Admon D, Chen G, Fishbein MC, et al. Posttransplant therapy using high-dose human immunoglobulin (intravenous gammaglobulin) to control acute humoral rejection in renal and

cardiac allograft recipients and potential mechanism of action. *Transplantation* 1998;66(6):800-5.

9. Suthanthiran M, Strom TB. Mechanisms and management of acute renal allograft rejection. *Surg Clin North Am* 1998;78(1):77-94.

10. Sorof JM, Vartanian RK, Olson JL, Tomlanovich SJ, Vincenti FG, Amend WJ. Histopathological concordance of paired renal allograft biopsy cores. Effect on the diagnosis and management of acute rejection. *Transplantation* 1995;60(11):1215-9.

11. Colvin RB, Cohen AH, Saiontz C, Bonsib S, Buick M, Burke B, et al. Evaluation of pathologic criteria for acute renal allograft rejection: reproducibility, sensitivity, and clinical correlation. *J Am Soc Nephrol* 1997;8(12):1930-41.

12. Aquino-Dias EC, Câmara NOS, Pacheco e Silva A, Manfro RC. Monitorização molecular da rejeição de transplantes renais. *J Bras Nefrol* 2005;27(2):76-83.

13. Hartono C, Dadhania D, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of acute rejection of solid organ transplants. *Front Biosci* 2004;9:145-53.

14. Eikmans M, Baelde HJ, de Heer E, Bruijn JA. Messenger RNA assessment in clinical nephrology: perspectives and progress of methodology. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20(12):2598-601.

15. Coelho V, Caldas C, Kalil J. Imunobiologia do transplante renal. In: Manfro RC, Noronha I, Pacheco e Silva A, editors. *Manual de Transplante renal*. 1 ed. São Paulo: Manole; 2004.

16. Gonçalves LFS, Manfro RC, Veronese FJ, Ribeiro AR. Aspectos clínicos, rotinas e complicações do transplante renal. In: Barros E,

Manfro, RC, Thomé FS, Gonçalves, LF e col., editor. Nefrologia: Rotinas e diagnóstico. 3 ed ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 2006. p. 455- 485.

17. Dalman M. Immunology of rejection. In: Morris P, editor. *Kidney Transplantation: Principles and Practice*. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2001.

18. Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function and diversity of I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* 1990;59:253-258.

19. Sayegh MH, Turka LA. T cell costimulatory pathways: promising novel targets for immunosuppression and tolerance induction. *J Am Soc Nephrol* 1995;6(4):1143-50.

20. Walsh PT, Strom TB, Turka LA. Routes to transplant tolerance versus rejection; the role of cytokines. *Immunity* 2004;20(2):121-31.

21. Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. *N Engl J Med* 1994;331:365- 376.

22. Carpio VN, Aquino-Dias EC, Prochnow TA, Manfro RC, Gonçalves LF. Evaluation of apoptosis in peripheral blood lymphocytes of renal transplant patients. *Transplant Proc* 2006;38(6):1898-900.

23. Haas M, Rahman MH, Racusen LC, Kraus ES, Bagnasco SM, Segev DL, et al. C4d and C3d staining in biopsies of ABO- and HLA-incompatible renal allografts: correlation with histologic findings. *Am J Transplant* 2006;6(8):1829-40.

24. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003;3(6):708-14.

25. Pescovitz M. B cells: a rational target in alloantibody-mediated solid organ transplantation rejection. *Clin Transplant* 2005;20(1):48- 54.
26. Mota A. Acute rejection in cadaveric renal transplantation under cyclosporine based therapy. Analysis of the risk factors and its influence on chronic dysfunction. *Acta Med Port* 2004;17(1):8-14.
27. Rush DN, Jeffery JR, Gough J. Sequential protocol biopsies in renal transplant patients. Clinico-pathological correlations using the Banff schema. *Transplantation* 1995;59(4):511-4.
28. Evans C, Cochlin DL, Ferguson C, Griffin PJ, Salaman JR. Duplex Doppler studies in acute renal transplant rejection. *Transplant Proc* 1989;21(1 Pt 2):1897-8.
29. Bellomo R, Farmer M, Wong C, Boyce N. A prospective study of technetium-99m-diethylenetriamine pentaacetic acid renal allograft scintigraphy in the diagnostic evaluation of graft dysfunction. *Transplantation* 1993;56(6):1585-8.
30. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004;364(9447):1814-27.
31. Szwarc I, Garrigue V, Delmas S, Deleuze S, Chong G, Mourad G. Delayed graft function: a frequent but still unsolved problem in renal transplantation. *Nephrol Ther* 2005;1(6):325-34.
32. Azevedo LS, Castro MC, Monteiro de Carvalho DB, d'Avila DO, Contieri F, Goncalves RT, et al. Incidence of delayed graft function in cadaveric kidney transplants in Brazil: a multicenter analysis. *Transplant Proc* 2005;37(6):2746-7.

33. Pfaff WW, Howard RJ, Patton PR, Adams VR, Rosen CB, Reed AI. Delayed graft function after renal transplantation. *Transplantation* 1998;65(2):219-23.
34. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997;63(7):968-74.
35. Chapman J, Bock A, Dussol B, Fritsche L, Kliem V, Lebranchu Y, et al. Follow-up after renal transplantation with organs from donors after cardiac death. *Transpl Int* 2006;19(9):715-9.
36. Johnston O, O'Kelly P, Spencer S, Donohoe J, Walshe JJ, Little DM, et al. Reduced graft function (with or without dialysis) vs immediate graft function: a comparison of long-term renal allograft survival. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21(8):2270-4.
37. Lebranchu Y, Halimi JM, Bock A, Chapman J, Dussol B, Fritsche L, et al. Delayed graft function: risk factors, consequences and parameters affecting outcome-results from MOST, A Multinational Observational Study. *Transplant Proc* 2005;37(1):345-7.
38. Boletis J, Balitsari A, Filiopoulos V, Stamataki E, Lionaki S, Zavos G, et al. Delayed renal graft function: the influence of immunosuppression. *Transplant Proc* 2005;37(5):2054-9.
39. Park JH, Yang CW, Kim YS, Lee SH, Choi YJ, Moon IS, et al. Comparisons of clinicopathological correlations between immediate and slow graft function in renal transplant recipients. *Clin Transplant* 2002;16 Suppl 8:18-23.

40. Brennan TV, Freise CE, Fuller TF, Bostrom A, Tomlanovich SJ, Feng S. Early graft function after living donor kidney transplantation predicts rejection but not outcomes. *Am J Transplant* 2004;4(6):971-9.
41. Rodrigo E, Ruiz JC, Pinera C, Fernandez-Fresnedo G, Escallada R, Palomar R, et al. Creatinine reduction ratio on post-transplant day two as criterion in defining delayed graft function. *Am J Transplant* 2004;4(7):1163-9.
42. Koning OH, Ploeg RJ, van Bockel JH, Groenewegen M, van der Woude FJ, Persijn GG, et al. Risk factors for delayed graft function in cadaveric kidney transplantation: a prospective study of renal function and graft survival after preservation with University of Wisconsin solution in multi-organ donors. European Multicenter Study Group. *Transplantation* 1997;63(11):1620-8.
43. Siddiqi N, McBride MA, Hariharan S. Similar risk profiles for post-transplant renal dysfunction and long-term graft failure: UNOS/OPTN database analysis. *Kidney Int* 2004;65(5):1906-13.
44. Daly PJ, Power RE, Healy DA, Hickey DP, Fitzpatrick JM, Watson RW. Delayed graft function: a dilemma in renal transplantation. *BJU Int* 2005;96(4):498-501.
45. Quiroga I, McShane P, Koo DD, Gray D, Friend PJ, Fuggle S, et al. Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21(6):1689-96.
46. Peeters P, Terryn W, Vanholder R, Lameire N. Delayed graft function in renal transplantation. *Curr Opin Crit Care* 2004;10(6):489-98.

47. Sandrini S. Use of IL-2 receptor antagonists to reduce delayed graft function following renal transplantation: a review. *Clin Transplant* 2005;19(6):705-10.
48. Manfro RC, Veronese FJ. Manejo perioperatório e pós-operatório. In: Manfro RC, Noronha IL, Pacheco e Silva F^o A, editors. *Manual do Transplante Renal*. 1^a ed. São Paulo: Manole Ltda; 2006.
49. Hayry P, von Willebrand E, Lautenschlager I, Taskinen E, Krogerus L. Diagnosis of rejection: role of fine-needle aspiration biopsy. *Transplant Proc* 1990;22(6):2597-600.
50. Gonçalves LF, Manfro R, Rauber L, Edelweiss M, Prompt C. Evaluation of fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis of acute renal transplant dysfunction. *Transplant Proc* 1992;24(6):3083-4.
51. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993;44(2):411-22.
52. Solez K, Benediktsson H, Cavallo T, Croker B, Demetris AJ, Drachenberg C, et al. Report of the Third Banff Conference on Allograft Pathology (July 20-24, 1995) on classification and lesion scoring in renal allograft pathology. *Transplant Proc* 1996;28(1):441-4.
53. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999;55(2):713-23.
54. Racusen LC, Halloran PF, Solez K. Banff 2003 meeting report: new diagnostic insights and standards. *Am J Transplant* 2004;4(10):1562-6.

55. Racusen LC, Solez K, Olsen S. The pathology of kidney transplantation. In: Racusen LC, Solez K, Burdick JF, editors. *Kidney Transplant Rejection*. New York: Marcel Dekker, inc; 1998. p. 383- 418.
56. Veronese FV, Goncalves LF, Edelweiss MI, Manfro RC. Interpretation of surveillance kidney allograft biopsies according to the Banff criteria. *Transplant Proc* 1999;31(7):3019-20.
57. Seron D, Diaz-Gallo C, Grino JM, Castela AM, Carrera M, Bover J, et al. Characterization of interstitial infiltrate in early renal allograft biopsies in patients with stable renal function. *Transplant Proc* 1991;23(1 Pt 2):1267-9.
58. Rush D, Nickerson P, Gough J, McKenna R, Grimm P, Cheang M, et al. Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(11):2129-34.
59. Nickerson P, Jeffery J, Gough J, Grimm P, McKenna R, Birk P, et al. Effect of increasing baseline immunosuppression on the prevalence of clinical and subclinical rejection: a pilot study. *J Am Soc Nephrol* 1999;10(8):1801-5.
60. Kirk AD, Jacobson LM, Heisey DM, Radke NF, Pirsch JD, Sollinger HW. Clinically stable human renal allografts contain histological and RNA-based findings that correlate with deteriorating graft function. *Transplantation* 1999;68(10):1578-82.
61. Seron D, Moreso F, Bover J, Condom E, Gil-Vernet S, Canas C, et al. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 1997;51(1):310-6.

62. Rush DN, Henry SF, Jeffery JR, Schroeder TJ, Gough J. Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. *Transplantation* 1994;57(2):208-11.
63. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. *Transplantation* 2004;78(2):242-9.
64. Aragão ES, Moura LA. Anatomia patológica do transplante renal. In: Manfro RC, Noronha IL, A. PeSF, editors. *Manual do Transplante Renal*. 1ª ed. São Paulo: Manole Ltda; 2004.
65. Tilney NL, Whitley WD, Diamond JR, Kupiec-Weglinski JW, Adams DH. Chronic rejection--an undefined conundrum. *Transplantation* 1991;52(3):389-98.
66. Tullius SG, Tilney NL. Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection. *Transplantation* 1995;59(3):313-8.
67. Sambrook J, Fritsch EI, Maniats T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2ª ed. Cold Spring Harbor: NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
68. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. *Recombinant DNA*. 2nd ed. New York: Scientific American Books: W.H. Freeman and Company; 1992.
69. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L, Harmon W, et al. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(2):695-700.

70. Lipman ML, Stevens AC, Strom TB. Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts. *J Immunol* 1994;152(10):5120-7.
71. Grimm PC, McKenna R, Nickerson P, Russell ME, Gough J, Gospodarek E, et al. Clinical rejection is distinguished from subclinical rejection by increased infiltration by a population of activated macrophages. *J Am Soc Nephrol* 1999;10(7):1582-9.
72. Sabek O, Dorak MT, Kotb M, Gaber AO, Gaber L. Quantitative detection of T-cell activation markers by real-time PCR in renal transplant rejection and correlation with histopathologic evaluation. *Transplantation* 2002;74(5):701-7.
73. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)* 2005;109(4):365-79.
74. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27(2-3):95-125.
75. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992;10(4):413-7.
76. Dorak MT. Real Time PCR. In; [2004]: Disponível em: <http://home.att.net/~dorak/genetics/realtime.html>.
77. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25(2):169-93.

78. Schmid H, Cohen CD, Henger A, Schlondorff D, Kretzler M. Gene expression analysis in renal biopsies. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(6):1347-51.
79. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005;6(4):279-84.
80. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
81. Akalin E, Hendrix RC, Polavarapu RG, Pearson TC, Neylan JF, Larsen CP, et al. Gene expression analysis in human renal allograft biopsy samples using high-density oligoarray technology. *Transplantation* 2001;72(5):948-53.
82. Freeman WM, Robertson DJ, Vrana KE. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques* 2000;29(5):1042-6, 1048-55.
83. Chua MS, Barry C, Chen X, Salvatierra O, Sarwal MM. Molecular profiling of anemia in acute renal allograft rejection using DNA microarrays. *Am J Transplant* 2003;3(1):17-22.
84. Stegall M, Park W, Kim D, Kremers W. Gene expression during acute allograft rejection: novel statistical analysis of microarray data. *Am J Transplant* 2002;2(10):913-25.
85. Zhang HQ, Lu H, Enosawa S, Takahara S, Sakamoto K, Nakajima T, et al. Microarray analysis of gene expression in peripheral blood mononuclear cells derived from long-surviving renal recipients. *Transplant Proc* 2002;34(5):1757-9.

86. Scherer A, Krause A, Walker JR, Korn A, Niese D, Raulf F. Early prognosis of the development of renal chronic allograft rejection by gene expression profiling of human protocol biopsies. *Transplantation* 2003;75(8):1323-30.
87. Donauer J, Rumberger B, Klein M, Faller D, Wilpert J, Sparna T, et al. Expression profiling on chronically rejected transplant kidneys. *Transplantation* 2003;76(3):539-47.
88. Chua MS, Mansfield E, Sarwal M. Applications of microarrays to renal transplantation: progress and possibilities. *Front Biosci* 2003;8:s913-23.
89. Sarwal M, Chua MS, Kambham N, Hsieh SC, Satterwhite T, Masek M, et al. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med* 2003;349(2):125-38.
90. Pavlakis M, Lipman M, Strom TB. Intragraft expression of T-cell activation genes in human renal allograft rejection. *Kidney Int Suppl* 1996;53:S7-12.
91. Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, et al. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* 2001;344(13):947-54.
92. Netto MV, Fonseca BA, Dantas M, Saber LT, Castro MC, Ferraz AS. Granzyme B, FAS-ligand and perforin expression during acute cellular rejection episodes after kidney transplantation: comparison between blood and renal aspirates. *Transplant Proc* 2002;34(2):476-8.
93. Vasconcellos LM, Schachter AD, Zheng XX, Vasconcellos LH, Shapiro M, Harmon WE, et al. Cytotoxic lymphocyte gene expression in

peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation* 1998;66(5):562-6.

94. Strom TB, Tilney NL, Paradysz JM, Bancewicz J, Carpenter CB. Cellular components of allograft rejection: identity, specificity, and cytotoxic function of cells infiltrating acutely rejecting allografts. *J Immunol* 1977;118(6):2020-6.

95. Sharma VK, Bologa RM, Li B, Xu GP, Lagman M, Hiscock W, et al. Molecular executors of cell death--differential intrarenal expression of Fas ligand, Fas, granzyme B, and perforin during acute and/or chronic rejection of human renal allografts. *Transplantation* 1996;62(12):1860-6.

96. Bladergroen BA, Strik MC, Bovenschen N, van Berkum O, Scheffer GL, Meijer CJ, et al. The granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, is mainly expressed by dendritic cells and at immune-privileged sites. *J Immunol* 2001;166(5):3218-25.

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

98. Bird CH, Sutton VR, Sun J, Hirst CE, Novak A, Kumar S, et al. Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. *Mol Cell Biol* 1998;18(11):6387-98.

99. Rowshani AT, Florquin S, Bemelman F, Kummer JA, Hack CE, Ten Berge IJ. Hyperexpression of the granzyme B inhibitor PI-9 in human renal allografts: a potential mechanism for stable renal function in patients with subclinical rejection. *Kidney Int* 2004;66(4):1417-22.

100. Ding R, Li B, Muthukumar T, Dadhania D, Medeiros M, Hartono C, et al. CD103 mRNA levels in urinary cells predict acute rejection of renal allografts. *Transplantation* 2003;75(8):1307-12.
101. Sabatos CA, Chakravarti S, Cha E, Schubart A, Sanchez-Fueyo A, Zheng XX, et al. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat Immunol* 2003;4(11):1102-10.
102. Sanchez-Fueyo A, Tian J, Picarella D, Domenig C, Zheng XX, Sabatos CA, et al. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat Immunol* 2003;4(11):1093-101.
103. Meyers JH, Sabatos CA, Chakravarti S, Kuchroo VK. The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases. *Trends Mol Med* 2005;11(8):362-9.
104. Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 2002;415(6871):536-41.
105. Renesto PG. Tim-3 mRNA in urinary cells is highly expressed in acute rejection in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2004;4 (suppl. 8) [ABSTRACT] 247.
106. Sanchez-Fueyo A, Sandner S, Habicht A, Mariat C, Kenny J, Degauque N, et al. Specificity of CD4+CD25+ regulatory T cell function in alloimmunity. *J Immunol* 2006;176(1):329-34.

107. Sakaguchi S, Setoguchi R, Yagi H, Nomura T. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;305:51-66.
108. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006;212:8-27.
109. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 2005;353(22):2342-51.
110. Strehlau J, Podolskaya A, Ehrlich J. Urinary FOXP3 messenger RNA and renal-allograft rejection. *N Engl J Med* 2006;354(21):2291-3; author reply 2291-3.
111. Kotsch K, Mashreghi MF, Bold G, Tretow P, Beyer J, Matz M, et al. Enhanced granulysin mRNA expression in urinary sediment in early and delayed acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2004;77(12):1866-75.
112. Tatapudi RR, Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Li B, Sharma VK, et al. Noninvasive detection of renal allograft inflammation by measurements of mRNA for IP-10 and CXCR3 in urine. *Kidney Int* 2004;65(6):2390-7.
113. Matz M, Beyer J, Wunsch D, Mashreghi MF, Seiler M, Pratschke J, et al. Early post-transplant urinary IP-10 expression after kidney transplantation is predictive of short- and long-term graft function. *Kidney Int* 2006;69(9):1683-90.
114. Lipman ML, Shen Y, Jeffery JR, Gough J, McKenna RM, Grimm PC, et al. Immune-activation gene expression in clinically stable renal

allograft biopsies: molecular evidence for subclinical rejection. *Transplantation* 1998;66(12):1673-81.

115. Aquino-Dias EC, Veronese FJ, Santos Goncalves LF, Manfro RC. Molecular markers in subclinical acute rejection of renal transplants. *Clin Transplant* 2004;18(3):281-7.

II. OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Avaliar a expressão de marcadores moleculares de rejeição aguda em biópsias de vigilância, sangue periférico e urina de pacientes transplantados renais com disfunção inicial do enxerto.

Objetivos específicos

- Analisar quantitativamente a expressão dos genes perforina, granzima B, Fas-ligante, PI-9 e FOXP3 em biópsias de vigilância, leucócitos periféricos e em células urinárias de pacientes transplantados renais com disfunção inicial do enxerto.

- Avaliar a utilidade diagnóstica da expressão dos genes estudados no diagnóstico não invasivo de rejeição aguda em pacientes com disfunção inicial do enxerto.

III. Avaliação molecular de transplantes renais com disfunção inicial do enxerto. Utilidade diagnóstica da quantificação dos genes de moléculas citolíticas, PI-9 e FOXP3 em sangue periférico e em células urinárias.

Esther Cristina Aquino Dias¹, Gabriel Joelsons², Daniel Melquiades da Silva², Roberto Herz Berdichewski², Adriana Reginato Ribeiro², Roberto Ceratti Manfro^{1,2}

¹ Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

²Serviço de Nefrologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre RS. Brasil.

Autor para correspondência:

Dr. Roberto Ceratti Manfro

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Serviço de Nefrologia

Ramiro Barcelos, 2350, sala 2030

Porto Alegre, RS, Brasil. 90035-003

E-mail: rmanfro@hcpa.ufrgs.br

Fax: 51 21018121

Título resumido: Avaliação molecular em sangue e urina de transplantados renais.

Formatado de acordo com as instruções do periódico *Kidney International*

Avaliação molecular de transplantes renais com disfunção inicial do enxerto. Utilidade diagnóstica da quantificação dos genes de moléculas citolíticas, PI-9 e FOXP3 em sangue periférico e em células urinárias.

Resumo

A disfunção inicial do enxerto (DIE) ocorre com elevada frequência em receptores de rins de doadores falecidos, impactando negativamente nas sobrevidas de pacientes e enxertos. Nesta situação o diagnóstico de rejeição aguda (RA) depende de biópsias renais de vigilância. No presente estudo avaliamos a expressão dos genes das moléculas citolíticas perforina (Per), granzima B (GzB), fas ligante (fasL), o da serpina proteinase inibidora 9 (PI-9) e o do fator de transcrição FOXP3 em tecido renal de biópsias de vigilância, sangue periférico e em células urinárias de pacientes transplantados renais com DIE, objetivando o desenvolvimento de métodos não invasivos para o diagnóstico da RA.

Quarenta e oito biópsias de vigilância foram obtidas de trinta e cinco pacientes com DIE. Amostras de sangue periférico e de urina foram coletadas imediatamente antes das biópsias. A classificação de Banff foi utilizada para os diagnósticos de RA (n=20) e necrose tubular aguda (NTA, n= 28). Três grupos controles com diferentes diagnósticos histopatológicos também foram avaliados. Utilizou-se a técnica de quantificação relativa por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-TR). Curvas ROC foram geradas para encontrarem-se os melhores pontos de corte para o diagnóstico da RA.

A expressão em tecido, sangue e células urinárias foi sempre maior em pacientes com RA do que nas amostras com necrose tubular aguda, para todos os genes analisados ($p < 0,05$). Da mesma forma as quantificações foram

maiores nas amostras com RA do que nas amostras obtidas nos grupos-controles. Correlações da expressão dos genes nos diferentes compartimentos foram observadas ($P < 0,001$). Os parâmetros diagnósticos produzidos pela análise do gene FOXP3 foram os mais precisos, apresentando respectivamente para sangue periférico e urina: sensibilidade (94 e 100%); especificidade (95 e 100%); valor preditivo positivo (94 e 100%); valor preditivo negativo (95 e 100%) e acurácia (95 e 100%).

Concluimos que a análise da expressão dos genes em sangue e urina de pacientes transplantados renais com DIE pode auxiliar, com elevada acurácia, o diagnóstico de RA de pacientes transplantados renais.

Palavras-chave: transplante renal, perforina, granzima B, fas ligante, PI-9, FOXP3, disfunção inicial do enxerto, rejeição aguda.

Introdução

Apesar de sua incidência declinante nos últimos anos a rejeição aguda ainda é um problema relevante na prática dos transplantes renais (1, 2). Em determinados contextos sua incidência é elevada e seu diagnóstico mais difícil. Este é o caso na disfunção inicial do enxerto (DIE) que freqüentemente ocorre nos primeiros dias ou semanas após o transplante renal, em especial com órgãos de doadores falecidos, impactando negativamente nas sobrevidas dos enxertos e dos pacientes (3-6). A DIE é habitualmente conceituada pela necessidade de diálise na primeira semana pós-transplante. Na sua vigência não se pode valorizar o aumento da creatinina sérica como um indicio de rejeição aguda. Durante a DIE o diagnóstico da rejeição aguda baseia-se na análise histológica de fragmentos do enxerto levando à necessidade de realização de biópsias de vigilância (7). A biópsia renal, apesar de rotineira em pacientes transplantados, é um procedimento trabalhoso, caro, sujeito a complicações, que são infreqüentes, mas que podem ser significativas. Além disso, ela está sujeita a erros de amostragem principalmente devido a natureza focal do processo de rejeição (8, 9).

Na década passada a aplicação de técnicas de mensuração do RNA como a reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), precedida da transcrição reversa, proporcionou novas oportunidades ao desenvolvimento de ferramentas diagnósticas mais sensíveis, pela análise da expressão de genes associados às rejeições aguda e crônica expressos no tecido renal e em sangue periférico (10-13). Genes que participam do ataque citolítico ao enxerto e envolvidos nos principais mecanismos de morte celular por apoptose, como a perforina (Per) e a granzima B (GzB) e o fas-ligante (fasL) foram estudados como marcadores

diagnósticos não invasivos de rejeição aguda e para o melhor entendimento dos processos de rejeição aguda e rejeição aguda sub-clínica (13, 14).

O desenvolvimento da tecnologia da reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-TR) contribuiu para a precisão nas análises de RNA mensageiro (RNAm) e para a avaliação da expressão e quantificação dos genes envolvidos na rejeição dos transplantes. Desde então, uma variedade de novos possíveis marcadores moleculares de episódios de rejeição e sua correlação com os achados histopatológicos têm sido estudados (15-18). Entre eles a serpina proteinase inibidora-9 (PI-9), um antagonista natural da granzima B, cujos níveis de expressão nos linfócitos T citotóxicos, quando elevados, sugerem a possibilidade de rejeição aguda (19, 20). A hiper-expressão desta molécula em aloenxertos renais foi também descrita utilizando-se a técnica de imunohistoquímica (21). Recentemente o fator de transcrição denominado FOXP3 (*X-linked forkhead/winged helix transcription factor*), expresso apenas nas células T regulatórias de fenótipo CD4+/CD25+, foi demonstrado ser um marcador acurado da rejeição aguda, pela quantificação em células urinárias, além de ser um preditor da reversibilidade da rejeição após seu tratamento com corticosteróides (22).

É estimulante a possibilidade de que o uso destas técnicas em sangue periférico e em células urinárias, em pacientes com DIE, possibilite que se abdique da necessidade das biópsias de vigilância. O presente estudo foi conduzido para testar a hipótese de que é possível diagnosticar rejeição aguda em rins com DIE, a partir da quantificação em urina e/ou em sangue periférico de genes que sirvam como marcadores ou que estejam envolvidos fisiopatologicamente no processo da rejeição aguda de aloenxertos renais.

Resultados

Trinta e cinco pacientes com DIE e 30 controles foram incluídos no estudo. Os principais dados demográficos dos grupos em estudo e controles estão apresentados na Tabela 1. A amostragem foi constituída predominantemente por materiais biológicos obtidos de transplantes com órgãos de doadores falecidos e em todos os grupos houve maior proporção de homens. Não foram observadas diferenças com significância estatística nas comparações das idades e nas distribuições por sexo e tipo de doador entre os grupos. (ANOVA, Teste de Dunnett, $p > 0,05$). Não houve diferenças estatisticamente significativas nos intervalos de tempo entre o transplante e o momento da biópsia do grupo de pacientes com necrose tubular aguda (NTA) e do grupo controle com biópsias consideradas normais (NOR), quando comparados ao grupo com diagnóstico histopatológico de rejeição aguda (RA) (ANOVA, Teste de Dunnett, $p > 0,05$). As médias dos intervalos de tempo no grupo com nefrotoxicidade por inibidores da calcineurina (NIC) e no grupo com nefropatia crônica do enxerto (NCE) foram significativamente superiores quando comparadas ao grupo RA (ANOVA, teste de Dunnett, $p < 0,001$). As médias dos intervalos de tempo pós-transplante de pacientes do grupo NOR foram significativamente menores que as do grupo NIC ($P = 0,015$) e do grupo NCE ($P < 0,001$). (Tabela 1).

Quarenta e oito biópsias de vigilância foram coletadas de trinta e cinco pacientes em DIE, das quais vinte apresentaram diagnóstico histopatológico de RA e vinte e oito de NTA. No grupo de pacientes em estudo, durante a fase de DIE, não houve diferença significativa nas médias das creatininas sanguíneas dos pacientes com RA, comparados aos pacientes com diagnóstico histopatológico de NTA ($5,32 \pm 3,36$ versus $5,96 \pm 2,01$ mg/dL respectivamente;

$p=0,784$). As creatininas nos grupos controle foram: NIC: $3,08\pm 1,16$ mg/dL; NCE, $4,65\pm 1,95$ mg/dL e NOR: $1,69\pm 0,40$ mg/dL. O grupo controle NOR apresentou média de creatininemia menor que a encontrada nos grupos RA ($p<0,001$), NTA ($p<0,001$) e NCE ($p=0,014$). Não foi observada significância estatística na comparação das médias das creatininas sanguíneas dos grupos NOR e NIC ($p=0,625$).

Nas figuras 1 e 2 estão representados os níveis de expressão dos genes em tecido renal, sangue periférico e células urinárias dos genes perforina, granzima B e fas-ligante (Figura 1) e dos genes PI-9 e FoxP3, respectivamente, (Figura 2). Para a totalidade dos genes analisados, durante a fase da DIE, observaram-se quantidades significativamente maiores dos transcritos na situação da rejeição aguda comparada à necrose tubular aguda, tendo isto sido observado no tecido renal, células sanguíneas e células urinárias. Da mesma forma, nos mesmos compartimentos, as quantidades normalizadas dos genes em estudo foram significativamente maiores nas amostras de pacientes com DIE e rejeição aguda do que nos grupos controles, exceto na comparação da quantificação do gene PI-9, na qual a quantidade observada na RA não diferiu significativamente da observada na NIC (Figuras 1 e 2).

Na tabela 2 estão mostrados os coeficientes de correlação de Spearman obtidos nas avaliações das correlações entre as quantidades dos genes nos diferentes compartimentos. Correlações fortes e significativas foram observadas entre as quantificações em tecido, sangue e urina para todos os genes analisados. Embora todas as correlações tenham alcançado elevada significância estatística as correlações observadas para o gene FOXP3 foram as mais robustas com valor dos coeficientes de correlação de 0,95 ou superiores.

Nas tabelas 3 e 4, respectivamente para as avaliações no sangue periférico e nas células urinárias, estão apresentadas as áreas sob as curvas, pontos de corte e os parâmetros diagnósticos para rejeição aguda, obtidos a partir das análises das curvas ROC. No sangue periférico todos os genes apresentaram bom desempenho diagnóstico tendo a análise do FOXP3 apresentado acurácia superior a dos demais genes estudados. Na análise dos parâmetros diagnósticos derivados da quantificação em células urinárias o gene FOXP3 apresentou acurácia absoluta, já o gene PI-9 apresentou desempenho mais baixo, devido principalmente a sua baixa especificidade e valor preditivo positivo.

Discussão

A rejeição aguda é um evento de impacto significativo na sobrevida de enxertos renais em curto e longo prazo. É do conhecimento comum, a partir da experiência acumulada, que as rejeições devem ser diagnosticadas e tratadas precocemente, sob pena de perda dos enxertos em elevada proporção dos casos. Além deste risco imediato a sua ocorrência é preditora do desenvolvimento de rejeição crônica, sabidamente um evento que reduz significativamente a sobrevida dos rins transplantados (2, 23). Estas considerações são ainda mais importantes quando na vigência da DIE, pois na ausência do parâmetro funcional proporcionado pela creatinina sanguínea o diagnóstico da rejeição aguda torna-se mais difícil, sendo em geral feito mais tardiamente, em função da impossibilidade de biopsiar-se os enxertos disfuncionados com muita frequência. Ademais, a DIE é um fator de risco significativo para o desenvolvimento de rejeição aguda e perda do enxerto renal (3, 24).

Presentemente, no contexto da DIE, o diagnóstico das rejeições é feito pela análise histológica de tecido renal obtido em biópsias de vigilância. Biópsias de enxertos renais são consideradas o padrão-ouro para o diagnóstico de rejeição aguda, no entanto, o procedimento é caro, passível de complicações, e de erros de amostragem não podendo ser repetido com muita frequência (8, 9). Assim sendo é desejável que se desenvolvam métodos menos invasivos e com sensibilidade e especificidade adequadas para o diagnóstico seguro da rejeição aguda, principalmente em situações de maior risco como a disfunção inicial do enxerto.

Em estudos prévios foram demonstradas, em pacientes com rejeição aguda de enxertos renais, quantidades aumentadas de transcritos de genes que codificam moléculas com atividade citotóxica em tecido renal (10, 11). Nestes estudos, as moléculas mais comumente avaliadas foram a perforina, granzima B e fas-ligante embora outros genes tais como interleucina 2, interleucina 4 e TIA-1 também tenham sido avaliados (10, 11). Posteriormente demonstrou-se quantidades aumentadas destes transcritos em células do sangue periférico (12) e em células urinárias (25). De uma maneira geral as avaliações dos parâmetros de acurácia diagnóstica foram considerados adequados. No entanto, possivelmente devido à natureza artesanal e às dificuldades de reprodutibilidade da técnica da PCR competitiva elas acabaram por não chegar à aplicabilidade clínica.

A melhor padronização e reprodutibilidade propiciados pelo método da reação em cadeia da polimerase em tempo real constituiu-se em avanço significativo na análise quantitativa de genes envolvidos na rejeição aguda dos enxertos renais podendo auxiliar na monitorização de eventos inflamatórios intra-enxerto e sendo útil na detecção da rejeição aguda (15, 17, 26), em

antecipar o seu diagnóstico (20, 27), em prever a resposta ao tratamento (18) e em diferenciá-la da infecção urinária (28). No entanto, até o presente momento, a utilidade deste método não foi avaliada adequadamente durante a disfunção inicial do enxerto, situação na qual um método não invasivo de acurácia adequada seria altamente desejável.

Neste estudo avaliou-se quantitativamente em leucócitos do sangue periférico e células urinárias, de pacientes transplantados renais com DIE, a expressão dos genes que codificam para moléculas citotóxicas (perforina, granzima B e fas ligante), bem como a expressão da PI-9 (serpina protease inibidora 9), um antagonista natural da granzima B e do fator de transcrição FOXP3 (*X-linked forkhead/winged helix transcription factor*). Testamos a hipótese de que no contexto clínico da DIE seria possível evidenciar, por meio da quantificação dos genes estudados em leucócitos periféricos e em células urinárias, a presença de rejeição aguda superimposta à necrose tubular aguda pós-transplante renal.

A exemplo do demonstrado em estudos prévios, em pacientes sem DIE, encontramos que a análise do RNAm de genes que codificam para moléculas de ataque citolítico apresenta expressão aumentada na rejeição aguda que ocorre durante a fase de DIE. Estes achados foram evidentes no tecido renal, no sangue periférico e nas células urinárias (figuras 1 e 2). Na avaliação do sangue periférico a análise dos parâmetros diagnósticos obtidos a partir dos pontos de corte de melhor desempenho em curvas ROC mostrou que todos os genes produzem parâmetros diagnósticos satisfatórios, com elevada sensibilidade e valor preditivo negativo. No entanto, a quantificação do FOXP3 foi a que produziu os resultados de melhor acurácia, por ter melhor especificidade e valor preditivo positivo.

Dresske e colaboradores, avaliando a expressão de FOXP3, evidenciaram aumento de células T CD4+/CD25+ no sangue periférico de pacientes transplantados renais após a suspensão de imunossupressão por 72 horas, concluindo que essa interrupção na imunossupressão se correlaciona à indução de mecanismos imunológicos regulatórios e permite a minimização do tratamento imunossupressor de forma precoce e segura (29). A avaliação das quantidades de RNAm em sangue periférico de pacientes transplantados renais, se adequadamente validada em outros estudos como uma ferramenta diagnóstica para a rejeição aguda, poderá ser de grande utilidade uma vez que não depende da produção de urina pelo enxerto. Vasconcellos e colaboradores em estudo prévio, utilizando PCR competitivo, uma técnica mais trabalhosa e possivelmente menos reprodutível de quantificação, demonstraram que a avaliação molecular em sangue periférico pode produzir parâmetros diagnósticos adequados para a rejeição aguda (12).

As avaliações na urina são atraentes por produzirem uma amostragem do enxerto e por serem não invasivas. No entanto elas dependem da sua produção de urina pelo enxerto o que pode ser uma limitação na vigência de necrose tubular aguda anúrica. Outra dificuldade é a possibilidade de análise de urina produzida pelos rins nativos e não pelo enxerto. Apesar disso, excetuada a situação de pacientes anúricos, o que neste estudo limitou a amostragem em aproximadamente 80%, encontramos que os parâmetros diagnosticados a partir dos pontos de corte nas curvas ROC foram bastante satisfatórios. Nas avaliações das quantidades de RNAm em células urinárias resultaram em parâmetros diagnósticos semelhantes aos encontrados na avaliação do sangue periférico. Interessantemente, a análise das quantidades de FOXP3 permitiram, neste compartimento, acurácia diagnóstica perfeita. Na análise deste gene,

nossos dados em pacientes com DIE, comparam-se aos descritos em recente estudo elaborado por Muthukumar e colaboradores, onde os níveis de FOXP3 e perforina em células urinárias foram, significativamente, maiores em pacientes com RA, quando comparados aos grupos com diagnósticos histológicos de nefropatia crônica do enxerto e transplantes com função estável (22).

Nos dois compartimentos, sangue e urina, as quantificações moleculares permitiram a diferenciação da rejeição aguda de outras situações clínicas. Tais diferenciações já haviam sido evidenciadas em células urinárias em outros estudos (20, 22, 27, 30, 31). No entanto, apenas dois estudos prévios reportaram a avaliação dos transcritos de genes na DIE, e ainda assim o fizeram em número restrito de pacientes. Li e colaboradores, usando o método de PCR competitivo, observaram que em nove de onze pacientes com DIE, o nível de expressão de perforina e de granzima B foi significativamente maior nos pacientes com rejeição aguda (25). Yannaraki e colaboradores, usando a técnica de PCR em tempo renal, avaliaram cinco pacientes em DIE e reportaram que nestes as quantidades detectadas perforina, granzima B e fas-ligante também apresentaram-se aumentados nos pacientes com rejeição aguda (32).

O RNA mensageiro de outros genes tem sido avaliado com o objetivo de diagnóstico da rejeição aguda. Os elevados níveis urinários do RNAm de CD103, um marcador de superfície de linfócitos citotóxicos CD8, foram descritos por Ding e colaboradores (27). Da mesma forma a expressão de granulosa em células urinárias apresentou forte valor preditivo de episódios de rejeição nos primeiros dias pós-transplante (17). Recentemente, investigações da expressão da chemoquina proteína de indução de interferon (*interferon inducible protein* - IP10) revelaram não somente uma correlação do

seu aumento em amostras de urina em casos de rejeição aguda do enxerto, como também a diferenciação de sua expressão nos primeiros dias pós transplante e em casos de infecção urinária e infecção por citomegalovírus (31). As avaliações dos genes da interleucina 4 e do fator de necrose tumoral α , em sangue periférico, demonstraram que estes podem ser bons marcadores de episódios de rejeição imediatamente após o transplante, e que o aumento de sua expressão precede em 48 horas o aparecimento das manifestações clínicas e laboratoriais da rejeição aguda (33).

Entretanto, nem todos os estudos confirmam a utilidade das avaliações moleculares para o diagnóstico da rejeição aguda. Recentemente dois estudos contestaram esta utilidade. No primeiro, Yannaraki e colaboradores, avaliando a expressão dos genes perforina, granzima B e fas-ligante, demonstraram que os níveis dos genes encontram-se aumentados em RA, mas também em outras situações clínicas, que incluíram infecção citomegalovirus, infecção urinária e DIE, esta última avaliada em restrito número de pacientes (32). Em outro estudo, no qual a técnica de PCR semi-quantitativo convencional foi utilizada, a análise dos mesmos genes em biópsias renais e em sangue periférico, sugeriu que apenas a expressão dos genes perforina e fas-ligante em tecido renal foi capaz de predizer o diagnóstico de rejeição aguda e que a expressão destes genes em sangue periférico não se correlaciona com o diagnóstico histopatológico da rejeição aguda (34). A discrepância desses resultados pode estar relacionada a variáveis observadas pelos próprios autores destes estudos discordantes. No primeiro estudo fatores relacionados à coleta das amostras de urina podem ter comprometido as outras etapas da reação. Recomendações para o tratamento e armazenamento de células urinárias foram descritas por Medeiros e colaboradores, sugerindo o uso de solução estabilizadora do RNA.

Porém, mesmo as amostras não tratadas com essa solução, quando congeladas, garantem quantidade suficiente de RNA para as análises (35). Acreditamos que nossos achados tenham diferido dos reportados por Yannaraki e colaboradores, durante a DIE, sobretudo pelas questões relacionadas à viabilidade no RNA na coleta da urina e pelo número de pacientes com DIE avaliados. Da mesma forma, no estudo de Graziotto e colaboradores aspectos metodológicos como a técnica de PRC e a seleção das amostras do estudo podem ter levado aos diferentes resultados.

Como uma limitação deste estudo, alertamos que as amostras com nefrotoxicidade por inibidores da calcineurina e a nefropatia crônica do enxerto renal não foram obtidas em pacientes com DIE. Embora a nefropatia crônica do enxerto não seja um diagnóstico esperado durante a DIE a nefrotoxicidade por inibidores da calcineurina pode ocorrer durante o período de disfunção inicial e ser um fator de prolongamento da mesma (3).

Os achados do presente trabalho nos permitem concluir que, em pacientes com DIE, a quantificação de produtos de genes envolvidos na resposta aloimune, tanto em células do sangue periférico, quanto em células urinárias, propiciam parâmetros acurados para o diagnóstico de rejeição aguda. A validação destes resultados em outros estudos e possíveis sofisticções das técnicas utilizadas poderá fazer com que as avaliações moleculares substituam ou diminuam a necessidade de biópsias renais de vigilância durante a disfunção inicial do enxerto. Além disso, combinações das análises de diferentes genes, até mesmo em diferentes compartimentos, poderão levar a diagnósticos ainda mais precisos e seguros nesta difícil situação clínica.

Materiais e Métodos

Pacientes e coleta de amostras

Pacientes transplantados renais com DIE, caracterizada pela necessidade de diálise durante a primeira semana pós-transplante renal, foram submetidos à biópsias de vigilância a cada 7 a 10 dias até que ocorresse recuperação da função renal ou que o enxerto fosse dado como perdido. Causas técnicas (vasculares ou urológicas) ou infecciosas de disfunção do enxerto foram afastadas pelos métodos convencionais previamente à realização das biópsias. Imediatamente antes de cada biópsia foram colhidas amostras de sangue periférico e de urina estéril nos pacientes não anúricos; as células sangüíneas e urinárias foram isoladas e congeladas até o momento da extração do RNA para as análises moleculares. A cada biópsia foram obtidos dois fragmentos do enxerto. Um e meio fragmentos foram usados para as análises histológicas e o outro meio fragmento foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido e conservado a -70°C . Como controles foram analisadas amostras de tecido, leucócitos do sangue periférico e células urinárias de pacientes com diagnósticos histopatológicos de nefrotoxicidade por inibidores da calcineurina (NIC; n=8), nefropatia crônica do enxerto (NCE; n=12) e rim transplantado normal (NOR; n=10). As amostras dos grupos-controle foram obtidas de pacientes com indicação de biópsia renal por disfunção do enxerto ou em biópsias de protocolo.

As biópsias renais foram realizadas com orientação por ultrasonografia utilizando-se pistola semi-automática com agulha 16-G. A avaliação das lâminas foi feita por patologista renal sem conhecimento dos dados clínicos. A classificação de Banff-97 foi utilizada como padrão-ouro para os diagnósticos histopatológicos (19).

Todos os pacientes utilizaram corticosteróides combinados a ciclosporina ou tacrolimus e a micofenolato (mofetil ou sódico) em seu regime imunossupressor. Indução com anticorpos anti-linfocitários foi feita nos pacientes considerados de alto risco imunológico, os demais receberam anticorpos anti-receptor da interleucina-2 (basiliximab[®]).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre acreditado pelo Conselho Nacional de Pesquisa de Ministério da Saúde do Brasil e registrado no Escritório para Proteção de Humanos em Pesquisa (Office for Human Research Protections - OHRP-USDHHS) (Institutional Review Board - IRB 00000921).

Extração de RNA

Os fragmentos de enxerto para as análises moleculares foram descongelados, macerados e processados para a extração do RNA utilizando-se o método QIAamp[®] RNA Blood mini kit (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O sangue periférico foi coletado em tubos contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético); as células foram isoladas com tampão de lise de eritrócitos conforme instruções do fabricante. As células urinárias foram obtidas por centrifugação a 500 g por 20 minutos; o sobrenadante foi descartado; os botões de células foram ressuspendidos em solução de tampão salina fosfato, centrifugados novamente por 10 minutos e estocados a -70°C. O RNA foi extraído dos botões de células isoladas do sangue periférico e da urina, utilizando-se o kit de extração referido acima.

Quantificação da expressão de RNAm

A expressão de cada gene foi analisada pelo método da quantificação relativa pela reação em cadeia da polimerase em tempo real utilizando-se o sistema de detecção ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os ensaios para expressão gênica consistem em uma mistura de *primers* e sondas TaqMan® MGB (*minor groove binding*) a 360 µM, concentrada 20 vezes (20x). Estes ensaios foram adquiridos a partir de identificação das seqüências alvo no banco de genes, sendo que estas já haviam sido desenhadas, testadas e validadas em estudos prévios pelo fabricante. (Applied Biosystems. Gene Expression Assays/Custom primers and probes). Os corantes fluorescentes utilizados como marcadores das sondas foram 6- *carboxy fluorescein* (FAMTM) como *reporter* (em 5') e 6- *carboxytetramethyl rodamine* (TAMRA) como *quencher* (em 3'). No presente estudo os genes analisados foram: Perforina (Pf; ID: 65328531A), Granzima B (GB; ID: Hs 00188051_m1), Fas-ligante (FasL; ID: Hs 00181225_m1), Serpina proteinase inibidora 9 (PI-9; ID: Hs 00244603_m1), *X-linked forkhead/winged helix transcription factor* (FOXP3; ID: Hs 00203958_m1). Os controles moleculares endógenos utilizados foram a β-actina (PN. 4310881E), para amostras de biópsias e sangue periférico e a ciclofilina (PN. 4310883E), para amostras de urina (TaqMan® PDAR *Endogenous Control*). A normalização foi feita com a utilização dos controles descritos acima com o objetivo de equiparar as quantidades de RNAm presentes em cada reação.

As reações foram feitas em duplicatas utilizando-se o kit TaqMan® EZ RT-PCR (PN. N808-0235) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), de acordo com o seguinte protocolo: 5,0 µL de 5x TaqMan EZ buffer, 3,0 µL de acetato de manganês (25mM), 0,75 µL de dATP (10mM), 0,75 µL de dCTP

(10mM), 0,75 μ L de dGTP (10mM), 0,75 μ L de dUTP (20mM), 1,0 de μ L de *rTth* DNA polimerase (2,5 u/ μ L), 0,25 de AmpErase UNG (1u/ μ L), água pura em quantidade suficiente para 23 μ L. A esta mistura foram adicionadas para cada reação 1 μ L de *primers* e sondas (20x) e 1 μ L de RNA, totalizando um volume final de 25 μ L. O programa de ciclagem consistiu em: Estágio 1 (1 ciclo): 50°C por 2 minutos; estágio 2 (1 ciclo): 60°C por 30 minutos; estágio 3 (1 ciclo): 95°C por 5 minutos; estágio 4 (40 ciclos): 94°C por 20 segundos e 62°C por 1 minuto.

As análises dos produtos amplificados foram feitas através de quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, que descreve mudanças na expressão do gene alvo relativo a uma amostra de referência (36).

Análises Estatísticas

Os dados são apresentados como números absolutos, médias \pm desvios padrões ou percentagens. As variáveis contínuas com distribuição normal foram analisadas utilizando-se o método de análises de variâncias (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnett. Os níveis de RNAm foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis entre os 5 grupos diagnósticos. O teste de Dunn foi utilizado para comparações múltiplas entre os diferentes grupos. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para as comparações entre dois grupos. As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste exato de Fisher. As relações entre os níveis de RNAm para todos os genes foram estimadas pelo teste de correlação de Spearman. Curvas ROC (*Receiver operating characteristic*) foram geradas para que se encontrassem os melhores pontos de corte para rejeição aguda (37). Todas as análises foram feitas utilizando-se o programa estatístico SPSS

(*Statistical Package for the Social Sciences*) (versão 14.0, Chicago, USA). O nível de significância estatística foi estabelecido em $P < 0,05$.

Referências

1. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004;4(3):378-83.
2. Cosio FG, Pelletier RP, Falkenhain ME, Henry ML, Elkhammas EA, Davies EA, et al. Impact of acute rejection and early allograft function on renal allograft survival. *Transplantation* 1997;63(11):1611-5.
3. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004;364(9447):1814-27.
4. Chapman J, Bock A, Dussol B, Fritsche L, Kliem V, Lebranchu Y, et al. Follow-up after renal transplantation with organs from donors after cardiac death. *Transpl Int* 2006;19(9):715-9.
5. Szwarc I, Garrigue V, Delmas S, Deleuze S, Chong G, Mourad G. [Delayed graft function: a frequent but still unsolved problem in renal transplantation]. *Nephrol Ther* 2005;1(6):325-34.
6. Johnston O, O'Kelly P, Spencer S, Donohoe J, Walshe JJ, Little DM, et al. Reduced graft function (with or without dialysis) vs immediate graft function: a comparison of long-term renal allograft survival. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21(8):2270-4.
7. Geddes CC, Woo YM, Jardine AG. The impact of delayed graft function on the long-term outcome of renal transplantation. *J Nephrol* 2002;15(1):17-21.

8. Sorof JM, Vartanian RK, Olson JL, Tomlanovich SJ, Vincenti FG, Amend WJ. Histopathological concordance of paired renal allograft biopsy cores. Effect on the diagnosis and management of acute rejection. *Transplantation* 1995;60(11):1215-9.
9. Colvin RB, Cohen AH, Saiontz C, Bonsib S, Buick M, Burke B, et al. Evaluation of pathologic criteria for acute renal allograft rejection: reproducibility, sensitivity, and clinical correlation. *J Am Soc Nephrol* 1997;8(12):1930-41.
10. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L, Harmon W, et al. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(2):695-700.
11. Lipman ML, Stevens AC, Strom TB. Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts. *J Immunol* 1994;152(10):5120-7.
12. Vasconcellos LM, Schachter AD, Zheng XX, Vasconcellos LH, Shapiro M, Harmon WE, et al. Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation* 1998;66(5):562-6.
13. Sharma VK, Bologa RM, Li B, Xu GP, Lagman M, Hiscock W, et al. Molecular executors of cell death: differential intrarenal expression of Fas ligand, Fas, granzyme B, and perforin during acute and/or chronic rejection of human renal allografts. *Transplantation* 1996;62(12):1860-6.
14. Aquino-Dias EC, Veronese FJ, Santos Gonçalves LF, Manfro RC. Molecular markers in subclinical acute rejection of renal transplants. *Clin Transplant* 2004;18(3):281-7.

15. Sabek O, Dorak MT, Kotb M, Gaber AO, Gaber L. Quantitative detection of T-cell activation markers by real-time PCR in renal transplant rejection and correlation with histopathologic evaluation. *Transplantation* 2002;74(5):701-7.
16. Desvaux D, Schwarzingler M, Pastural M, Baron C, Abtahi M, Berrehar F, et al. Molecular diagnosis of renal-allograft rejection: correlation with histopathologic evaluation and antirejection-therapy resistance. *Transplantation* 2004;78(5):647-53.
17. Kotsch K, Mashreghi MF, Bold G, Tretow P, Beyer J, Matz M, et al. Enhanced granulysin mRNA expression in urinary sediment in early and delayed acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2004;77(12):1866-75.
18. Simon T, Opelz G, Wiesel M, Ott RC, Susal C. Serial peripheral blood perforin and granzyme B gene expression measurements for prediction of acute rejection in kidney graft recipients. *Am J Transplant* 2003;3(9):1121-7.
19. Bladergroen BA, Strik MC, Bovenschen N, van Berkum O, Scheffer GL, Meijer CJ, et al. The granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, is mainly expressed by dendritic cells and at immune-privileged sites. *J Immunol* 2001;166(5):3218-25.
20. Muthukumar T, Ding R, Dadhania D, Medeiros M, Li B, Sharma VK, et al. Serine proteinase inhibitor-9, an endogenous blocker of granzyme B/perforin lytic pathway, is hyperexpressed during acute rejection of renal allografts. *Transplantation* 2003;75(9):1565-70.
21. Rowshani AT, Florquin S, Bemelman F, Kummer JA, Hack CE, Ten Berge IJ. Hyperexpression of the granzyme B inhibitor PI-9 in human

renal allografts: a potential mechanism for stable renal function in patients with subclinical rejection. *Kidney Int* 2004;66(4):1417-22.

22. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 2005;353(22):2342-51.

23. Basadonna GP, Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Dunn DL, Sutherland DE, et al. Early versus late acute renal allograft rejection: impact on chronic rejection. *Transplantation* 1993;55(5):993-5.

24. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997;63(7):968-74.

25. Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, et al. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* 2001;344(13):947-54.

26. Nickel P, Lacha J, Ode-Hakim S, Sawitzki B, Babel N, Frei U, et al. Cytotoxic effector molecule gene expression in acute renal allograft rejection: correlation with clinical outcome; histopathology and function of the allograft. *Transplantation* 2001;72(6):1158-60.

27. Ding R, Li B, Muthukumar T, Dadhania D, Medeiros M, Hartono C, et al. CD103 mRNA levels in urinary cells predict acute rejection of renal allografts. *Transplantation* 2003;75(8):1307-12.

28. Dadhania D, Muthukumar T, Ding R, Li B, Hartono C, Serur D, et al. Molecular signatures of urinary cells distinguish acute rejection of renal allografts from urinary tract infection. *Transplantation* 2003;75(10):1752-4.

29. Dresske B, Haendschke F, Lenz P, Ungefroren H, Jenisch S, Exner B, et al. WOFIE stimulates regulatory T cells: a 2-year follow-up of renal transplant recipients. *Transplantation* 2006;81(11):1549-57.
30. Tatapudi RR, Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Li B, Sharma VK, et al. Noninvasive detection of renal allograft inflammation by measurements of mRNA for IP-10 and CXCR3 in urine. *Kidney Int* 2004;65(6):2390-7.
31. Matz M, Beyer J, Wunsch D, Mashreghi MF, Seiler M, Pratschke J, et al. Early post-transplant urinary IP-10 expression after kidney transplantation is predictive of short- and long-term graft function. *Kidney Int* 2006;69(9):1683-90.
32. Yannaraki M, Rebibou JM, Ducloux D, Saas P, Duperrier A, Felix S, et al. Urinary cytotoxic molecular markers for a noninvasive diagnosis in acute renal transplant rejection. *Transpl Int* 2006;19(9):759-68.
33. Gibbs PJ, Tan LC, Sadek SA, Howell WM. Quantitative detection of changes in cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells correlates with and precedes acute rejection in renal transplant recipients. *Transpl Immunol* 2005;14(2):99-108.
34. Graziotto R, Del Prete D, Rigotti P, Anglani F, Baldan N, Furian L, et al. Perforin, Granzyme B, and fas ligand for molecular diagnosis of acute renal-allograft rejection: analyses on serial biopsies suggest methodological issues. *Transplantation* 2006;81(8):1125-32.
35. Medeiros M, Sharma, VK, Ding R, Yamaji K, Li B, Muthukumar T, Valderde-Rosas S, Hernandez AM, Muñoz R, Suthanthiran M. Optimization of RNA yield, purity and mRNA copy number by treatment of urine cell pellets with RNAlater. *J Immunol Methods* 2003;279:135-142.

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

37. Kirkwood BS, JAC. Measurement error: assessment and implication. In: *Essential Medical Statistics*. 2 nd ed: Blackwell Publishing Company; 2003.

Tabela 1. Dados demográficos dos grupos em estudo e controles.

Grupos (Número de pacientes)	DIE (35)		CONTROLES (30)		
	RA (20)	NTA (28)	NIC (8)	NCE (12)	NOR (10)
Diagnósticos histopatológicos (Número de amostras por categoria)					
Idade (anos; média ± DP)*	41±13	47±10	43±11	47±12	47±08
Sexo (masculino/feminino)**	11/09	18/10	03/05	07/05	07/03
Doador (vivo/falecido)**	03/17	02/26	01/07	01/11	01/09
Tempo até a biópsia (dias; média ± DP)*	21±15	21±14	225±212 ^a	269±213 ^a	74±8

* = ANOVA com teste de Dunnett; ** Teste exato de Fisher; a = p < 0,001; DIE = Disfunção inicial do enxerto; RA = rejeição aguda; NTA = necrose tubular aguda; NIC = nefrotocidade por inibidores da calcineurina; NCE = nefropatia crônica do enxerto e NOR = normais.

Tabela 2. Coeficientes de correlação de Spearman das quantificações dos genes nos diferentes compartimentos.

Gene	Compartimentos					
	Tecido-sangue periférico		Tecido-células urinárias		Sangue-células urinárias	
	Coeficiente de correlação	P	Coeficiente de correlação	P	Coeficiente de correlação	P
Per	0,939	< 0,001	0,885	< 0,001	0,929	< 0,001
GzB	0,822	< 0,001	0,883	< 0,001	0,825	< 0,001
FasL	0,601	< 0,001	0,668	< 0,001	0,842	< 0,001
PI-9	0,767	< 0,001	0,540	< 0,001	0,707	< 0,001
FOXP3	0,976	< 0,001	0,980	< 0,001	0,950	< 0,001

Per = perforina; GzB = Granzima B; FasL = Fas ligante; PI-9 = serpina proteinase inibidora-9;

FOXP3 = *X-linked forkhead/winged helix transcription factor-3*.

Tabela 3. Pontos de corte e parâmetros diagnósticos, em percentagens, das quantificações moleculares para o diagnóstico de rejeição aguda em sangue periférico de pacientes com disfunção inicial do enxerto.

GENE	ASC (IC 95%)	Ponto de corte	S	E	VPP	VPN	A
Per	0,881 (0,766-0,966)	0,85	100	75	77	100	86
GzB	0,941 (0,869-1,013)	0,05	88	90	88	90	89
FasL	0,935 (0,852-1,019)	0,15	89	94	90	95	92
PI-9	0,935 (0,850-1,021)	0,20	88	90	88	90	88
FOXP3	0,954 (0,871-1,037)	1,85	94	95	94	95	95

Área sob a curva; (IC 95%) = Intervalo de confiança de 95%; S = sensibilidade; E = especificidade; VPP = valor preditivo positivo; VPN = valor preditivo negativo; A = acurácia; Per = perforina; GzB = Granzima B; FasL = Fas ligante; PI-9 = serpina proteinase inibidora-9; FOXP3 = *X-linked forkhead/winged helix transcription factor-3*.

Tabela 4. Pontos de corte e parâmetros diagnósticos, em percentagens, das quantificações moleculares para o diagnóstico de rejeição aguda em células urinárias de pacientes com disfunção inicial do enxerto.

GENE	ASC (IC 95%)	Ponto de corte	S	E	VPP	VPN	A
Per	0,917 (0,788-1,046)	0,22	100	86	86	100	92
GzB	0,851 (0,692-1,011)	0,20	83	86	83	86	85
FasL	0,887 (0,763-1,011)	0,07	100	64	71	100	81
PI-9	0,875 (0,745-1,005)	0,024	92	64	67	90	76
FOXP3	1,000 (1,000-1,000)	2,2	100	100	100	100	100

ASC = Área sob a curva; (IC 95%) = Intervalo de confiança de 95%; S = sensibilidade; E = especificidade; VPP = valor preditivo positivo; VPN = valor preditivo negativo; A = acurácia; Per = perforina; GzB = Granzima B; FasL = Fas ligante; PI-9 = serpina proteinase inibidora-9; FOXP3 = *X-linked forkhead/winged helix transcription factor-3*.

Legendas das Figuras:

Figura 1.

Níveis de RNAm de perforina, granzima B e fas ligante. Os gráficos demonstram as medianas 10°, 25° e os 75° e 90° valores percentis para os níveis de quantificação de RNAm normalizada ($2^{-\Delta\Delta CT}$) pelos genes da β -actina (tecido e sangue periférico) e ciclofilina (urina) nos diferentes diagnósticos histológicos. Os níveis de expressão dos genes Per, GzB e FasL foram significativamente maiores em pacientes com RA, quando comparados aos com NTA e aos grupos controles NIC, NCE e NOR em tecido renal, sangue periférico e células urinárias. Os valores de P são os maiores apresentados nas comparações em cada compartimento/gene. Per = perforina; GzB = Granzima B; FasL = Fas ligante; RA = rejeição aguda; NTA = necrose tubular aguda; NIC = nefrotocixidade por inibidores da calcineurina; NCE = nefropatia crônica do enxerto e NOR = normais.

Figura 2.

Níveis de RNAm de PI-9 e FOXP3. Os gráficos demonstram as medianas 10°, 25° e os 75° e 90° valores percentis para os níveis de quantificação de RNAm normalizada ($2^{-\Delta\Delta CT}$) pelos genes da β -actina (tecido e sangue periférico) e ciclofilina (urina) nos diferentes diagnósticos histológicos. O nível de expressão de PI-9 foi superior em pacientes com RA, quando comparados aos com NTA e aos grupos controles, NCE e NOR nos três compartimentos. Os valores de P são os maiores apresentados nas comparações em cada compartimento. * Indica que não houve diferença significativa na quantificação do gene PI-9 em células urinárias na comparação dos grupos RA e NIC ($p > 0,05$). Os níveis de FOXP3 foram sempre maiores em casos de RA nas comparações entre os grupos ($p < 0,05$); PI-9 = serpinina proteinase inibidora-9; FOXP3 = *X-linked forkhead/winged helix transcription factor-3*.

IV. CONCLUSÕES

- Os marcadores moleculares de processos inflamatórios em aloenxertos renais avaliados neste estudo apresentaram expressão aumentada na rejeição aguda de pacientes em disfunção inicial do enxerto.

- Os genes perforina, granzima B, fas ligante, PI-9 e FOXP3 estão expressos em quantidades aumentadas durante a rejeição aguda de pacientes com disfunção inicial do enxerto, comparados à expressão observada em outras situações clínicas.

- As quantificações moleculares dos genes perforina, granzima B, fas ligante, PI-9 e FOXP3 revelaram parâmetros satisfatórios para o diagnóstico de rejeição aguda. O gene PI-9 foi o de pior desempenho e o gene FOXP3 o mais acurado.