

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

**ANÁLISE QUANTITATIVA DO RNA MENSAGEIRO ASSOCIADA
AOS DIFERENTES ESQUEMAS IMUNOSSUPRESSORES EM
PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS. AVALIAÇÃO PELA
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL EM
CÉLULAS SANGUÍNEAS E DO SEDIMENTO URINÁRIO.**

Caroline Rech

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro

*A apresentação desta dissertação é requisito do
programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, para a obtenção do título de Mestre.*

Porto Alegre, Brasil.

2011

CIP - Catalogação na Publicação

Rech, Caroline

Análise quantitativa do RNA mensageiro associada aos diferentes esquemas imunossupressores em pacientes transplantados renais. Avaliação pela reação em cadeia da polimerase em tempo real em células sanguíneas e do sedimento urinário. / Caroline Rech. - 2011.

115 f.

Orientador: Roberto Ceratti Manfro.

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

1. FOXP3, TIM-3, KIM-1, TGF-beta, CTGF. 2. transplante renal. 3. terapia imunossupressora. I. Manfro, Roberto Ceratti, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, à Faculdade de Medicina da UFRGS e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, instituições às quais permaneci ligada nos últimos 13 anos e que admiro imensamente pela qualidade do ensino, pesquisa e assistência médica prestados.

Agradeço especialmente ao Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) e ao Fundo Nefro, que apoiaram financeiramente este projeto e permitiram sua realização.

Gostaria de deixar um agradecimento especial ao Serviço de Nefrologia do HCPA, que dedicou apoio importantíssimo e inestimável a minha formação como Nefrologista. Aos professores, médicos contratados, enfermeiras, funcionários e colegas residentes, meu mais sincero obrigada.

Deixo também um agradecimento especial ao meu orientador, Prof. Roberto Ceratti Manfro, pelo incentivo na realização deste projeto, e especialmente pelo apoio e paciência nesta fase final.

Não posso deixar de agradecer aos colegas (e, mais do que tudo, amigos) Gabriel Joelsons e Mariana Gascue de Alencastro. Ao Gabriel, pelo auxílio na coleta de pacientes, pela troca de referências, pelos ensinamentos técnicos e, principalmente, pelo suporte na realização da maior parte dos experimentos. À Mariana, pelo auxílio na coleta dos pacientes e pela presença e estímulo constantes. Aos dois, pelo apoio em todas as fases da realização deste trabalho e por não terem me permitido desistir mesmo nos momentos mais difíceis, dedico não só este trabalho mas minha eterna admiração e amizade.

Finalmente, agradeço aos meus pais, Juarez e Rejane, e ao meu irmão, Jônatas, pelos exemplos de coragem e persistência, por terem me ensinado que ao enfrentar um desafio é necessário que se queimem os navios deixados no porto. E ao Angelo, fonte de inspiração, amor e companheirismo, agradeço pela paciência e apoio incondicional não só nessa fase, mas nos últimos 10 anos.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	5
Abstract	7
Capítulo 1. Introdução	9
Capítulo 2. Referencial Teórico	13
2.1 Estratégia de busca da informação	14
2.2. Doença renal crônica e transplante renal	14
2.3. Alo-imunidade	17
2.4. Tolerância imunológica	20
2.5. Nefropatia crônica do enxerto	24
2.6. Diagnóstico de nefropatia crônica do enxerto	29
2.7. Diagnóstico não-invasivo	31
2.8. Técnica de PCR em tempo real - RT-PCR	34
2.9. Genes em estudo	36
2.9.1. TIM-3	36
2.9.2. FOXP3	37
2.9.3. KIM-1	40
2.9.4. TGF- β	41
2.9.5. CTGF	42
Capítulo 3. Objetivos	44
Capítulo 4. Referências Bibliográficas	46
Capítulo 5. Artigo “Messenger RNA expression profiles in kidney transplant recipients under different immunosuppressive regimens”	66
Capítulo 6. Considerações Finais	101
Anexos	106

LISTA DE ABREVIATURAS

AMF – ácido micofenólico

AZA – azatioprina

BLT - belatacept

cDNA – DNA complementar

CTGF – fator de crescimento do tecido conjuntivo (*connective tissue growth factor*)

DGF – disfunção inicial do enxerto (*delayed graft function*)

DM – diabetes melito

DNA – ácido desoxiribonucleico

DRC – doença renal crônica

EUA – Estados Unidos da América

HAS – hipertensão arterial sistêmica

IC – inibidores da calcineurina

IF/TA – fibrose intersticial / atrofia tubular

IFN- γ - interferon gama

IL-17 – interleucina 17

KIM-1 – molécula de injúria renal - 1 (*kidney injury molecule - 1*)

MMP-2 – metaloprotease de matriz - 2

mRNA – RNA mensageiro

mTOR – alvo de rapamicina em mamíferos (*mammalian target of rapamycin*)

NCE – nefropatia crônica do enxerto

NIC – nefrotoxicidade dos inibidores de calcineurina

NTA – necrose tubular aguda

PCR – reação em cadeia da polimerase

PRA – painel de reatividade de anticorpos

PTH – paratormônio

RA – rejeição aguda

RNA – ácido ribonucleico

ROS – espécies reativas de oxigênio

RPM - rapamicina

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real

SUS – Sistema Único de Saúde

TCR – receptor de células T

TGF- β – fator transformador de crescimento beta (*transforming growth factor beta*)

Th – linfócito T auxiliar

TIM-3 - domínios de mucina e imunoglobulina de célula T (*T cell immunoglobulin domain, mucin domain-3*)

TIMP-1 – inibidor tecidual de metaloproteases da matriz - 1

Treg – células T reguladoras

tTG – transglutaminase tecidual

Tx – transplante

USRDS - *United States Renal Data System*

ABSTRACT

Introdução: Técnicas que possibilitem o diagnóstico não-invasivo das condições que afetam a sobrevida dos transplantes e os mecanismos associados ao seu desenvolvimento encontram-se em intensa investigação. Este estudo objetiva delinear perfis de expressão de RNA mensageiro de aloimunidade, tolerância, fibrose e injúria tubular aguda associados aos diferentes imunossupressores utilizados na prática clínica dos transplantes renais.

Métodos: Amostras de sangue e urina foram coletadas de 53 pacientes transplantados renais com pelo menos um ano de seguimento pós-transplante e com níveis séricos de creatinina estáveis. Os pacientes foram divididos em 6 grupos, de acordo com seu regime de imunossupressão, todos contendo corticosteróides em baixas doses de manutenção: (1) inibidor da calcineurina (IC) + azatioprina (AZA) (7 pacientes); (2) ácido micofenólico (AMF) (6 pacientes); 3) rapamicina (RAPA) (7 pacientes); 4) IC + AMF (15 pacientes); 5) IC (6 pacientes); 6) belatacept (BLT) + AMF (11 pacientes). A quantificação do RNA mensageiro dos genes FOXP3, TIM-3, KIM-1, TGF- β e CTGF foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real utilizando o método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$. **Resultados:** A expressão de FOXP3 foi maior nos grupos RAPA (P = 0,049) e IC (P = 0,039) em comparação ao grupo IC+AZA; a expressão na urina foi maior no grupo AMF em relação aos grupos IC+AZA (P = 0,004) e IC+AMF (P = 0,003), e no grupo RAPA em comparação ao grupo IC+AMF (P = 0,003). O grupo RAPA apresentou maior expressão de TIM-3 no sangue do que o grupo IC+AZA (P = 0,049); na urina, a expressão foi maior no grupo AMF quando comparada aos

grupos IC+AZA (P = 0,005), RAPA (P = 0,003), IC+AMF (P = 0,001) e BLT+AMF (P = 0,021). TGF- β no sangue foi menos expresso no grupo IC+AZA em comparação aos grupos IC+AMF (P = 0,005), IC (P = 0,014) e BLT+AMF (P = 0,013); a expressão urinária foi menor no grupo IC+AMF em relação aos grupos IC+AZA (P = 0,008), AMF (P = 0,002), RAPA (P = 0,01), IC (P = 0,015) e BLT+AMF (P < 0,001); os grupos IC+AZA e RAPA também apresentaram menor expressão de TGF- β na urina em comparação aos grupos AMF (P = 0,028 e 0,032, respectivamente) e BLT+AMF (P = 0,001 e 0,006, respectivamente). A expressão de CTGF no sangue não foi diferente entre os grupos; sua expressão urinária foi menor no grupo IC+AMF quando comparada aos grupos IC+AZA (P = 0,004), AMF (P = 0,001), RAPA (P = 0,01) e BLT+AMF (P = 0,001). KIM-1 não foi expresso em células sanguíneas; na urina, o grupo IC+AZA apresentou maior expressão de KIM-1 do que o grupo IC+AMF (P = 0,019). **Conclusões:** A análise dos perfis de expressão gênica nos vários regimes de imunossupressão permite identificar associação de diferentes processos a cada tipo de combinação terapêutica. Os resultados evidenciam a associação dos inibidores de calcineurina aos marcadores de fibrose tecidual, enquanto que rapamicina e micofenolato parecem mediar processos de tolerância imune e modulação da alo-imunidade. Estudos com maior poder estatístico poderão estreitar essas associações, determinando o real papel da expressão de biomarcadores como ferramentas para o diagnóstico das condições que afetam os enxertos renais.

Capítulo 1. Introdução

Transplante renal é, para uma significativa porção dos pacientes portadores de doença renal crônica, a opção terapêutica com maior potencial para restauração de uma vida saudável e produtiva (1, 2). O primeiro transplante renal realizado com sucesso ocorreu em 1954 em Boston entre gêmeos idênticos. Na década de 1960, o reconhecimento das propriedades imunossupressoras da azatioprina em combinação com corticosteróides tornou possível a realização de cirurgias envolvendo pacientes não-idênticos. A evolução das técnicas cirúrgicas e o desenvolvimento de novos agentes imunossupressores, incluindo ciclosporina, tacrolimus, ácido micofenólico, rapamicina e anticorpos monoclonais específicos, ocasionou a redução na incidência e intensidade dos episódios de rejeição aguda (1-7).

No entanto, apesar do progresso com relação ao controle da rejeição aguda e do aumento da sobrevida em curto prazo dos enxertos renais, a perda tardia de função permanece sendo um problema (8). Nankivell e colaboradores demonstraram, em um estudo que avaliou 961 biópsias protocolares de rins transplantados em um período de 10 anos, que a maioria dos enxertos renais após um ano de transplante apresenta alterações crônicas caracterizadas por injúria microvascular e glomerular. A nefrotoxicidade, principalmente associada ao uso de inibidores da calcineurina (ciclosporina e tacrolimus), determina dano túbulo-intersticial adicional e é encontrada em praticamente todos os enxertos após 10 anos de evolução. O estudo conclui, ainda, que, uma vez estabelecido, o dano túbulo-intersticial e glomerular é irreversível, resultando em perda progressiva de função renal e perda do enxerto (9).

Fibrose intersticial e atrofia tubular (IF/TA) em transplantes renais são alterações fortemente associadas ao desenvolvimento de disfunção crônica do enxerto (10). Os processos imunobiológicos que culminam em IF/TA não são ainda totalmente compreendidos, sendo provavelmente de origem multifatorial, incluindo eventos imunológicos, hipertensão e nefrotoxicidade. A detecção precoce dessas alterações é difícil, e procedimentos invasivos, como a realização de biópsia do rim transplantado para diagnóstico histopatológico, identificam apenas fases mais avançadas do dano renal além de serem invasivos, arriscados, caros e sujeitos a erros de amostragem. O desenvolvimento de novas tecnologias não-invasivas capazes de detectar precocemente a disfunção crônica e prever o prognóstico tardio dos enxertos renais é cada vez mais necessário para garantir o sucesso a longo prazo dos transplantes renais (8, 11, 12). Da mesma forma a identificação não invasiva de processos inflamatórios aloimunes subclínicos assim como a demonstração de mecanismos associados à aceitação ou a tolerância operacional dos enxertos é de suma importância clínica, pois poderá permitir que ajustes dos regimes imunossupressores sejam feitos e que assim se evitem os efeitos deletérios da imunossupressão excessiva ou insuficiente.

A avaliação da expressão de diferentes genes candidatos pode permitir que estes eventos sejam detectados. Em estudos prévios do nosso grupo demonstramos a possibilidade de se diagnosticar molecularmente as rejeições subclínicas (13) e as clinicamente manifestas (14), assim como demonstramos que as avaliações moleculares em compartimentos periféricos (sangue e urina) refletem, com elevada acurácia, os eventos existentes no órgão transplantado

(14, 15). Neste projeto testaremos a hipótese de que é possível determinar assinaturas moleculares para citotoxicidade, aceitação/tolerância e injúria tubular aguda, além de correlacioná-las ao uso de diferentes regimes imunossupressores.

Capítulo 2. Referencial Teórico

2.1. Estratégia de busca da informação

A busca de artigos científicos utilizados no embasamento teórico deste trabalho foi realizada através da base de dados PUBMED, utilizando como palavras-chave *kidney transplantation, chronic allograft nephropathy, non-invasive diagnosis, TIM-3, FOXP3, KIM-1, TGF-beta, CTGF*, em diferentes combinações.

2.2. Doença renal crônica e transplante renal

A doença renal crônica (DRC) é considerada, mundialmente, um problema de saúde pública crescente. Nos Estados Unidos, o número de pacientes que iniciam terapia de substituição renal aumenta a cada ano, refletindo uma tendência descrita em vários países. Em 2007 foram registrados mais de 500.000 pacientes em hemodiálise nos EUA (16). No Brasil, censo realizado pela Sociedade Brasileira de Nefrologia em 2008 estimou que 87.044 pacientes vinham recebendo terapia de substituição renal, um número que também vem subindo - em 2007 havia 73.605 pacientes em hemodiálise, enquanto que em 2000 esse total era de apenas 42.695 pacientes, representando um acréscimo de 73% em 8 anos (17).

Os custos associados ao tratamento da DRC terminal, especialmente os relacionados à diálise, são desproporcionalmente altos quando comparados a outras doenças crônicas. Projeta-se que os gastos com o tratamento destes pacientes excedam 28 bilhões de dólares nos Estados Unidos no ano de 2010 (16). No Brasil, em que praticamente 90% dos pacientes submetidos a terapia

de substituição renal têm seus tratamentos custeados pelo Sistema Único de Saúde, estima-se gasto ao redor de 1,8 bilhões de reais em 2010 (18).

No entanto, apesar do massivo investimento no tratamento da DRC e dos avanços substanciais relacionados à qualidade da terapia dialítica, observa-se que esses pacientes persistem apresentando taxas de mortalidade e morbidade significativas, além de uma redução importante na qualidade de vida. A sobrevida estimada em um, dois e cinco anos para pacientes em diálise é de, respectivamente, 81, 65 e 34 por cento (16). Além disso, metade desses pacientes apresenta três ou mais comorbidades associadas, com uma média de 12,6 dias de internação hospitalar por ano para cada paciente. Estudos que avaliaram qualidade de vida reportam índices muito abaixo da população geral (16, 19, 20).

Dessa forma, o transplante renal é, para uma significativa porção dos pacientes com DRC, a opção terapêutica com maior potencial para restauração de uma vida saudável e produtiva (1, 2).

O primeiro transplante renal realizado com sucesso ocorreu em 1954 em Boston entre gêmeos idênticos. Na época já se conheciam as bases da imunologia, mas a modulação da resposta imune e a realização de transplantes entre pessoas que não compartilhassem o mesmo perfil genético ainda não eram possíveis devido à inexistência de terapêuticas eficazes desenhadas para este fim. Na década de 1960, o reconhecimento das propriedades imunossupressoras da azatioprina em combinação com corticosteróides tornou possível a realização de cirurgias envolvendo pacientes não-idênticos. A evolução das técnicas cirúrgicas e o desenvolvimento de novos agentes

imunossupressores, incluindo ciclosporina, tacrolimus, ácido micofenólico, rapamicina e anticorpos monoclonais específicos, ocasionou a redução na incidência e intensidade dos episódios de rejeição aguda, melhorando a sobrevida dos enxertos renais. (1) As últimas duas décadas possibilitaram aumento na sobrevida dos enxertos renais ao final do primeiro ano pós-transplante de 50% para próximo de 90% em órgão de doadores falecidos e de 95% em rins provenientes de doadores vivos. (21-23)

No entanto, um transplante renal bem sucedido não é traduzido apenas em melhor sobrevida do enxerto. Possibilita uma melhora significativa na qualidade de vida, além de reduzir a taxa de mortalidade dos pacientes com DRC quando comparada à manutenção de diálise (3 - 6). Esses achados foram confirmados em estudos que compararam a sobrevida entre pacientes submetidos a transplante e pacientes alocados em listas de espera. Um dos maiores destes estudos, realizado através da análise do *United States Renal Data System* (USRDS), avaliou 46.000 pacientes em lista de espera, 23.000 destes submetidos subsequentemente a transplante renal. A análise dos resultados permitiu concluir que a taxa anual de morte foi significativamente menor em pacientes transplantados quando comparada àquela de pacientes em diálise (3,8 vs 6,3 / 100 pacientes-ano), com uma redução no risco de morte de 70 por cento após 3-4 anos (risco relativo 0,32; $P < 0,001$) (16). Estudo similar foi realizado mais recentemente, com mais de 100.000 pacientes em lista de espera, 74.000 deles submetidos a transplante renal. Seus resultados corroboram os achados de menor taxa anual de morte no grupo de pacientes transplantados (7).

2.3. Alo-imunidade

Em um indivíduo imunocompetente, o transplante de um órgão proveniente de indivíduo geneticamente idêntico (singênico) não é capaz de acionar os mecanismos de reatividade imunológica direcionados contra o enxerto, em contraste ao que ocorre em transplantes realizados entre indivíduos geneticamente díspares, ou alogênicos. Alorreconhecimento é o termo utilizado para referir-se à identificação de tecidos de origem alogênica realizada pelo sistema imunológico através da ativação de células T e B. Essas interações, quando ocorrem em indivíduos incompatíveis imunologicamente, determinam o início da resposta imune, referida como aloresposta, ou alo-imunidade. A alo-imunidade em pacientes não-tolerantes e na ausência de imunossupressão leva invariavelmente à rejeição do enxerto (24, 25).

O início da resposta alogeneica se dá pelas células apresentadoras de antígenos, cuja ação precede a ativação das células T. Assim, o início da ativação imunológica ocorre nos tecidos linfóides secundários, com expansão clonal de células T CD4+ no baço e nos linfonodos (24, 26-29). Após a apresentação antigênica, na ausência de mecanismos imunológicos supressores ou de drogas imunossupressoras, ocorre intensa infiltração do enxerto por células T secretoras de linfocinas, induzindo expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II em células endoteliais e epiteliais, tornando-as capacitadas a apresentar antígenos a linfócitos T CD4+ (24, 30). Essas células persistem como as únicas capazes de expressar moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II do doador. O processo de apresentação antigênica direta através dessas células

apresentadoras não-profissionais resulta em deleção de células T “naive”, silenciamento ou modificação para fenótipo Th2, e anergia em células de memória, com falha na secreção de interleucina 2 (IL-2) (24, 31, 32).

A ativação de células T CD4+ “naive” resulta na maturação da célula T e na diferenciação em pelo menos quatro tipos de fenótipos: Th1, Th2, Th17 e células T reguladoras (Tregs). Células Th1 estão envolvidas no desenvolvimento de rejeição aguda ao enxerto, enquanto as demais modulam os processos de alo-imunidade e desenvolvimento de tolerância imunológica.

As células Th1 são as clássicas células T pró-inflamatórias, peças-chave nas respostas de hipersensibilidade tardia e contra patógenos intracelulares, como micobactérias. Muitos estudos em transplante renal dedicaram-se às respostas induzidas por células Th1 e à produção de interferon-gama (IFN- γ). Muito embora esta citocina esteja sem dúvida elevada em modelos animais de rejeição em transplante (33-35), IFN- γ é produzido por várias outras células (linfócitos *natural killer*, Tregs e células T CD8+) e sua detecção não denota necessariamente atividade de células Th1 (36, 37).

A interleucina 17 (IL-17), citocina altamente pró-inflamatória, é produzida por células Th17. Essas células estão envolvidas na resposta a patógenos extracelulares e têm forte associação com doenças autoimunes (38). No cenário de transplantes, a elevação dos níveis de IL-17 mRNA em células renais de cobaias e a presença de IL-17 em células mononucleares inflamatórias podem ser vistas a partir do segundo dia pós-transplante (39), enquanto que, em seres humanos, os níveis de IL-17 em enxertos renais

encontram-se elevados durante episódios de rejeição subclínica, observando-se também a detecção de IL-17 mRNA em sedimento urinário (40, 41).

Recentemente, alguns estudos demonstraram que as células Th17 são suficientemente capazes de, sozinhas, mediar processos de rejeição (42, 43). Nesses modelos, obteve-se o antagonismo da IL-17 através da administração de anticorpos monoclonais ou de anticorpos anti-TIM-1 (molécula co-estimulatória de células T, cuja ligação resulta na produção de IL-17 *in vitro*), com conseqüente retardo ou mesmo prevenção do desenvolvimento de rejeição (42, 43). Seguindo a mesma linha, experimento recente demonstrou o papel da molécula TIM-3 (domínios de célula T e de mucina – 3) na ativação da resposta alo-imune: o uso de anticorpo monoclonal anti-TIM-3 acelerou processos de rejeição dos enxertos cardíacos de cobaias, além de aumentar o número de células T efetoras, promover a polarização de linfócitos Th1 e Th17 e reduzir a quantidade de Tregs alo-específicas (44). TIM-3 aparece, assim, como uma molécula reguladora central da alo-imunidade através de sua habilidade de modular a diferenciação de células T CD4+. Na figura 1 abaixo estão representados de forma esquemática as repostas celulares e seus principais mecanismos efetores.

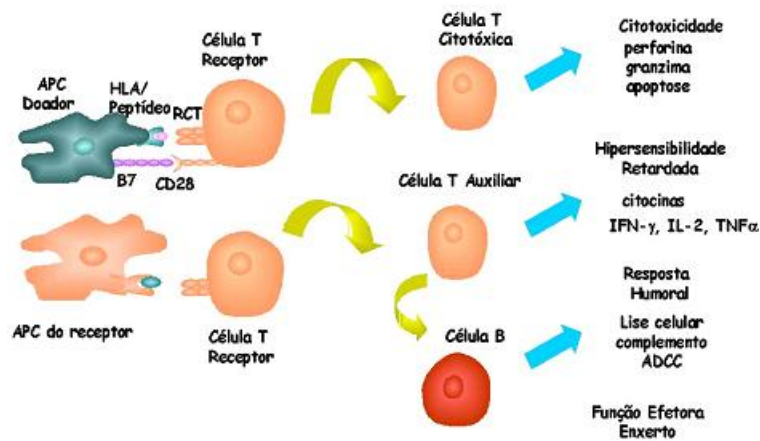


Figura 1. *Mecanismos efetores da rejeição alogeneica.* O reconhecimento alogeneico, pelos linfócitos T, desencadeia uma série de interações entre diferentes células do sistema imune, ativando diversos mecanismos efetores de agressão ao enxerto, como: (i) citotoxicidade mediada por células, seja por apoptose, ou pela ação de substâncias citolíticas, como perforina e granzima; (ii) reação imunológica de hipersensibilidade retardada (ou tardia), com a produção de diversas citocinas inflamatórias; (iii) citotoxicidade mediada por anticorpos, seja pela ativação da cascata do complemento, seja com o envolvimento conjunto de células como as células NK (citotoxicidade dependente de anticorpo). Todos esses mecanismos são capazes de causar dano ao tecido transplantado.

2.4. Tolerância imunológica

Tolerância imunológica é o estado no qual o sistema imune é irresponsivo a antígenos específicos. A maioria das pessoas apresenta um estado de tolerância aos seus próprios antígenos, o que impede o desenvolvimento de doenças auto-imunes. No caso de transplantes de aloenxertos, tolerância denota a ausência de resposta imune ao órgão doado, com manutenção da resposta normal a outros antígenos. A habilidade de responder normalmente a outros antígenos contrasta radicalmente com o efeito imunossupressor inespecífico obtido com as drogas utilizadas para prevenir os

processos de rejeição, e que estão associadas a riscos aumentados de infecção e doenças malignas (45).

Alcançar o estado de tolerância imunológica é um dos principais objetivos no que se refere a transplantes não só devido à toxicidade associada aos imunossuppressores, mas também pelo potencial de otimizar a função dos enxertos a longo prazo através da prevenção do desenvolvimento de rejeição crônica. O desenvolvimento de tolerância imune também possibilitaria a realização de xenotransplantes, aumentando a oferta de órgãos disponíveis (45).

Existem descritos na literatura exemplos de situações em que o aloreconhecimento não resulta em rejeição. Observam-se, na clínica de transplantes, casos em que a função do enxerto permanece normal apesar da suspensão da terapia imunossupressora, especialmente no que se refere a transplante hepático (46-48). Pacientes que espontaneamente aceitam seus enxertos são convencionalmente considerados como “operacionalmente tolerantes”, demonstrando que a tolerância imunológica pode ser atingida em humanos (24). Em modelos experimentais o desenvolvimento de tolerância espontânea entre indivíduos geneticamente díspares tem sido observado em alguns estudos (49, 50).

Experimentalmente existem pelo menos dois tipos de estados imunológicos que caracterizam tolerância. No primeiro, o enxerto é aceito sem a necessidade de imunossupressão crônica, mas o receptor pode rejeitar um segundo enxerto do mesmo doador, caracterizando o mecanismo de tolerância órgão-específica. Em outros casos, o sistema imune é capaz de aceitar

qualquer órgão ou tecido do mesmo doador sem imunossupressão – esse estado de tolerância é descrito como sistêmico (45).

A célula T é o efetor central dos mecanismos de rejeição, assim, a obtenção de tolerância dessas células pode sobrepor as principais barreiras impostas pelo sistema imune aos alo-enxertos. Existem três processos principais para indução de tolerância de células T: deleção clonal, anergia e supressão (comumente chamada de regulação). Esses mecanismos podem atuar sozinhos ou em conjunto no desenvolvimento de tolerância (24, 45).

A *deleção clonal* implica na morte de células T portadoras de receptores capazes de reconhecer antígenos do doador. A deleção é o principal processo envolvido na indução de tolerância aos antígenos próprios durante o desenvolvimento das células T no timo. No entanto, células T maduras presentes em tecidos linfóides periféricos também podem ser deletadas sob certas condições, como, por exemplo, após exposição persistente de uma grande carga antigênica, o que leva à exaustão das células T (45, 51, 52).

Supressão refere-se ao processo no qual uma população celular induz ativamente a redução da reatividade das células T, tendo sido associado ao desenvolvimento de tolerância em vários modelos de transplante em roedores, além de estar presente na manutenção da tolerância aos antígenos próprios (24, 45).

Anergia denota a incapacidade das células T em proliferar e produzir IL-2 em resposta aos antígenos por elas reconhecidos (45, 51).

Estudos iniciados na década de 1970 introduziram o conceito de que as próprias células T podem ativamente suprimir a resposta imune (53, 54). Células T reguladoras (Tregs) são um subtipo de linfócito T que pode suprimir as respostas imunes e controlar a responsividade aos alo-antígenos do doador, tendo ainda um papel na indução e manutenção de tolerância aos transplantes *in vivo* (55).

O fator de transcrição *forkhead* P3 ligado ao X (FOXP3) é reconhecido como o gene regulador das Tregs, uma vez que células com atividade reguladora não são detectadas em humanos ou ratos com mutações referentes a esse gene (56).

Tregs podem ser divididas em duas populações: a) Tregs nativas geradas no timo e que migram para a periferia como células T maduras; e b) Tregs adaptativas ou induzidas, derivadas tanto das precursoras nativas como daquelas presentes na periferia (57-60). Até recentemente, acreditava-se que as Tregs adaptativas derivavam apenas das células nativas, mas análises recentes de células T CD4+ humanas têm demonstrado que as Tregs FOXP3+ também são geradas de células T de memória altamente diferenciadas e com capacidade de divisão celular rápida (58).

Existem evidências suportando o papel das Tregs nativas na manutenção da tolerância ao próprio em humanos. Defeitos congênitos em FOXP3 em humanos são associados a síndrome de auto-imunidade, poliendocrinopatias, e outras patologias (61). Vários estudos experimentais aumentaram o interesse acerca do envolvimento das Tregs em transplantes. Rejeição crônica e nefropatia crônica do enxerto têm sido associadas a

concentrações reduzidas de Tregs circulantes (62). Enquanto a suspensão da terapia imunossupressora geralmente leva à rejeição, uma pequena fração de pacientes “aceita” seus enxertos apesar da ausência de imunossupressão, demonstrando a possibilidade de tolerância “espontânea”. Apesar disso, esses pacientes não apresentam aumento na quantidade de Tregs circulantes com relação aos controles (62). Aumento na expressão do mRNA da molécula FOXP3 em sedimento urinário tem sido associado a melhores desfechos em episódios de rejeição aguda em transplante renal (15, 56, 63).

O uso de inibidores da calcineurina está associado a redução no percentual de Tregs circulantes no sangue de pacientes transplantados renais (64, 65). Por outro lado, rapamicina parece potencializar processos de indução de tolerância, promovendo aumento na conversão de linfócitos T em Tregs e regulando negativamente os mecanismos de alo-imunidade (66-68).

2.5. Nefropatia crônica do enxerto

A evolução das medicações imunossupressoras possibilitou a consolidação do transplante renal como a melhor estratégia terapêutica para pacientes com DRC terminal. No entanto, apesar do progresso com relação ao controle da rejeição aguda e do aumento da sobrevida em curto prazo dos enxertos renais, a perda tardia de função permanece sendo um problema muito significativo (11).

A nefropatia crônica do enxerto (NCE) é a principal causa da perda de função dos enxertos renais, permanecendo, apesar da evolução dos

imunossupressores, o desafio central no manejo clínico de pacientes transplantados (8). Nankivell e colaboradores demonstraram, através de estudo que avaliou 961 biópsias protocolares de rins transplantados em um período de 10 anos, que a maioria dos enxertos renais após um ano de transplante apresenta alterações crônicas caracterizadas por injúria microvascular e glomerular. A nefrotoxicidade, principalmente associada ao uso de IC (ciclosporina e tacrolimus), determina dano túbulo-intersticial adicional e é encontrada em praticamente todos os enxertos após 10 anos de evolução. O estudo conclui, ainda, que, uma vez estabelecido, o dano túbulo-intersticial e glomerular é irreversível, resultando em perda progressiva de função renal e perda do enxerto (9).

O termo NCE vem sendo utilizado para descrever o desenvolvimento de fibrose e atrofia em um enxerto com perda progressiva de função (8). O estudo de Nankivell e colaboradores demonstrou que o dano causado ao enxerto é tempo-dependente, progressivo e subestimado pela medida da creatinina sérica (9).

Inúmeros processos fisiopatológicos são associados ao desenvolvimento de NCE. Logo após o transplante, o dano túbulo-intersticial é relacionado a injúria de isquemia-reperfusão, necrose tubular aguda, rejeição aguda e subclínica e nefrotoxicidade por IC, sobrepostas às doenças pré-existentes do doador. Essas alterações predispõem ao desenvolvimento de fibrose e atrofia tubular em etapas posteriores (8).

Mais tardiamente, os processos de inflamação celular são substituídos pela injúria microvascular e glomerular associada à nefrotoxicidade por IC, além de

outros vários fatores (hipertensão, hiperplasia vascular fibro-intimal imune-mediada, glomerulopatia do transplante e injúria capilar, infecção por polioma vírus e recorrência de glomerulonefrites). Adicionalmente, mecanismos envolvidos na ruptura da arquitetura interna do néfron, isquemia cortical, inflamação persistente, envelhecimento celular (em um processo chamado de senescência replicativa, determinado principalmente pela idade do doador), ativação de citocinas, contribuem para dano imunologicamente mediado e desenvolvimento de NCE (8, 11).

Resumidamente, o dano ao enxerto é determinado por uma combinação de estímulos alo-ímunes, isquêmicos e inflamatórios, caracterizados por agressão tubular letal ou quase-letal com uma resposta cicatricial pró-fibrótica. Múltiplas rotas e mediadores causam injúria tecidual cumulativa a todos os compartimentos do rim transplantado. Esclerose associada a lesão túbulo-intersticial é mediada por um processo de fibrogênese ativa, resultando em perda epitelial e desenvolvimento de atrofia tubular e fibrose intersticial crônica, culminando com a perda de função do enxerto (vide Figura 2) (8, 11).

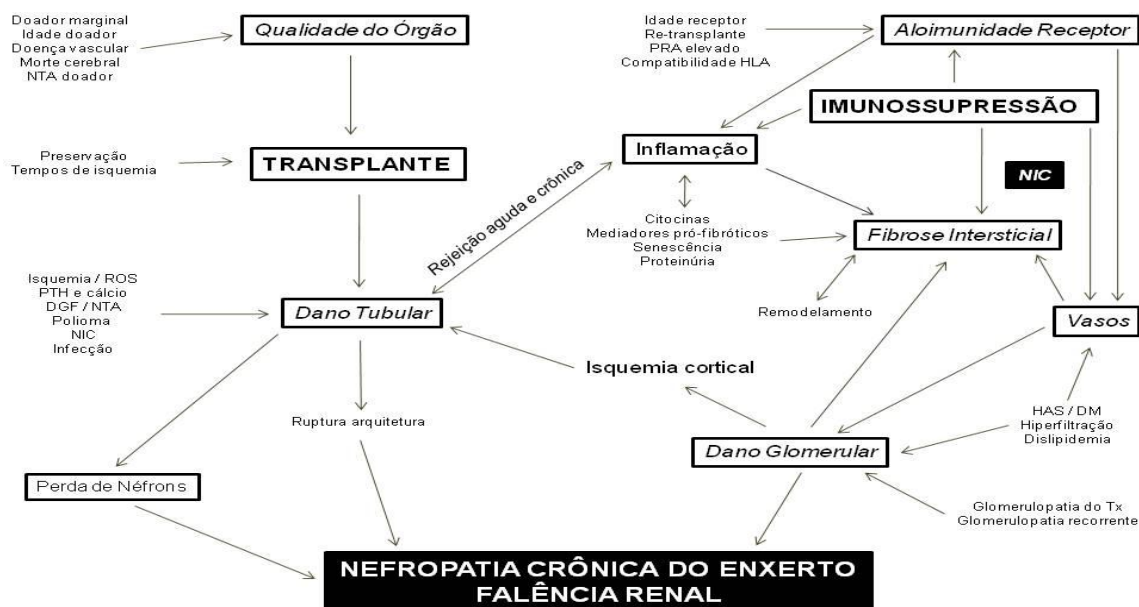


Figura 2 – Mecanismos fisiopatológicos envolvidos na gênese da nefropatia crônica do enxerto. Adaptado de (8).

Vários estudos identificaram genes com potencial pró (fator transformador de crescimento beta (TGF- β), transglutaminase tecidual (tTG), inibidor tecidual de metaloproteases da matriz – 1 (TIMP-1), fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), entre outros) e antifibrótico (metaloprotease de matriz -2 (MMP-2), entre outros) (69-73). Distúrbios que levem ao desequilíbrio entre esses mecanismos são decisivos para o desencadeamento precoce de IF/TA nos enxertos renais. A degradação insuficiente e/ou a produção exagerada de matriz extracelular aparentemente promovem o início de IF/TA (73).

A avaliação da gravidade da nefropatia crônica do enxerto é realizada pela classificação de Banff, proposta em 1997 e posteriormente atualizada em 2005, 2007 e 2009 (10, 74-77). Os achados mais específicos relacionados à NCE determinam alterações glomerulares e vasculares; no entanto, o estadiamento

de gravidade é definido levando-se em conta o grau de fibrose intersticial e de atrofia e/ou destruição tubular, caracterizando, assim, três diferentes estágios:

- Grau I – fibrose intersticial leve (entre 6 e 25% da cortical) e atrofia tubular leve (até 25% dos túbulos corticais) com ou sem alterações glomerulares ou vasculares sugestivas de NCE.

- Grau II – fibrose intersticial moderada (25 a 50% do córtex) e atrofia tubular moderada (26 a 50% dos túbulos corticais) com ou sem alterações glomérulo-vasculares compatíveis com NCE.

- Grau III – fibrose intersticial extensa (mais de 50% da cortical) e atrofia tubular importante (mais de 50% dos túbulos corticais) com ou sem alterações glomérulo-vasculares de NCE.

A evidência histopatológica de NCE correlaciona-se com o desenvolvimento de desfechos adversos em longo prazo, como elevação dos níveis séricos de creatinina e taxas reduzidas de sobrevida do enxerto (78, 79). Estudo que avaliou 282 biópsias protocolares, obtidas a cada 3 meses e realizadas em 280 pacientes transplantados renais, verificou que após 10 anos de seguimento a sobrevida do enxerto era de 95, 82 e 41%, respectivamente, em pacientes sem NCE, com NCE mas sem vasculopatia, e com NCE e vasculopatia (79).

Regimes de imunossupressão que contenham inibidores de calcineurina têm sido identificados como um dos principais gatilhos para o desenvolvimento de NCE. Estudo citado previamente identificou achados histopatológicos compatíveis com nefrotoxicidade por inibidores de calcineurina em praticamente todos os pacientes ao final de 10 anos de seguimento (9).

Outros imunossuppressores, no entanto, têm sido apontados como protetores em relação ao desenvolvimento de NCE, tais como os inibidores da mTor e os derivados do ácido micofenólico. Revisão sistemática realizada em 2009 avaliou 12 ensaios clínicos randomizados, com um total de 635 pacientes, com nefropatia crônica do enxerto em uso de ciclosporina. Os pacientes eram randomizados para conversão a esquemas imunossuppressores contendo micofenolato, tacrolimus, rapamicina ou azatioprina, em diferentes combinações. A análise dos resultados sugere que a suspensão de ciclosporina nesses pacientes é segura, sem risco aumentado de rejeição do enxerto, e que o uso de ácido micofenólico e rapamicina parece apresentar benefícios com relação à ciclosporina, proporcionando redução dos níveis séricos de creatinina e retardo na progressão de alterações histológicas de NCE. A qualidade dos estudos, porém, era muito heterogênea, dificultando não só a realização de comparações como também o embasamento necessário para indicar modificações terapêuticas. Novos estudos devem ser realizados para que se chegue à definição do melhor esquema imunossupressor no que concerne à prevenção de NCE (80).

2.6. Diagnóstico da nefropatia crônica do enxerto

O diagnóstico da NCE é inicialmente presumido pela perda progressiva de função renal, em geral identificada a partir do sexto mês pós-transplante. Realização de ultrasonografia do enxerto e mensuração da proteinúria podem auxiliar na confirmação diagnóstica, mas o padrão-ouro continua sendo a realização de biópsia renal.

A biópsia renal percutânea é uma ferramenta importante no diagnóstico das doenças renais, em especial no transplante renal. Os resultados obtidos com esse exame são úteis para guiar diferentes terapias como também para determinar o prognóstico associado às afecções renais. O objetivo é extrair o máximo de tecido adequado para avaliação minimizando o risco de complicações, o que vem sendo obtido mais facilmente após a introdução da ecografia (81).

Complicações maiores associadas à realização de biópsia renal incluem hematúria macroscópica e hematoma retroperitoneal com necessidade de transfusão sanguínea, procedimentos invasivos ou intervenção cirúrgica; a incidência desses eventos varia de menos de 1% a até 6% dos procedimentos, dependendo da série avaliada (82-86).

Complicações menores, tais como hematúria macroscópica transitória ou hematoma subcapsular sem necessidade de transfusão ou intervenção, ocorreram em 6,6% das biópsias em uma das séries (84).

A maioria dos hematomas apresenta resolução espontânea dentro de poucas semanas após o procedimento, sem desenvolvimento de sequelas significativas. Complicações hemorrágicas que não respondem ao manejo conservador exigem intervenções adicionais, sejam cirúrgicas (com nefrectomia) ou através de embolização seletiva do vaso sangrante (81). Artigo de revisão relatou a ocorrência de 0,3% de complicações maiores e menos de 0,1% de mortes em 9.595 biópsias renais percutâneas realizadas ao longo de 50 anos (85).

No entanto, em pacientes transplantados renais o surgimento de complicações graves associadas à realização de biópsia renal pode determinar a perda do enxerto (o único rim funcionante) e o retorno à hemodiálise. Além disso, amostras adequadas nem sempre são obtidas, exigindo a repetição do procedimento e multiplicação dos riscos (11, 12).

O diagnóstico histológico de nefropatia crônica do enxerto é determinado pela identificação de fibrose e atrofia tubular, alterações consideradas crônicas e de difícil reversibilidade após sua instalação (11). Dessa forma, métodos mais seguros e que possibilitem a identificação precoce de NCE são necessários para o melhor tratamento de pacientes submetidos a transplante renal.

2.7. Diagnóstico não-invasivo

A monitorização pós-transplante atualmente baseia-se no acompanhamento da função do enxerto tipicamente pela avaliação dos níveis séricos de creatinina. Alterações agudas dos parâmetros funcionais sugerem o desenvolvimento de rejeição aguda ou, a longo prazo, de nefropatia crônica do enxerto, mas a confirmação desses diagnósticos requer a realização da biópsia renal, um procedimento invasivo. O diagnóstico realizado dessa forma reconhece processos imunes já estabelecidos, em geral em estágios avançados de injúria tecidual, não sendo útil em identificar eventos subclínicos em andamento (Figura 2) (12).

Biópsias protocolares têm sido realizadas a fim de detectar rejeição aguda e outros eventos intra-enxerto antes que ocorra a disfunção renal (87). No entanto, o diagnóstico de processos imunológicos subclínicos requer múltiplas biópsias, e erros de amostragem podem enviesar o diagnóstico histológico; os custos associados ao procedimento também devem ser considerados (81, 88).

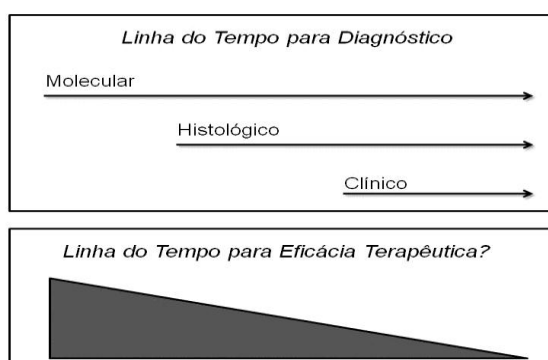


Figura 3 - *Linha do tempo para diagnóstico e tratamento de processos imunológicos intra-renais.* O diagnóstico molecular precede o surgimento de alterações histológicas, que por sua vez precedem o desenvolvimento de alterações clínicas. Especula-se que a eficácia do tratamento é maior em estágios precoces do processo. Adaptado de (12).

Padrões de expressão gênica e/ou proteica coletados de forma não invasiva em diferentes tecidos ou fluidos biológicos têm sido investigados como biomarcadores de processos imunológicos (89 - 92). Ferramentas que possibilitem o diagnóstico não-invasivo apresentam muitas vantagens com relação à realização de biópsia, incluindo a possibilidade de avaliações frequentes e sequenciais do *status* imunológico do receptor (12). Alterações moleculares em geral precedem não apenas a disfunção do enxerto como também alterações histológicas – vide Figura 3. Os parâmetros moleculares

podem, ainda, guiar a minimização da imunossupressão e a individualização da terapia imunossupressora – um passo importante para a redução de inúmeros efeitos adversos associados aos imunossupressores, principalmente no que concerne à prevenção de nefropatia crônica do enxerto, associada à nefrotoxicidade (12, 92). Uma estratégia baseada em diagnóstico molecular que incorpore uma série de marcadores, ilustrativos dos diferentes processos imunobiológicos que ocorrem no enxerto, poderia não só substituir os procedimentos invasivos, mas também disponibilizar informações diagnósticas e prognósticas, além de possibilitar uma compreensão mais ampla das alterações imunológicas associadas ao transplante renal (12).

A maioria dos estudos até o momento manteve o foco sobre rejeição aguda, um dos mais importantes determinantes da sobrevida dos enxertos em longo prazo. Estudos prévios do nosso grupo demonstraram a possibilidade de se diagnosticar molecularmente as rejeições subclínicas e as clinicamente manifestas (13, 14). Demonstramos, também, que as avaliações moleculares em compartimentos periféricos como o sangue e a urina refletem, com elevada acurácia, os eventos existentes no órgão transplantado (14, 15).

No entanto, com a NCE surgindo como um dos principais fatores associados à disfunção do enxerto e principal causa de falência dos transplantes renais, vários pesquisadores têm buscado métodos diagnósticos não-invasivos para esta condição. Dados recentes sugerem que a expressão diferenciada de vários transcritos em células urinárias pode tornar-se um biomarcador válido para NCE (71, 93-95). Vários laboratórios têm desenvolvido ferramentas não-invasivas para definir subgrupos moleculares de processos

crônicos associados ao transplante renal e capazes de detectar atividade fibrogênica antes do desenvolvimento de lesão renal estabelecida (12). A diferenciação entre rejeição crônica e nefrotoxicidade associada à ciclosporina também é um desafio que pode ser ultrapassado com a utilização de técnicas moleculares, refinando o manejo terapêutico de ambas as patologias (95).

No entanto, ainda são poucos os trabalhos dedicados ao estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na NCE. A avaliação de técnicas que permitam o diagnóstico não-invasivo de nefropatia crônica do enxerto é um campo de estudo promissor, possibilitando não só o diagnóstico precoce mas também a modificação do prognóstico associado à NCE (12).

2.8. Técnica de PCR em tempo real - RT-PCR

PCR em tempo real é uma reação quantitativa altamente sensível e que permite a quantificação de transcritos raros, detectando pequenas variações na expressão gênica (96). Essa técnica constitui-se em um avanço significativo com relação à PCR tradicional, uma vez que permite monitorar a reação de PCR enquanto os ciclos se sucedem e detectar o produto da amplificação à medida que ele está sendo formado, abreviando a necessidade de se observar o resultado final em gel de eletroforese. O sistema da PCR em tempo real é baseado na detecção e quantificação de um corante fluorescente, cujo sinal aumenta em proporção direta à quantidade de fragmento amplificado na reação de PCR, de tal forma que, quanto maior o número de fragmentos amplificados, maior será a fluorescência emitida (Figura 4) (97).

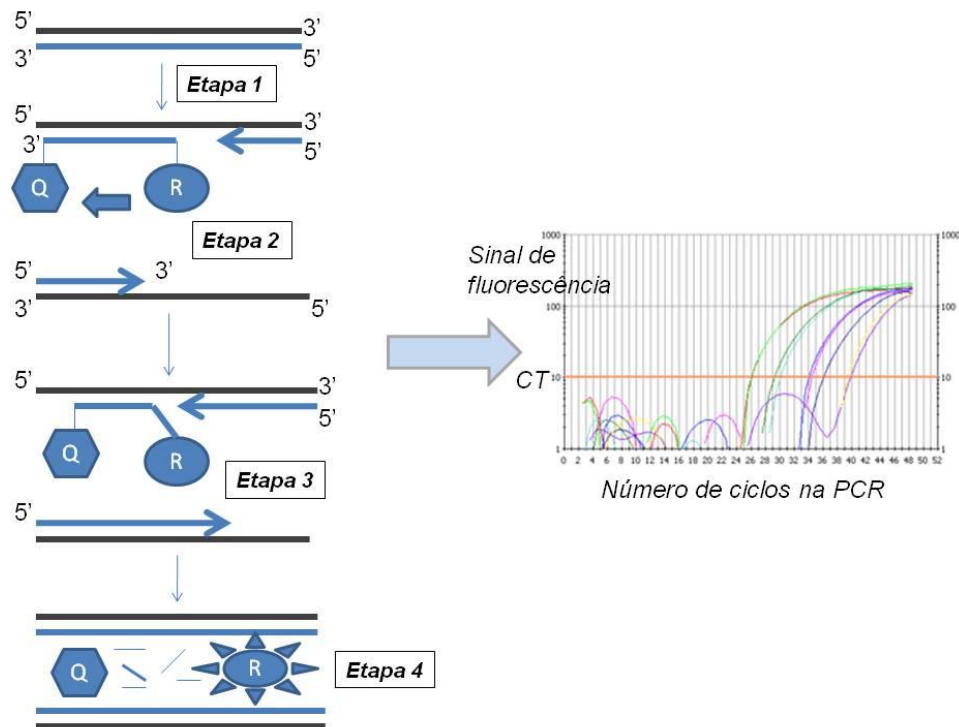


Figura 4. Reação de PCR em tempo real. Etapa 1 – desnaturação e anelamento de sonda e primers. Etapa 2 – absorção da fluorescência. Etapa 3 – deslocamento da sonda. Etapa 4 – Degradação da sonda. O sinal de fluorescência emitido é detectado pelo aparelho e gera curvas de fluorescência. CT – *cycle threshold* (limite de detecção); Q – *quencher*, R – repórter. Adaptado de (97).

O advento desta técnica quantitativa eliminou a variabilidade tradicionalmente associada à PCR convencional, semi-quantitativa, e permitiu a quantificação confiável de produtos de PCR na rotina clínica. Atualmente esta técnica é comumente utilizada para determinar a expressão gênica de mRNAs em seus diversos níveis. As análises podem ser absolutas, como no número de cópias de mRNA em comparação a uma curva padrão, ou relativas a um calibrador pela análise por curva padrão ou pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (98).

Diversos mecanismos celulares que dizem respeito à sobrevivência, crescimento e diferenciação são refletidos por padrões alterados de expressão

gênica e a habilidade de quantificar níveis transcripcionais de genes específicos tem sido de fundamental importância para qualquer pesquisa sobre as funções de um gene específico (99). A RT-PCR, por permitir a amplificação de sequências definidas de cDNA, pode ser utilizada para caracterizar padrões de expressão de mRNAs em patologias específicas, em diferentes tecidos ou amostras. A PCR convencional não proporciona a obtenção de resultados quantitativos, exceto na modalidade denominada PCR competitivo - trabalhosa, artesanal e de difícil reprodutibilidade, limitações que foram suplantadas após o advento dessa nova técnica (100).

2.9. Genes em estudo

2.9.1. Domínios de mucina e imunoglobulina de célula T - 3 (*T cell immunoglobulin domain, mucin domain - 3*) – **TIM-3**

TIM-3 é um gene polimórfico pertencente a uma família de genes (TIM) expressos em células Th1 diferenciadas, composta por oito proteínas descritas em ratos e três em humanos (101). TIM-3, uma proteína de membrana tipo I, foi originalmente identificada a partir de uma busca por marcadores específicos de células Th1; após seu reconhecimento, tem sido encontrada em células T CD8+ citotóxicas, Th17, células T reguladoras (Tregs), monócitos, células dendríticas, mastócitos e micróglia (101-106).

Estudos genéticos realizados em ratos e em humanos, assim como dados epidemiológicos, ligaram a família TIM ao desenvolvimento de infecções virais e manifestações atópicas, indicando sua associação a importantes

processos imunológicos (90, 107, 108). TIM-3, especificamente, tem sido associado a doenças auto-imunes, indução de tolerância e regulação de respostas imunes mediadas por Th1 (101, 103, 109-113). Expressão aumentada de TIM-3 também foi descrita em enxertos renais de pacientes nefrectomizados por rejeição aguda (114).

Renesto e colaboradores estudaram a utilização de TIM-3 como marcador de rejeição aguda (RA) em células do sedimento urinário. Níveis elevados de TIM-3 foram encontrados em pacientes com RA, sugerindo a possibilidade de utilização desta metodologia como uma ferramenta não-invasiva promissora para a avaliação das disfunções dos enxertos renais (115).

Esta mesma molécula foi estudada de forma pareada em tecido, células do sedimento urinário e do sangue periférico por Manfro e colaboradores em pacientes com disfunção inicial do enxerto (DGF) e com disfunção aguda de enxertos renais. Nos casos de DGF, a avaliação dos parâmetros diagnósticos para RA apresentou acurácia de 100% nos dois compartimentos periféricos na diferenciação de necrose tubular aguda. Nos casos de disfunção aguda do enxerto as acurácias foram em torno de 90% na diferenciação entre RA de nefrotoxicidade por IC, IF/TA e rins normais (14).

2. *Fator transcricional “forkhead” ligado ao X P3 (transcription factor forkhead box P3) - **FOXP3***

Estudos recentes têm demonstrado o papel de um subgrupo especializado de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ (chamados de linfócitos T reguladores, ou Tregs)

na supressão da auto-imunidade (116, 117). Células Tregs expressam especificamente o fator transcricional “forkhead” ligado ao X, FOXP3, e mutações no gene FOXP3 resultam em uma doença autoimune caracterizada por poliendocrinopatia e enteropatia que é fatal na infância (118-120). Ratos masculinos com perda de função do gene FOXP3 definham e morrem com 3 a 4 semanas de vida, com infiltrados linfocíticos difusos; esse processo é revertido com a transferência do gene (118, 121, 122).

A expressão de FOXP3 está restrita às Tregs em ratos (56) e predominantemente às Tregs em humanos (o receptor de células T – TCR – também induz a expressão transitória de FOXP3 em células humanas não reguladoras) (65).

Análises dos promotores de FOXP3 demonstraram que vários sinais extracelulares podem induzir a expressão de FOXP3 em células nativas. Os sinais mediados pela ligação do TCR desencadeiam tanto a expressão de FOXP3 como a transcrição proteica (65). Um achado interessante é que esta expressão mediada pelos TCRs é bloqueada pela ciclosporina, indicando que alguns imunossupressores podem bloquear a indução de Tregs em receptores de transplante quando suas células T encontram os alo-antígenos (55, 65).

FOXP3 regula a ativação e função de células T em um processo dose-dependente e a expressão de FOXP3 em células maduras é necessária para manter programas transcricionais estabelecidos durante a sua atividade, sugerindo que um nível mínimo sustentado de expressão de FOXP3 seja necessário para garantir a estabilidade da linhagem de Tregs (123, 124). Essa expressão sustentada pode ser alcançada através da constante exposição alo-

antigênica após o transplante, enquanto a função do enxerto é mantida. Análises detalhadas de pacientes com elevação de mRNA de FOXP3 em células urinárias durante episódios de rejeição aguda demonstraram que altos níveis de FOXP3 mRNA são associados a rejeições agudas reversíveis, e baixos níveis são associados a falência do enxerto. Isso indica que, durante o episódio de rejeição aguda, Tregs podem limitar as respostas imunes alo-antigênicas, e que a perda de regulação por parte das Tregs pode resultar em atividade imune irrefreada, induzindo a falência do enxerto (63). Esses achados são também ilustrativos do potencial do FOXP3 como marcador de processos de tolerância ao enxerto e episódios de rejeição (55).

A utilização de FOXP3 para diagnóstico de rejeição aguda foi testada em estudo de Muthukumar e colaboradores (63). Foram analisadas amostras de células urinárias de 36 pacientes com rejeição aguda, 18 pacientes com NCE e 29 pacientes sem alterações à biópsia renal. Os níveis de mRNA FOXP3 correlacionaram-se inversamente aos níveis séricos de creatinina no momento da biópsia no grupo com rejeição aguda, o que não ocorreu nos outros dois grupos. FOXP3 demonstrou apresentar sensibilidade de 90% e especificidade de 73% em prever a reversibilidade de episódios de rejeição aguda. Além disso, a análise do mRNA FOXP3 permitiu identificar pacientes em risco para o desenvolvimento de falência do enxerto 6 meses após o episódio de RA.

Estudo de Aquino-Dias e colaboradores também demonstraram que a análise da expressão de FOXP3 pode ser utilizada para prever, de forma não invasiva, episódios de rejeição aguda, com sensibilidade, especificidade,

valores preditivos positivo e negativo, e acurácia entre 94 e 100%, tanto quando avaliado em sangue como também em células urinárias (15).

2.9.3. *Molécula de injúria renal – 1 (kidney injury molecule-1) - KIM-1*

KIM-1 é uma proteína transmembrana recentemente descoberta, indetectável em rins normais mas marcadamente presente em células do epitélio tubular submetidas a diferentes agressões (125-129). A fração externa de KIM-1 pode ser encontrada na urina; estudos prévios demonstraram que a excreção urinária de KIM-1 é relacionada ao grau de dano renal presente em modelos experimentais e, em humanos, em várias doenças de caráter inflamatório e pró-fibrótico (129-131).

Os principais estudos envolvendo medidas de KIM-1 na urina têm sido realizados com vistas à detecção precoce de injúria túbular, e, em última instância, de insuficiência renal aguda (126, 131-133) Um dos primeiros trabalhos nessa área foi realizado por Bonventre e colaboradores, identificando uma associação forte entre a presença de níveis elevados de KIM-1 na urina e o desenvolvimento de necrose tubular aguda (126).

Em transplante renal, a excreção urinária de KIM-1 foi considerada um fator independente para perda do enxerto a longo prazo e um promissor novo biomarcador para a identificação precoce de perda do enxerto (134, 135). Estudo realizado por Nogare e colaboradores associou a expressão de mRNA KIM-1 em tecido renal ao dano tubular presente em nefrotoxicidade por IC e IF/TA, alterações características de NCE (136).

2.9.4. *Fator transformador de crescimento beta (transforming growth factor beta) – TGF- β*

O fator transformador de crescimento beta, ou TGF- β , regula numerosos processos celulares em uma ampla variedade de tecidos. Tem um papel central na regulação do desenvolvimento, diferenciação e cicatrização celular, atuando na iniciação e progressão de várias desordens que culminam com desenvolvimento de fibrose tecidual (137, 138). Sua habilidade característica de estimular a proliferação de células mesenquimais e inibir a proliferação de células endoteliais e epiteliais não é compartilhada por outros fatores estimuladores ou inibidores do crescimento (139). A secreção de TGF- β por plaquetas, macrófagos e neutrófilos induz uma série de eventos que determinam a produção de tecido conjuntivo, essencial na cicatrização mas que pode tornar-se excessiva em desordens pró-fibróticas (137, 139).

TGF- β faz parte da cascata de citocinas envolvidas na reparação tecidual, e existem várias evidências demonstrando suas propriedades pró-fibróticas (137, 140-142). Associa-se a inúmeros processos fisiológicos, incluindo sua habilidade de promover a produção de componentes da matriz extracelular (fibronectina, colágenos e proteoglicanos), aumentar a expressão de integrinas e reduzir a atividade das proteases que degradam a matriz extracelular (141, 142). Além disso, atua na modulação da hematopoese, na regulação da secreção hormonal, na ativação da resposta alo-imune e na angiogênese (143).

Uma vez caracterizado como a citocina chave no processo de indução de fibrose tecidual, estudos recentes demonstraram o envolvimento do TGF- β na

patogênese da nefropatia crônica do enxerto (137, 144). As proteínas que fazem parte da superfamília do TGF- β são os fatores de crescimento derivados de macrófagos mais extensivamente estudados que apresentam ligação com o desenvolvimento de fibrose renal (142, 145). Observa-se expressão de mRNA de TGF- β em enxertos renais de pacientes com IF/TA e nefropatia crônica do enxerto, enfatizando a associação de TGF- β à gênese de NCE (140). Estudo que avaliou a produção de interleucina-10 (citocina envolvida na modulação da alo-imunidade) e TGF- β em pacientes transplantados renais de longa data sugeriu, ainda, que níveis reduzidos de TGF- β estão associados a maior sobrevida do enxerto renal, o que pode ser de importância significativa também na indução de mecanismos de tolerância e aceitação imunológica (143). Além disso, a associação entre o uso de ciclosporina e níveis plasmáticos elevados de TGF- β foi demonstrada em diversos estudos, corroborando o papel dos inibidores da calcineurina no desenvolvimento de NCE (137, 146-149).

2.9.5. *Fator de crescimento do tecido conjuntivo (connective tissue growth factor) - **CTGF***

O fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) foi isolado inicialmente em células endoteliais humanas de veias umbelicais (150). Pertence a uma família de proteínas residentes na matriz extracelular, cuja atividade modula uma série de processos celulares críticos para a homeostase do ambiente extracelular. A síntese e secreção do CTGF é seletivamente induzida pelo TGF- β em células do tecido conjuntivo, e parece servir como supressor, pelo menos em parte, das atividades pró-fibróticas do próprio TGF- β (151, 152).

CTGF determina inúmeras respostas celulares, incluindo a proliferação celular, síntese do colágeno e quimiotaxia de diversas células (153). Tem sido demonstrado o papel essencial do CTGF no processo de transição de células epiteliais a mesenquimais, no qual as células modificam sua morfologia a fim de produzir tecido cicatricial. Relatos recentes sugerem que CTGF esteja envolvido não só na síntese de colágeno como também na diferenciação de miofibroblastos (154). Apresenta expressão aumentada em patologias caracterizadas por fibrose cutânea e sistêmica, nas quais a formação de tecido cicatricial de forma crônica e persistente acarreta disfunção e falência orgânica, a exemplo da esclerodermia (155, 156). No entanto, o papel exato do CTGF nos processos de atrofia e fibrose não se encontra totalmente elucidado (151). Além disso, até o momento não foi reportada a expressão de CTGF em células do sistema imunológico, e não existem estudos que o associem à modulação de inflamação ou de respostas imunes (152).

Tem sido implicado na patogênese dos estágios iniciais de doença renal crônica, associando-se inclusive com o desenvolvimento de alterações podocitárias e proteinúria (157-161). Mais recentemente, tem sido associado a injúria crônica de enxertos em modelos experimentais, e vem sendo explorado como possível biomarcador de nefropatia crônica do enxerto (151, 162-164).

Capítulo 3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) delinear o perfil de expressão de RNA mensageiro de diversos genes, em células de sangue periférico e do sedimento urinário, associado aos diferentes regimes de imunossupressão em pacientes transplantados renais.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar de forma quantitativa a expressão de genes associados a diversos mecanismos presentes no desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto e de outras condições que afetem os enxertos renais:

- **FOXP3** – gene associado ao desenvolvimento de tolerância;
- **TIM-3** – gene envolvido na regulação dos processos de alo-imunidade;
- **TGF- β** e **CTGF** – genes envolvidos no desenvolvimento de fibrose tecidual;
- **KIM-1** – gene marcador de injúria tubular aguda e possivelmente de fibrose intersticial e atrofia tubular renal.

Capítulo 4. Referências bibliográficas

1. Chandraker A, Iacomini JJ, Sayegh MH. Transplantation immunobiology. In Brenner: Brenner and Rector's The Kidney, 8th ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p. 2103-2122.
2. Goodman WG, Danovitch G. Options for patients with kidney failure. In Handbook of kidney transplantation, 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2005. p. 1-22.
3. Schnuelle, P; Lorenz, D; Trede, M et al. Impact of renal cadaveric transplantation on survival in end-stage renal failure: Evidence for reduced mortality risk compared with hemodialysis during long-term follow-up. J Am Soc Nephrol 1998; 9:2135.
4. Port, FK, Wolfe, RA, Mauger, EA, et al. Comparison of survival probabilities for dialysis patients versus cadaveric renal transplant recipients. JAMA 1993; 270:1339.
5. Ojo, AO, Port, FK, Wolfe, RA, et al. Comparative mortality risks of chronic dialysis and cadaveric transplantation in black end-stage renal disease patients. Am J Kidney Dis 1994; 24:59.
6. Wolfe, RA, Ashby, VB, Milford, EL et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. N Engl J Med 1999; 341:1725.
7. Meier-Kriesche, HU, Ojo, AO, Port, FK et al. Survival improvement among patients with end-stage renal disease: trends over time for transplant recipients and wait-listed patients. J Am Soc Nephrol 2001; 12:1293.
8. Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. Transplantation 2006;81: 643–654.

9. Nankivell BJ, Borrows RJ, Chir B et al. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349:2326-33.
10. Solez, K, Colvin, RB, Racusen, LC et al. Banff '05 meeting report: Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; 7:518.
11. Maluf DG, Mas VR, Archer KJ. Molecular pathways involved in loss of kidney graft function with tubular atrophy and interstitial fibrosis. *Mol Med* 2008; 14:276-85.
12. Anglicheau D, Suthanthiran M. Noninvasive prediction of organ graft rejection and outcome using gene expression patterns. *Transplantation* 2008;86: 192–199.
13. Aquino-Dias EC, Veronese FJ, Santos Gonçalves LF et al. Molecular markers in subclinical acute rejection of renal transplants. *C Transplant.* 2004;18:281-287.
14. Manfro RC, Aquino-Dias EC, Joelsons G et al. Noninvasive Tim-3 messenger RNA evaluation in renal transplant recipients with graft dysfunction. *Transplantation* 2008; 86:1869–1874.
15. Aquino-Dias EC, Joelsons G, da Silva DM et al. Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney Int.* 2008;73:877-884.
16. U.S. Renal Data System, *USRDS 2000 Annual Data Report.: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States*, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2000.

17. Censo SBN 2008 – disponível em www.sbn.com.br
18. Ministério da Saúde – www.saude.gov.br
19. McClellan, WM; Anson, C; Birkeli, K et al. Functional status and quality of life: predictors of early mortality among patients entering treatment for end stage renal disease. *J Clin Epidemiol* 1991; 44:83.
20. DeOreo, PB. Hemodialysis patient-assessed functional health status predicts continued survival, hospitalization, and dialysis-attendance compliance. *Am J Kidney Dis* 1997; 30:204.
21. Cecka JM. The UNOS Renal Transplant Registry. *Clin Transpl* 2002: 1–20.
22. Starzl TE, Klintmalm GB, Weil III R et al. Cyclosporin A and steroid therapy in sixty-six cadaver kidney recipients. *Surg Gynecol Obstet* 1981; 153: 486–494.
23. Waller JR, Nicholson ML. Molecular mechanisms of renal allograft fibrosis. *Br J Surg* 2001; 88: 1429–1441.
24. Safinia N, Afzali B, Atalar K et al. T-cell alloimmunity and chronic allograft dysfunction. *Kidney Int* 2010; 78: S2–S12.
25. Sherman LA, Chattopadhyay S. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 385–402.
26. Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pack M et al. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med* 1990; 172: 1483–1493.
27. Lakkis FG, Arakelov A, Konieczny BT, Inoue Y. Immunologic ‘ignorance’ of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nat Med* 2000; 6: 686–688.

28. Sandner SE, Salama AD, Houser SL et al. New TCR transgenic model for tracking allospecific CD4 T-cell activation and tolerance in vivo. *Am J Transplant* 2003; 3: 1242–1250.
29. Reed AJ, Noorchashm H, Rostami SY et al. Alloreactive CD4 T cell activation in vivo: an autonomous function of the indirect pathway of alloantigen presentation. *J Immunol* 2003; 171: 6502–6509.
30. Bal V, McIndoe A, Denton G et al. Antigen presentation by keratinocytes induces tolerance in human T cells. *Eur J Immunol* 1990; 20: 1893–1897.
31. Lombardi G, Arnold K, Uren J et al. Antigen presentation by interferongamma- treated thyroid follicular cells inhibits interleukin-2 (IL-2) and supports IL-4 production by B7-dependent human T cells. *Eur J Immunol* 1997; 27: 62–71.
32. Marelli-Berg FM, Weetman A, Frasca L et al. Antigen presentation by epithelial cells induces anergic immunoregulatory CD45RO+ T cells and deletion of CD45RA+ T cells. *J Immunol* 1997; 159: 5853–5861.
33. O'Connell PJ, Pacheco-Silva A, Nickerson PW et al. Unmodified pancreatic islet allograft rejection results in the preferential expression of certain T cell activation transcripts. *J Immunol* 1993; 150: 1093–1104.
34. Nickerson P, Steurer W, Steiger J et al. Cytokines and the Th1/Th2 paradigm in transplantation. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 757–764.
35. Miura M, El-Sawy T, Fairchild RL. Neutrophils mediate parenchymal tissue necrosis and accelerate the rejection of complete major histocompatibility complex-disparate cardiac allografts in the absence of interferon-gamma. *Am J Pathol* 2003; 162: 509–519.

36. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 2004; 5: 1260–1265.
37. Sawitzki B, Kingsley CI, Oliveira V et al. IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo. *J Exp Med* 2005; 201: 1925–1935.
38. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 148: 32–46.
39. Loong CC, Hsieh HG, Lui WY et al. Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection. *J Pathol* 2002; 197: 322–332.
40. Van Kooten C, Boonstra JG, Paape ME et al. Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1526–1534.
41. Antonysamy MA, Fanslow WC, Fu F et al. Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. *J Immunol* 1999; 162: 577–584.
42. Yuan X, Ansari MJ, D'Addio F et al. Targeting Tim-1 to overcome resistance to transplantation tolerance mediated by CD8 T17 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 10734–10739.
43. Yuan X, Paez-Cortez J, Schmitt-Knosalla I et al. A novel role of CD4 Th17 cells in mediating cardiac allograft rejection and vasculopathy. *J Exp Med* 2008; 205: 3133–3144.

44. Boenisch O, D'Addio F, Watanabe T et al. TIM-3: a novel regulatory molecule of alloimmune activation. *J Immunol.* 2010;185:5806-19.
45. Sykes M. Immune tolerance: mechanisms and application in clinical transplantation. *J Intern Med* 2007; 262: 288-310.
46. Takatsuki M, Uemoto S, Inomata Y et al. Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. *Transplantation* 2001; 72: 449–454.
47. Lerut J, Sanchez-Fueyo A. An appraisal of tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 1774–1780.
48. Tisone G, Orlando G, Cardillo A et al. Complete weaning off immunosuppression in HCV liver transplant recipients is feasible and favourably impacts on the progression of disease recurrence. *J Hepatol* 2006; 44: 702–709.
49. Calne RY, Sells RA, Pena JR et al. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 1969; 223: 472–476.
50. Kamada N. The immunology of experimental liver transplantation in the rat. *Immunology* 1985; 55: 369–389.
51. Ramsdell F, Fowlkes BJ. Clonal deletion versus clonal anergy: the role of the thymus in inducing self tolerance. *Science* 1990; 248: 1342-1348.
52. Morecki S, Leshem B, Eid A et al. Alloantigen persistence in induction and maintenance of transplantation tolerance. *J Exp Med* 1987; 165: 1468-1480.
53. Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology.* 1971; 21: 903-14.
54. Dorf ME, Benacerraf B. Suppressor cells and immunoregulation. *Annu Rev Immunol.* 1984; 2: 127-57.

55. Long E, Wood KJ. Understanding FOXP3: progress towards achieving transplantation tolerance. *Transplantation* 2007; 84: 459–461.
56. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nature Rev Immunol* 2003; 3:199.
57. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057.
58. Cupedo T, Nagasawa M, Weijer K et al. Development and activation of regulatory T cells in the human fetus. *Eur J Immunol* 2005; 35: 383.
59. Vukmanovic-Stejic M, Zhang Y, Cook JE et al. Human CD4⁺CD25^{hi} Foxp3⁺ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J Clin Invest* 2006; 116: 2423.
60. Karim M, Kingsley CI, Bushell AR et al. Alloantigen-induced CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells can develop in vivo from CD25⁻CD4⁺ precursors in a thymus-independent process. *J Immunol* 2004; 172: 923.
61. Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E et al. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest* 2006; 116: 1713-1722.
62. Louis S, Braudeau C, Giral M et al. Contrasting CD25^{hi}CD4⁺ T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* 2006; 81: 398-407.
63. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 2005; 353: 2342-51.
64. Segundo DS, Ruiz JC, Izquierdo M et al. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation* 2006; 82: 550-7.

65. Mantel PY, Ouaked N, Ruckert B et al. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol* 2006; 176: 3593.
66. Gao W, Lu Y, El Essawy B et al. Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *Am J Transplant.* 2007;7:1722-1732.
67. Fischer RT, Turnquist HR, Wang Z et al. Rapamycin-conditioned, alloantigen-pulsed myeloid dendritic cells present donor MHC class I/peptide via the semi-direct pathway and inhibit survival of antigen-specific CD8(+) T cells in vitro and in vivo. *Transpl Immunol.* 2011. [Epub ahead of print]
68. Coenen JJ, Koenen HJ, van Rijssen E et al. Rapamycin, not cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of CD4+ CD25+ FoxP3+ T cells. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39:537-545.
69. Campistol JM, Inigo P, Larios S et al. Role of transforming growth factor-beta1 in the progression of chronic allograft nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 114–116.
70. Sharma VK, Bologna RM, Xu GP et al. Intragraft TGF-beta 1 mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 1996; 49: 1297–1303.
71. Mas V, Maluf D, Archer K et al. Establishing the molecular pathways involved in chronic allograft nephropathy for testing new noninvasive diagnostic markers. *Transplantation* 2007; 83: 448–457.
72. Cheng O, Thuillier R, Sampson E et al. Connective tissue growth factor is a biomarker and mediator of kidney allograft fibrosis. *Am J Transplant* 2006; 6: 2292–2306.

73. Mengel M, Bock O, Priess M et al. Expression of pro- and antifibrotic genes in protocol biopsies from renal allografts with interstitial fibrosis and tubular atrophy. *Clin Nephrol*. 2008;69:408-16.
74. Racusen, LC, Solez, K, Colvin, RB et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55:713.
75. Sis, B, Mengel, M, Haas, M et al. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant* 2010; 10:464.
76. Solez, K, Colvin, RB, Racusen, LC et al. Banff '05 meeting report: Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; 7:518.
77. Sis, B, Jhangri, GS, Bunnag, S et al. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant* 2009; 9:2312.
78. Seron, D, Moreson, F, Bover, J et al. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 1997; 51:310.
79. Nickerson, P, Jeffery, J, Gough, J et al. Identification of clinical and histopathologic risk factors for diminished renal function 2 years posttransplant. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:482.
80. Birnbaum, LM, Lipman, M, Paraskevas, S et al. Management of chronic allograft nephropathy: a systematic review. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4:860.
81. Magee CC, Ansari MJ, Milford EL. Clinical management. In Brenner: Brenner and Rector's *The Kidney*, 8th ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p. 2138-2165.

82. Maya ID, Maddela P, Barker J et al. Percutaneous renal biopsy: comparison of blind and real-time ultrasound-guided technique. *Semin Dial* 2007; 20:355-358.
83. Hergessel O, Felten H, Andrassy K et al: Safety of ultrasound-guided percutaneous renal biopsy—retrospective analysis of 1090 consecutive vases. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13:975-977.
84. Marwah DS, Korbet SM: Timing of complications in percutaneous renal biopsy: What is the optimal time of observation?. *Am J Kidney Dis* 1996; 28:47-52.
85. Toledo K, Pérez MJ, Espinosa M et al. Complications associated with percutaneous renal biopsy in Spain, 50 years later. *Nefrologia*. 2010;30:539-43.
86. Mishra A, Tarsin R, Elhabbash B et al. Percutaneous ultrasound-guided renal biopsy: A Libyan experience. *Indian J Nephrol*. 2010;20:76-9.
87. Racusen LC. Protocol transplant biopsies in kidney allografts: Why and when are they indicated? *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1: 144.
88. Thauinat O, Legendre C, Morelon E et al. To biopsy or not to biopsy? Should we screen the histology of stable renal grafts? *Transplantation* 2007; 84: 671.
89. Strom TB, Suthanthiran M. Transcriptional profiling to assess the clinical status of kidney transplants. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; 2: 116.
90. Strom TB, Suthanthiran M. Prospects and applicability of molecular diagnosis of allograft rejection. *Semin Nephrol* 2000; 20: 103.
91. Gwinner W. Renal transplant rejection markers. *World J Urol* 2007; 25:445.

92. Hartono C, Dadhania D, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of acute rejection of solid organ transplants. *Front Biosci* 2004; 9: 145.
93. Mas VR, Maluf DG, Archer KJ, et al. Study of mRNA growth factors in urinary cells of kidney transplant recipients as predictors of chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2005; 80: 1686.
94. Mas VR, Mas LA, Archer KJ, et al. Evaluation of gene panel mRNAs in urine samples of kidney transplant recipients as a non-invasive tool of graft function. *Mol Med* 2007; 13: 315.
95. Koop K, Bakker RC, Eikmans M, et al. Differentiation between chronic rejection and chronic cyclosporine toxicity by analysis of renal cortical mRNA. *Kidney Int* 2004; 66: 2038.
96. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:45.
97. Farah, SB. Métodos de análise dos ácidos nucléicos. In *DNA – segredos e mistérios*. 2ª ed, São Paulo: Sarvier, 2007. p. 99-154.
98. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* 2001; 25:402-408.
99. Zamorano PL, Mahesh VB, Brann DW. Quantitative RT-PCR for neuroendocrine studies. A minireview. *Neuroendocrinology* 1996; 63:397-407.
100. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 2000; 25:169-193.

101. Kuchroo VK, Umetsu DT, DeKruyff RH et al. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 454–462.
102. Nakae S, Iikura M, Suto H et al. TIM-1 and TIM-3 enhancement of Th2 cytokine production by mast cells. *Blood* 2007;110:2565–2568.
103. Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 2002;415:536–541.
104. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003;421:744–748.
105. Anderson AC, Anderson DE, Bregoli L et al. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science* 2007;318:1141–1143.
106. Wang F, He W, Zhou H et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates CD8+ alloreactive T cell and prolongs survival of skin graft. *Cellular Immunology* 2007;250:68–74.
107. Pavlakis M, Lipman M, Strom TB. Intragraft expression of T-cell activation genes in human renal allograft rejection. *Kidney Int* 1996;53:S7-S12
108. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M et al. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:695-700.

109. Mcintire JJ, Umetsu SE, Akbari O et al. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat Immunol* 2001;2:1109-1116.
110. Noguchi E, Nakayama M, Kamioka K et al. Insertion/Deletion coding polymorphisms in hHAVcr-I are not associated with atopic asthma in the Japanese population. *Genes Immun* 2003;4: 170-173.
111. Sanchez-Fueyo A, Tian J, Picarella D et al. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat Immunol* 2003 ;4.
112. Sabatos CA, Chakravarti S, Cha E, Schubart A et al. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat Immunol* 2003;4:1102-1110.
113. Khademi M, Illes Z, Gielen A et al. T cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3 (Tim-3) and Tim-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 2004;172: 7169-7176.
114. Ponciano VC, Renesto PG, Nogueira E et al. Tim-3 expression in human kidney allografts. *Transplant Immunology* 2007; 17: 215-222.
115. Renesto PG, Ponciano VC, Cenedeze MA et al. High expression of Tim-3 mRNA in urinary cells from kidney transplant recipients with acute rejection. *Am J Transplant* 2007; 7: 1661–1665.
116. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and nonself. *Nat Immunol* 2005; 6: 345-352.

117. Schwartz RH. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol* 2005;6:327-330.
118. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-336.
119. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 2001; 27:18-20.
120. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001; 27:20-21.
121. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA et al. Disruption of a new forkhead/wingedhelix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001; 27:68-73.
122. Khattri R, Cox T, Yasayko SA et al. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003; 4:337-342.
123. Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 2007; 445: 766.
124. Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nature Immunol* 2007; 8: 277.
125. Ichimura T, Hung CC, Yang SA, et al. Kidney Injury Molecule -1 (Kim-1): A tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 286: F552.

126. Han WK, Bailly V, Abichandani R, et al. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 2002; 62: 237.
127. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem* 1998; 273: 4135.
128. Kuehn EW, Park KM, Somlo S, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 expression in murine polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283: F1326.
129. Van Timmeren MM, Bakker SJ, Vaidya VS, et al. Tubular kidney injury molecule-1 in protein-overload nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291: F456.
130. Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, et al. Urinary kidney injury molecule-1: A sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F517.
131. Van Timmeren MM, van den Heuvel MC, Bailly V, et al. Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease. *J Pathol* 2007; 212: 209.
132. Han WK, Alinani A, Wu CL et al. Human kidney injury molecule-1 is a tissue and urinary tumor marker of renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1126–1134.
133. Lin F, Zhang PL, Yang XJ et al. Human kidney injury molecule-1 (hKIM-1): a useful immunohistochemical marker for diagnosing renal cell carcinoma and ovarian clear cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 371–381.

134. Zhang PL, Rothblum LI, Han WK et al. Kidney injury molecule-1 expression in transplant biopsies is a sensitive measure of cell injury. *Kidney Int* 2008; 73: 608–614.
135. van Timmeren MM, Vaidya VS, van Ree RM et al. High urinary excretion of kidney injury molecule-1 is an independent predictor of graft loss in renal transplant recipients. *Transplantation* 2007; 84: 1625–1630.
136. Nogare AL, Joelsons G, Pedroso JA et al. Quantitative analyses of kidney injury molecule-1 messenger RNA in kidney transplant recipients with graft dysfunction. *Transplant Proc.* 2010;42: 473-474.
137. Campistol JM, Iñigo P, Larios S et al. Role of transforming growth factor- β_1 in the progression of chronic allograft nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 114-116.
138. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor- β . *Sci Am Sci Med* 1995; 2: 68-77.
139. Kothapalli D, Hayashi N, Grotendorst GR. Inhibition of TGF- β -stimulated CTGF gene expression and anchorage-independent growth by cAMP identifies a CTGF-dependent restriction point in the cell cycle. *FASEB J* 1998; 12: 1151-1161.
140. Sharma VK, Bologa RM, Xu GP et al. Intragraft TGF- β_1 mRNA: A correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 1996; 49: 1297-1303.
141. Roberts AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β (TGF- β). *Growth Factors* 1993; 8: 1-9.
142. Border WA, Nobel NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-1292.

143. Alberú J, Richaud-Patin Y, Vázquez-Lavista LG et al. In vivo IL-10 e TGF-beta production by PBMC from long-term kidney transplant recipients with excellent graft function: a possible feedback mechanism participating in immunological stability. *Clin Transplant* 2004; 18: 174-178.
144. Shihab FS, Tanner AM, Shao Y et al. Expression of TGF-beta 1 and matrix proteins is elevated in rats with chronic rejection. *Kidney Int* 1996; 53: 639-644.
145. Lee SB, Kalluri R. Mechanistic connection between inflammation and fibrosis. *Kidney Int* 2010; 78: S22–S26.
146. Mohamed MA, Robertson H, Booth T et al. TGF-beta expression in renal transplant biopsies: a comparative study between cyclosporine-A and tacrolimus. *Transplantation* 2000; 69: 1002-1005.
147. Esposito C, Foschi A, Parrilla B et al. Effect of calcineurin inhibitors on extracellular matrix turnover in isolated human glomeruli. *Transplant Proc* 2004; 36: 695-697.
148. Citterio F, Pozzetto U, Romagnoli J et al. Plasma levels of transforming growth factor-beta 1 in renal transplant recipients receiving different immunosuppressive regimens. *Transplant Proc* 2004; 36: 698-699.
149. Akool S, Doller A, Babelova A et al. Molecular mechanisms of TGF beta receptor-triggered signaling cascades rapidly induced by the calcineurin inhibitors cyclosporine A and FK506. *J Immunol* 2008; 181: 2831-2845.
150. Bradham DM, Igarashi A, Potter RL et al. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF10. *J Cell Biol* 1991; 114: 1285-1294.

151. Cheng O, Thuillier R, Sampson E et al. Connective tissue growth factor is a biomarker and mediator of kidney allograft fibrosis. *Am J Transplant* 2006; 6: 2292-2306.
152. Goldschmeding R, Aten J, To Y et al. Connective tissue growth factor: just another factor in renal fibrosis? *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 296-299.
153. Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8: 171-179.
154. Grotendorst GR, Duncan MR. Individual domains of connective tissue growth factor regulate fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J* 2005; 19: 729-738.
155. Frazier K, Williams S, Kothapalli D et al. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 404-411.
156. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K et al. Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid and other fibrotic skin disorders. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 729-733.
157. Ito Y, Aten J, Bende RJ et al. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int* 1998; 53: 853-861.
158. Ito Y, Kleij L, Aten J et al. CTGF: expression in the rat Thy 1.1 model and regulation in mesangial cells and podocytes. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 517 (abstract).
159. Ito Y, Joles J, Bende R et al. CTGF in hypertensive nephrosclerosis of UNX-SHR. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 519 (abstract).

160. Stenson C, McMahon B, Clarkson M et al. Connective tissue growth factor (CTGF) expression in the glomeruli following 5/6 nephrectomy: regulation by cytokines and abrogation by ACE-inhibitors. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 580 (abstract).
161. Hirschberg R, Wang S. Proteinuria and growth factors in the development of tubulointerstitial injury and scarring in kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypert* 2005; 14: 43-52.
162. Inkinen K, Soots A, Krogerus L et al. Cytomegalovirus enhance expression of growth factors during the development of chronic allograft nephropathy in rats. *Transpl Int* 2005; 18: 743-749.
163. Csencsits K, Wood SC, Lu G et al. Transforming growth factor beta-induced connective tissue growth factor and chronic allograft rejection. *Am J Transplant* 2006; 6: 959-966.
164. Luo GH, Sun ZL, Xia SJ. Urinary connective tissue growth factor as a biomarker of chronic allograft nephropathy in a rat model. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2010; 90: 1999-2003 (abstract).

Capítulo 5. ARTIGO “Messenger RNA expression profiles
in kidney transplant recipients under different
immunosuppressive regimens”

Formatado para submissão à revista *TRANSPLANTATION*

Messenger RNA expression profiles in kidney transplant recipients
under different immunosuppressive regimens

Caroline Rech¹

Gabriel Joelsons¹

Roberto C Manfro^{1, 2, 3}

Post-graduate Medical Sciences Program, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Division of Nephrology.

Keywords: FOXP3, TIM-3, KIM-1, TGF- β , CTGF, kidney transplantation, chronic allograft nephropathy, immunosuppressor therapy.

Word count: 3,402

Tables and figures : 4 tables, 1 colored figure and 1 black-and-white figure

Correspondence: Roberto C. Manfro M.D., PhD. Division of Nephrology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350 Ramiro Barcelos Street, Room 2030, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil. Fax number 55 51 3359-8121, e-mail: rmanfro@hcpa.ufrgs.br

Footnotes

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

Funding sources: The present work was funded by The Research Incentive Fund from Hospital de Clínicas de Porto Alegre and by the Division of Nephrology Fund, also from Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Authors have no conflicts of interest to disclose.

Abbreviations

AZA – azathioprin

BLT - belatacept

BMS – Bristol-Myers Squibb

CAN – chronic allograft nephropathy

cDNA – complementary desoxiribonucleic acid

CI – calcineurin inhibitors

cT - threshold cycle

CTGF – connective tissue growth factor

DNA – desoxiribonucleic acid

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid

FOXP3 – transcription factor forkhead box P3

GFR – glomerular filtration rate

HLA – histocompatibility antigens

IF/TA – interstitial fibrosis / tubular atrophy

KIM-1 – kidney injury molecule 1

MDRD – modification of diet on renal disease

MFA – micophenolic acid

mRNA – messenger RNA

RNA – ribonucleic acid

RPM – rapamycin

RT-PCR – real time polimerase chain reaction

TGF- β – transforming growth factor beta

TIM-3 - T cell immunoglobulin domain, mucin domain

Tregs – regulatory T cells

Abstract

Background: Non-invasive techniques to diagnose conditions that affect kidney grafts and their pathophysiological mechanisms are under evaluation. This study aims to uncover mRNA expression profiles of alloimmunity, tolerance and fibrosis associated to immunosuppressor treatments.

Methods: Blood and urine samples were drawn from 53 kidney transplant recipients with at least 1 year of follow-up, divided in 6 groups according to their immunosuppressive therapy, all using low-dose corticosteroids: (1) calcineurin inhibitor (CI) + azathioprin (AZA) - n=7; (2) mycophenolic acid (MFA) – n=6; (3) rapamycin (RAPA) – n=7; (4) CI+MFA – n=15; (5) CI – n=6; (6) belatacept (BLT) + MFA – n=11. mRNA quantification of genes FOXP3, TIM-3, KIM-1, TGF- β and CTGF was performed through real-time polymerase chain reaction.

Results: Blood FOXP3 expression was higher in groups RAPA (P=0.049) and IC (P=0.039) compared to IC+AZA; urinary expression was higher in group MFA than in IC+AZA (P=0.004) and IC+MFA (P=0.003), and in group RAPA compared to IC+MFA (P=0.003). RAPA group expressed more blood TIM-3 than IC+AZA (P=0.049); urinary expression was higher in MFA group than IC+AZA (P=0.005), RAPA (P=0.003), IC+MFA (P=0.001) and BLT+MFA (P=0.021). Blood TGF- β was less expressed in group IC+AZA compared to IC+MFA (P=0.005), IC (P=0.014) and BLT+MFA (P=0.013); urinary expression was lower in group IC+MFA compared to IC+AZA (P=0.008), MFA (P=0.002), RAPA (P=0.01), IC (P=0.015) and BLT+MFA (P < 0.001); also groups IC+AZA and RAPA expressed less urine TGF- β than groups MFA (P=0.028 and 0.032, respectively) and BLT+MFA (P=0.001 and 0.006, respectively). Blood CTGF expression was not different among groups; urinary expression was lower in IC+AMF group than IC+AZA (P=0.004), MFA (P=0.001), RAPA (P=0.01) and BLT+MFA (P=0.001). KIM-1 was not expressed in blood; urinary expression was higher in IC+AZA group compared to IC+MFA (P=0.019).

Conclusions: Calcineurin inhibitors are associated to fibrosis biomarkers expression, while rapamycin and mycophenolic acid are associated to tolerance related genes and alloimmunity modulation.

Introduction

Kidney transplantation is the best therapeutic option to restore a healthy and productive life to end stage chronic kidney disease patients (1). The significant advances in the field, particularly in the last two decades, brought a significant reduction in incidence and intensity of acute allograft rejection, allowing allograft short-term survival to increase significantly (1, 2). In spite of this, late allograft failure remains a major drawback in this therapy (3). Nankivel et al reported a study with 961 kidney graft biopsies in a 10-year period, that almost all patients present chronic lesions due to microvascular and glomerular injury. Nephrotoxicity, mostly associated to calcineurin inhibitors, was present in virtually all grafts after 10 years. Once established, tubulointerstitial and glomerular damage is irreversible and progresses to renal function decline and eventual graft loss (4).

Interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA) are strongly associated to the development of chronic kidney dysfunction in renal transplants in a process commonly named chronic allograft nephropathy (CAN) (5). The pathways that lead to CAN are not completely understood, but include non-immunological and immunological events that are probably involved in a multifactorial process (3, 6). Early detection of these injuries are very uncommon and are based upon the invasive procedure of the allograft biopsy that is usually indicated when graft dysfunction appears and so detects only advanced stages of IF/TA. Besides, biopsies are risky, expensive and subjected to interpretation variation and sampling errors (6 – 10).

The development of accurate non-invasive techniques to the detection of acute and chronic injuries and thus able to predict late allograft dysfunction are strongly desired to help ensure long term success of kidney transplantation. Identification of mechanisms associated to acceptance or tolerance development is also of outmost relevance, allowing immunosuppressive therapy weaning or discontinuation and thus preventing its long term deleterious effects (11-13). Gene expression evaluation have the potential to early detect these processes. Previous studies have demonstrated that is possible to detect sub-clinical and clinical rejections by the analyses of gene expression profiling of non-invasive samples (blood and urine). It has also been demonstrated that the analyses of the non-invasive samples reflect accurately the intragraft events (12-17). A strategy based on the development of molecular biomarkers to detect immunobiological processes could not only replace invasive procedures but also give a broader comprehension of the immunological alterations associated to kidney transplantation (11).

Non-invasive molecular profiling of CAN has been addressed by several groups. Recent data suggest that urinary expression of different transcripts could be used as a valid biomarker of chronic allograft nephropathy (18, 19-21). Some laboratories are working on uncovering genes associated to chronic allograft pathology in order to detect ongoing fibrotic activity before significant injury establishment. Early diagnosis of these processes and appropriate therapeutic changes could perhaps improve the dismal prognosis associated to CAN (11).

Transcription factor forkhead box P3 (FOXP3) is the gene that encodes regulatory T cells (Tregs). These cells are involved in alloimmunity regulation and tolerance development (22, 23). FOXP3 has been studied as a biomarker for acute rejection of kidney allografts (17, 22, 24).

T cell immunoglobulin domain, mucin domain (TIM-3) is a polymorphic gene that belongs to the TIM family of genes that are involved in several immunological pathways. TIM-3 has been associated to the development of autoimmune diseases, tolerance induction and regulation of immune responses. This gene expression has been evaluated as a non-invasive biomarker of acute rejection both in urinary and peripheral blood cells (25-31).

Kidney molecule injury 1 (KIM-1) is a recently discovered transmembrane protein of renal tubular epithelium, associated to injury processes (32-34). It has been proposed as a biomarker of acute kidney injury (34-37), and also studied in kidney transplantation as a tool to early allograft dysfunction detection (38, 39). Our group has reported that KIM-1 mRNA expression in allograft biopsies was associated to calcineurin inhibitors nephrotoxicity and IF/TA (40).

Transforming growth factor beta (TGF- β) is probably the most studied cytokine associated to tissue fibrosis development (41-46). TGF- β is involved in CAN pathogenesis and expressed in allografts with IF/TA (41, 44, 46-48). In one study reduced levels of TGF- β were found to be associated with improved allograft survival (49).

Connective tissue growth factor (CTGF) belongs to a family of proteins that regulate several extracellular processes, including cell proliferation,

collagen synthesis and chemotactic mechanisms (50, 51). It has been implicated on early stage chronic kidney disease pathogenesis (52-56). Besides, recent studies have proposed CTGF as a possible non-invasive marker of CAN (50, 57, 58).

In this study we tested the hypothesis that is possible to reveal non-invasive mRNA expression profiles, in the peripheral blood and in the urinary sediment, of the different immunosuppressive regimens in current use kidney transplantation.

Patients and Methods

Patients and Sample Collection

Stable kidney transplant recipients were included in a cross-sectional study. The inclusion criteria were: (a) being in the immunosuppressive regimen for at least 3 months; (b) stable serum creatinine; (c) maximum creatinine levels of 2.5 mg/dL; (d) to have a estimated glomerular filtration rate, by the MDRD equation of at least 30 mL/min; (e) have a the kidney graft for at least one year. The exclusion criteria were: (a) refuse to participate; (b) double-kidney transplants; (c) HLA-identical or 6 HLA-matched donor recipients.

Blood and urine samples were drawn from fifty-three kidney transplant recipients. All patients received low dose steroids and they were separated in 6 groups based on their immunosuppressive regimen: [1] CI and azathioprine (AZA) (n=7); [2] mycophenolic acid derivatives (MFA) (n=6); [3] rapamycin (RPM) (n=7); [4] CI and MFA (n=15); [5] CI (n=6); [6] belatacept (BLT) and MFA

(n=11). Patients on belatacept prescription, a drug used in a research protocol, have BMS approval to this study participation.

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, accredited by the National Research Council of Brazilian Department of Health, and registered at the Office for Human Research Protections-OHRP-USDHHS (Institutional Review Board-IRB 00000921). Patients gave written informed consent to the research.

RNA Extraction

Peripheral blood was collected in EDTA containing tubes and the cells were separated with an erythrocyte lysis buffer. The floating material was discarded and cell pellets were resuspended in phosphate buffered saline solution; centrifuged again for 10 min and stored at -80°C. Similar procedures were done for urinary cells isolation. RNA isolation was performed using the QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA quality was assessed by evaluating the optical density 260 to 280 ratio, and only RNA samples with optical density ratio higher than 1.7 were analyzed, provided that a sufficient amount was available. Total RNA was reverse transcribed to cDNA using the cDNA High Capacity Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to manufacturer's instructions, to a final volume of 20uL and stored at -20°C.

Messenger RNA Quantification

The 5' nuclease assay was performed using the ABI 7000 Sequence Detection System and TaqMan Universal PCR Master Mix, composed by AmpliTaq Gold® DNA polymerase, Amperase UNG, passive reference (ROX), buffer and dNTP's (Applied 58 Biosystems, Foster City, CA, USA). The design and synthesis of the primers and fluorogenic probes for FOXP3 (Hs 00203958_m1), TIM-3 (ID: Hs 00262170_m1), KIM-1 (Hs 00273334_m1), TGF- β (Hs 00170014_m1) and CTGF (Hs 00998133_m1) mRNA were made by Assays-by-DesignSM (Applied Biosystems, USA) and had already been tested and validated previously by the manufacturer. 18s rRNA, due to its low inter sample variability, was used as an endogenous control (Taqman PDAR Endogenous Control, Applied Biosystems). Gene Expression Assays consisted of 20 times concentrated (360uM) mix of PCR primers and Taqman® MGB (Minor Groove Binding) probes. These assays are designed for the detection and amplification of specific genetic sequences. All primers utilized are intron-spanning to avoid genomic DNA amplification (Gene Expression Assays/Custom Primers and Probes; Applied Biosystems, USA). The Taqman® probes were labeled with FAM (6-carboxyfluorescein) as the reporter at the 5' region and with TAMRA (6-carboxytetramethyl rhodamine) as the quencher at the 3' region dyes, except the endogenous control 18s rRNA that was labeled with the dye VIC as the reporter. Gene expression relative quantification was measured as a raise in fluorescence, resulting from amplification and probe degradation. The cycle in which the fluorescence exceeds the detection threshold is called Threshold Cycle (Ct). More specific template in a sample

results in an earlier exceeding fluorescence. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was used to perform the analyses.

Statistical Analyses

Data are presented as absolute numbers, means \pm standard deviations, medians or percentages. Gene quantifications are shown as box-plot graphics with logarithmic transformation of the data. The mRNA levels were analyzed using Kruskal-Wallis's test with all treatment groups. Tukey's test was used for multiple comparisons among the various groups. Mann-Whitney's test was used for comparisons between two groups. Fisher's exact test was used to compare qualitative variables. Multivariate analyses (linear regression) were performed to identify independent associations. Pearson and Spearman coefficients were used to evaluate correlations between gene expressions. All analyses were performed using the SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) program (version 17.0, Chicago, IL). The statistical significance level was established as P less than .05.

Results

Table 1 shows the groups' main demographic data, renal function and relevant transplant information. Patients on group CI+AZA have undergone transplantation for a significantly longer time than the others ($P < 0.001$). Sixty-two percent of the patients were men, 88% were caucasian and 75% received kidneys from deceased donors. No difference was observed in renal function (creatinine levels or estimated GFR by MDRD equation) among the six groups.

Gene expression analyses

Messenger RNA expression levels did not present normal distribution and the medians are shown in table 2. Figure 1 shows a graphical demonstration of mRNA levels distribution through the different treatment groups. Statistically significant differences were observed in the median mRNA expression of TGF- β in blood and FOXP3, TIM-3, TGF- β and CTGF in urinary sediment (Table 2).

Comparisons between groups were performed, and are showed in Figure 2. As expected KIM-1 mRNA was not expressed in blood, therefore only urinary measurements are shown.

FOXP3 mRNA in blood was significantly less expressed in patients on CI+AZA as compared to patients on RAPA ($P=0.049$) or CI alone ($P=0.039$). There was no statistically significant difference between other groups. Urine measurements of FOXP3 mRNA showed higher expression in the group of patients on MFA therapy as compared to the groups CI+AZA ($P=0.004$), CI+MFA ($P=0.003$) and BLT+MFA ($P=0.027$), and also in RPM compared to CI+MFA group ($P=0.003$).

TIM-3 mRNA measured in blood had significant expression in patients on RPM therapy in comparison to the group CI+AZA ($P=0.049$). No statistically significant difference was observed among other groups. TIM-3 mRNA expression in urine was significantly higher in patients on MMF in comparison with groups CI+AZA ($P=0.005$), RPM ($P=0.003$), CI+MFA ($P=0.001$) and belatacept ($P=0.021$).

TGF- β mRNA in blood has significant expression on groups CI+MFA and CI, without statistical difference between these two groups ($P=0.876$). Patients

on CI+AZA treatment expressed significantly less TGF- β mRNA compared to groups CI+MFA (P=0.005), CI (P=0.014) and BLT+MFA (P=0.013). Patients on CI+MFA expressed significantly less TGF- β mRNA in urine compared to all other groups (group CI+AZA – P=0.008; group MFA – P=0.002; group RPM – P=0.01; group CI – P=0.015; group BLT+MFA – P < 0.001). Groups CI+AZA and RPM expressed less TGF- β in urine than patients of groups MFA and BLT+MFA (CI+AZA x MFA – P=0.028; CI+AZA x BLT+MFA – P=0.001; RPM x MFA – P=0.032; RPM x BLT+MFA – P=0.006).

Comparisons performed on CTGF mRNA expression in blood between all groups did not show statistically significant differences. In urine, CTGF mRNA was less expressed on CI+MFA group compared to all other groups but CI group (CI+MFA x CI+AZA – P=0.004; CI+MFA x MFA – P=0.001; CI+MFA x RPM – P=0.01; CI+MFA x CI – P=0.19; CI+MFA x BLT+MFA – P=0.001). Additionally, MFA group expressed significantly more CTGF mRNA than groups CI+AZA (P=0.028) and RPM (P=0.032).

KIM-1 mRNA expression in urinary cells was significantly higher in group CI+AZA compared to group CI+MFA (P=0.019). No differences were found in comparisons performed between other groups.

In order to evaluate the expression profiles associated to CI use, groups were rearranged in two. One with the patients whose immunosuppressive regimens contained CI (groups CI+AZA, CI+MFA and CI) and other with patients that were not receiving CI in their regimens (groups MFA, RPM and BLT+MFA). Results are shown in Table 3. No statistically significant differences were found on gene expressions in the peripheral blood. In the urinary cells analyses, mRNA expression of FOXP3 (P=0.015), TIM-3 (P=0.008), TGF- β

($P < 0.001$) and CTGF ($P = 0.005$), but not of KIM-1 ($P = 0.553$), were higher in patients not taking CI.

To evaluate the role of mycophenolic acid on different mRNA gene expression, groups were rearranged accordingly its use: one group with patients of former groups MFA, CI+MFA and BLT+MFA (receiving MFA) and other with patients of previous groups CI+AZA, RPM and CI (not receiving MFA). Comparisons are described in Table 3. The only statistically significant difference was found for KIM-1 mRNA expression, that was higher in patients not receiving MFA ($P = 0,017$).

A strong correlation between FOXP3 and TIM-3 mRNA expression in blood was found (Spearman's coefficient 0.798; $P < 0.001$); other statistically significant correlations observed are listed in Table 4.

Multivariate analyses were performed in the search for independent factors associated to mRNA expression. Mycophenolic acid therapy ($P = 0.045$) and age ($P = 0.004$) were independently associated with FOXP3 expression in the blood. Serum creatinine level ($P < 0.001$), estimated GFR ($P < 0.001$) and male gender ($P = 0.005$) were associated with FOXP3 expression in urine. TIM-3 in the peripheral blood was independently associated to Caucasian ethnicity race ($P = 0.015$) and estimated GFR ($P = 0.006$); serum creatinine levels ($P = 0.022$) and calcineurin inhibitor therapy ($P = 0.01$), rapamycin ($P = 0.012$) and belatacept use ($P = 0.008$) use were independent factors for TIM-3 mRNA expression in urine. KIM-1 urinary expression was associated to male gender ($P = 0.049$) and serum creatinine levels ($P = 0.023$). Rapamycin therapy was associated with CTGF mRNA expression in the peripheral blood ($P = 0.015$); urinary CTGF mRNA expression was not associated to any studied variable. No

independent factors were found in association with TGF- β mRNA expression, either in the blood or in the urine.

Discussion

The development of molecular tools to the non-invasive diagnosis of allograft injuries is of utmost importance, not only to allow early and safer diagnosis of these injuries but also to improve the knowledge of the different pathophysiological mechanisms involved on CAN genesis (11). It could lead to better comprehension about the interactions between allograft and immunosuppressive drugs, allowing therapy adjustments on a much more solid basis than the available today (3, 6, 11).

The objective of the present study was to uncover gene expression profiles associated to the different immunosuppressive regimens in clinical practice use, aiming at determine molecular signatures of cytotoxicity, acceptance / tolerance, fibrosis and acute tubular injury, through combined analyses of FOXP3, TIM-3, KIM-1, CTGF e TGF- β mRNA expression.

The profiles obtained are shown on figures 1 and 2. Patients on calcineurin inhibitors and azathioprine use displayed significantly higher levels of mRNA of the KIM-1 gene in the urine than observed in the other groups. On the other hand, blood FOXP3 and TGF- β along with urine TGF- β expression appear suppressed on this group. An elevated, but not statistically significant TIM-3 mRNA expression in blood was also found. Negative modulation of FOXP3 on this group suggests a lower chance for tolerance or accommodation development. The reduced TGF- β levels, however, suggest that fibrosis

mechanisms are downregulated. The higher KIM-1 expression could be associated to tubular injury presence, or yet to calcineurin inhibitors nephrotoxicity leading to IF/TA, according to a recent study that associate KIM-1 to CAN in kidney transplantation with DGF (40). However this group of patients has a significantly longer time after transplantation that could compromise comparative analyses.

The group of patients on MFA therapy presented significantly higher urine TIM-3, FOXP3, TGF- β and CTGF mRNA expression. Mycophenolic acid therapy was shown to be an independent factor to blood FOXP3 expression. These data suggest an association between MFA and mechanisms of tolerance development and alloimmunity modulation, although activation of tissue fibrosis mechanisms seems to be present, disagreeing with literature reports (59-63). Previous studies demonstrate the MFA potential for renal function improvement in patients with CI nephrotoxicity and CAN, also having a role as tissue fibrosis and vascular proliferation suppressor, both processes associated to CAN development (59-63).

Rapamycin therapy was characterized by higher mRNA expression of TIM-3 and FOXP3 in the peripheral blood, and FOXP3 in urine; urine TGF- β had minimal expression levels. Rapamycin is also an independent factor to TIM-3 expression in urine. These results suggest the rapamycin role for tolerance development and alloimmunity negative modulation, as already described in previous studies that have demonstrated rapamycin capacity to determine Tregs proliferation, in favor of acceptance immune processes (64-66). Urine

TGF- β suppression suggests a RPM effect as a downregulator of fibrosis mechanisms.

Patients receiving calcineurin inhibitors in combination with mycophenolic acid had elevated levels of TGF- β in blood, and also high TGF- β , CTGF and KIM-1 expression in urine. This expression profile is associated to fibrosis development and probably to CI nephrotoxicity, as described in several previous studies (4, 40, 67-69). It also suggests that the CI role on CAN development takes place despite MFA combined use. Importantly it was not observed a considerable expression of FOXP3 or TIM-3 as it occurred with patients on MFA therapy without concomitant calcineurin inhibitors.

Calcineurin inhibitors use, without any adjuvant drug was associated to higher TGF- β expression in blood and urine, and elevated FOXP3 mRNA levels in the blood. Here once more the association between fibrosis encoding genes and CI therapy is apparent. However, differently from previous reports, the elevated FOXP3 levels, suggesting immune system modulation, is unexpected (59-61).

Belatacept was only associated to high TGF- β mRNA expression in the urine, demonstrating a possible and not expected association with tissue fibrosis mechanisms. Belatacept use has also shown to be an independent factor for increased urine TIM-3 expression. These results agree with literature data, where belatacept, who acts through a selective T cell blockade, appears as less nephrotoxic compared to CI and with potential to reduce CAN progression perhaps by better controlling alloantigen related mechanisms (70).

In order to evaluate calcineurin inhibitors effect, patients were rearranged in two groups accordingly to CI use (Table 3). It could be observed the association between CI and a lower expression of FOXP3, TIM-3, TGF- β and CTGF in urine. These novel data suggests that alloimmune mechanisms instead of nephrotoxicity is perhaps the main factor in determining CAN, as proposed in recent studies (71, 72). Besides, reduced levels of FOXP3 and TIM-3 denote an association of CI to alloimmunity activation mechanisms, as found in other studies (59, 66).

Mycophenolic acid effect was also evaluated through a group rearrangement based on MFA use (Table 3). Urine KIM-1 was significantly less expressed in patients in MFA therapy, what could be associated to minor progression to IF/TA (40). However, TIM-3 and FOXP3 were not significantly expressed, differently from what was observed with the group of patients receiving MFA alone.

In the present study we were able to reveal gene expression profiles related to different immunosuppressive therapies. However we observed a great variability of the mRNA expression levels among patients. The reasons for such are not entirely clear but the small number of individuals enrolled and the heterogeneity of biological human responses might have contributed. Other possible explanations for some of the results were the low levels of urine mRNA expression, stable renal function and the absence of significant inflammatory or fibrotic processes on these patients. Studies in a larger population would probably uncover stronger associations between gene expression profiles and type of immunosuppressive regimens.

From these preliminary data it is possible to suggest that several pathophysiological processes are associated to CAN and other graft conditions. These processes might include: (a) over expression of fibrosis related genes denoting either a role for the immunosuppressive drugs in inducing this condition or an uncontrolled immune response that elicits fibrosis mechanisms; (b) increased expression of genes that are upregulated upon alloimmune activation; (c) decreased or increased mRNA expression of genes related to mechanisms of accommodation and tolerance. The correlations between gene expression profiles and specific immunosuppressive regimens may allow the identification of which mechanisms are operative or dominant. It seems clear the association of calcineurin inhibitors to tissue fibrosis markers, of rapamycin and mycophenolic acid and immune tolerance mechanisms and alloimmunity modulation. Larger studies preferably with patients on immunosuppressive agents monotherapy would better identify these associations and help determining the role for molecular biomarkers for tailoring immunosuppressive therapy.

References

1. Chandraker A, Iacomini JJ, Sayegh MH. Transplantation immunobiology. In Brenner: Brenner and Rector's The Kidney, 8th ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p. 2103-2122.
2. Goodman WG, Danovitch G. Options for patients with kidney failure. In Handbook of kidney transplantation, 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2005. p. 1-22.

3. Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation* 2006; 81: 643–654.
4. Nankivell BJ, Borrows RJ, Chir B et al. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349: 2326-33.
5. Solez, K, Colvin, RB, Racusen, LC et al. Banff '05 meeting report: Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; 7:518.
6. Maluf DG, Mas VR, Archer KJ. Molecular pathways involved in loss of kidney graft function with tubular atrophy and interstitial fibrosis. *Mol Med* 2008; 14:276-85.
7. Maya ID, Maddela P, Barker J et al. Percutaneous renal biopsy: comparison of blind and real-time ultrasound-guided technique. *Semin Dial* 2007; 20:355-358.
8. Hergessel O, Felten H, Andrassy K et al: Safety of ultrasound-guided percutaneous renal biopsy—retrospective analysis of 1090 consecutive vases. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13:975-977.
9. Toledo K, Pérez MJ, Espinosa M et al. Complications associated with percutaneous renal biopsy in Spain, 50 years later. *Nefrologia* 2010; 30:539-43.
10. Mishra A, Tarsin R, Elhabbash B et al. Percutaneous ultrasound-guided renal biopsy: A Libyan experience. *Indian J Nephrol* 2010 Apr; 20:76-9.
11. Anglicheau D, Suthanthiran M. Noninvasive prediction of organ graft rejection and outcome using gene expression patterns. *Transplantation* 2008;86: 192–199.

12. Strom TB, Suthanthiran M. Transcriptional profiling to assess the clinical status of kidney transplants. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; 2: 116.
13. Strom TB, Suthanthiran M. Prospects and applicability of molecular diagnosis of allograft rejection. *Semin Nephrol* 2000; 20: 103.
14. Gwinner W. Renal transplant rejection markers. *World J Urol* 2007; 25:445.
15. Hartono C, Dadhania D, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of acute rejection of solid organ transplants. *Front Biosci* 2004; 9: 145.
16. Aquino-Dias EC, Veronese FJ, Santos Gonçalves LF et al. Molecular markers in subclinical acute rejection of renal transplants. *C Transplant*. 2004;18:281-287.
17. Aquino-Dias EC, Joelsons G, da Silva DM et al. Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney Int* 2008;73:877-84.
18. Mas V, Maluf D, Archer K et al. Establishing the molecular pathways involved in chronic allograft nephropathy for testing new noninvasive diagnostic markers. *Transplantation* 2007; 83: 448–457.
19. Mas VR, Maluf DG, Archer KJ, et al. Study of mRNA growth factors in urinary cells of kidney transplant recipients as predictors of chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2005; 80: 1686.
20. Mas VR, Mas LA, Archer KJ, et al. Evaluation of gene panel mRNAs in urine samples of kidney transplant recipients as a non-invasive tool of graft function. *Mol Med* 2007; 13: 315.

21. Koop K, Bakker RC, Eikmans M, et al. Differentiation between chronic rejection and chronic cyclosporine toxicity by analysis of renal cortical mRNA. *Kidney Int* 2004; 66: 2038.
22. Long E, Wood KJ. Understanding FOXP3: progress towards achieving transplantation tolerance. *Transplantation* 2007; 84: 459–461.
23. Sykes M. Immune tolerance: mechanisms and application in clinical transplantation. *J Intern Med* 2007; 262: 288-310.
24. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 2005; 353: 2342-51.
25. Manfro RC, Aquino-Dias EC, Joelsons G et al. Noninvasive TIM-3 messenger RNA evaluation in renal transplant recipients with graft dysfunction. *Transplantation* 2008; 86:1869–1874.
26. Kuchroo VK, Umetsu DT, DeKruyff RH et al. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 454–462.
27. Nakae S, Iikura M, Suto H et al. TIM-1 and TIM-3 enhancement of Th2 cytokine production by mast cells. *Blood* 2007;110:2565–2568.
28. Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL et al. Th1-specific cell surface protein TIM-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 2002;415:536–541.
29. Anderson AC, Anderson DE, Bregoli L et al. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor TIM-3 expressed on innate immune cells. *Science* 2007;318:1141–1143.

30. Wang F, He W, Zhou H et al. The TIM-3 ligand galectin-9 negatively regulates CD8+ alloreactive T cell and prolongs survival of skin graft. *Cellular Immunology* 2007;250:68–74.
31. Pavlakis M, Lipman M, Strom TB. Intra-graft expression of T-cell activation genes in human renal allograft rejection. *Kidney Int* 1996;53:S7-S12.
32. Van Timmeren MM, Bakker SJ, Vaidya VS, et al. Tubular kidney injury molecule-1 in protein-overload nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291: F456.
33. Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, et al. Urinary kidney injury molecule-1: A sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F517.
34. Van Timmeren MM, van den Heuvel MC, Bailly V, et al. Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease. *J Pathol* 2007; 212: 209.
35. Han WK, Bailly V, Abichandani R, et al. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 2002; 62: 237.
36. Han WK, Alinani A, Wu CL et al. Human kidney injury molecule-1 is a tissue and urinary tumor marker of renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1126–1134.
37. Lin F, Zhang PL, Yang XJ et al. Human kidney injury molecule-1 (hKIM-1): a useful immunohistochemical marker for diagnosing renal cell carcinoma and ovarian clear cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 371–381.

38. Zhang PL, Rothblum LI, Han WK et al. Kidney injury molecule-1 expression in transplant biopsies is a sensitive measure of cell injury. *Kidney Int* 2008; 73: 608–614.
39. van Timmeren MM, Vaidya VS, van Ree RM et al. High urinary excretion of kidney injury molecule-1 is an independent predictor of graft loss in renal transplant recipients. *Transplantation* 2007; 84: 1625–1630.
40. Nogare AL, Joelsons G, Pedroso JA et al. Quantitative analyses of kidney injury molecule-1 messenger RNA in kidney transplant recipients with graft dysfunction. *Transplant Proc.* 2010;42:473-474.
41. Campistol JM, Iñigo P, Larios S et al. Role of transforming growth factor- β_1 in the progression of chronic allograft nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 114-116.
42. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor- β . *Sci Am Sci Med* 1995; 2: 68-77.
43. Kothapalli D, Hayashi N, Grotendorst GR. Inhibition of TGF- β -stimulated CTGF gene expression and anchorage-independent growth by cAMP identifies a CTGF-dependent restriction point in the cell cycle. *FASEB J* 1998; 12: 1151-1161.
44. Sharma VK, Bologa RM, Xu GP et al. Intragraft TGF- β_1 mRNA: A correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 1996; 49: 1297-1303.
45. Roberts AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β (TGF- β). *Growth Factors* 1993; 8: 1-9.
46. Border WA, Nobel NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-1292.

47. Shihab FS, Tanner AM, Shao Y et al. Expression of TGF-beta 1 and matrix proteins is elevated in rats with chronic rejection. *Kidney Int* 1996; 53: 639-644.
48. Lee SB, Kalluri R. Mechanistic connection between inflammation and fibrosis. *Kidney Int* 2010; 78: S22–S26.
49. Alberú J, Richaud-Patin Y, Vázquez-Lavista LG et al. In vivo IL-10 e TGF-beta production by PBMC from long-term kidney transplant recipients with excellent graft function: a possible feedback mechanism participating in immunological stability. *Clin Transplant* 2004; 18: 174-178.
50. Cheng O, Thuillier R, Sampson E et al. Connective tissue growth factor is a biomarker and mediator of kidney allograft fibrosis. *Am J Transplant* 2006; 6: 2292-2306.
51. Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8: 171-179.
52. Ito Y, Aten J, Bende RJ et al. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int* 1998; 53: 853-861.
53. Ito Y, Kleij L, Aten J et al. CTGF: expression in the rat Thy 1.1 model and regulation in mesangial cells and podocytes. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 517 (abstract).
54. Ito Y, Joles J, Bende R et al. CTGF in hypertensive nephrosclerosis of UNX-SHR. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 519 (abstract).
55. Stenson C, McMahon B, Clarkson M et al. Connective tissue growth factor (CTGF) expression in the glomeruli following 5/6 nephrectomy:

- regulation by cytokines and abrogation by ACE-inhibitors. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 580 (abstract).
- 56.Hirschberg R, Wang S. Proteinuria and growth factors in the development of tubulointerstitial injury and scarring in kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypert* 2005; 14: 43-52.
- 57.Inkinen K, Soots A, Krogerus L et al. Cytomegalovirus enhance expression of growth factors during the development of chronic allograft nephropathy in rats. *Transpl Int* 2005; 18: 743-749.
- 58.Luo GH, Sun ZL, Xia SJ. Urinary connective tissue growth factor as a biomarker of chronic allograft nephropathy in a rat model. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2010; 90: 1999-2003 (abstract).
- 59.Suwelack B, Hohage H. Withdrawal of cyclosporine or tacrolimus after addition of mycophenolate mofetil in patients with chronic allograft nephropathy. *Am J Transplant* 2004; 4: 655–662.
- 60.Moore J, Middleton L, Cockwell P et al. Calcineurin inhibitor sparing with mycophenolate in kidney transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Transplantation*. 2009 Feb 27;87:591-605.
- 61.Kyu Ha Huh, Hyung Joon Ahn, Jehyun Park et al. Mycophenolic acid inhibits oleic acid-induced mesangial cell activation through both cellular reactive oxygen species and inosine monophosphate dehydrogenase 2 pathways. *Pediatr Nephrol* 2009; 24: 737-745.
- 62.Park J, Ha H, Seo J et al. Mycophenolic acid inhibits platelet-derived growth factor-induced reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *Am J Transplant*. 2004 Dec;4:1982-90.

63. Park J, Chang HK, Ha H et al. Mycophenolic acid inhibits cell proliferation and extracellular matrix synthesis in rat vascular smooth muscle cells through direct and indirect inhibition of cellular reactive oxygen species. *J Surg Res*. 2008 Nov;150:17-23.
64. Gao W, Lu Y, El Essawy B et al. Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *Am J Transplant*. 2007 Jul;7:1722-32.
65. Fischer RT, Turnquist HR, Wang Z et al. Rapamycin-conditioned, alloantigen-pulsed myeloid dendritic cells present donor MHC class I/peptide via the semi-direct pathway and inhibit survival of antigen-specific CD8(+) T cells in vitro and in vivo. *Transpl Immunol*. 2011. [Epub ahead of print]
66. Coenen JJ, Koenen HJ, van Rijssen E et al. Rapamycin, not cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of CD4+ CD25+ FoxP3+ T cells. *Bone Marrow Transplant*. 2007;39:537-45.
67. Mohamed MA, Robertson H, Booth T et al. TGF-beta expression in renal transplant biopsies: a comparative study between cyclosporine-A and tacrolimus. *Transplantation* 2000; 69: 1002-1005.
68. Esposito C, Foschi A, Parrilla B et al. Effect of calcineurin inhibitors on extracellular matrix turnover in isolated human glomeruli. *Transplant Proc* 2004; 36: 695-697.
69. Citterio F, Pozzetto U, Romagnoli J et al. Plasma levels of transforming growth factor-beta 1 in renal transplant recipients receiving different immunosuppressive regimens. *Transplant Proc* 2004; 36: 698-699.

70. Vincenti F, Larsen C, Durrbach A et al. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med* 2005; 353:770-781.
71. Einecke G, Sis B, Reeve J et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant* 2009; 9:2520-2531.
72. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL et al. Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. *Transplantation* 2010 Jul 15; 90:68-74.

Table 1. Demographic and transplant data.

	1	2	3	4	5	6	
Parameter ¹	(n=7)	(n=6)	(n=7)	(n=15)	(n=6)	(n=11)	P value [*]
Gender (male/female)	5 / 3	5 / 1	5 / 2	9 / 6	3 / 3	6 / 5	0.732
Age (years)	51.5 ± 10.6	48.4 ± 7.4	49.3 ± 11.8	42.8 ± 8.5	52 ± 16.6	58.4 ± 9.9	0.234
Ethnic origin (caucasian/non-caucasian)	7 / 1	6 / 0	6 / 1	12 / 3	5 / 1	11 / 0	0.639
Donor (living / deceased)	3 / 5	3 / 3	3 / 4	2 / 13	1 / 5	1 / 10	0.228
Time after tx (years ± sd)	8.4 ± 0.7	6 ± 3.1	6 ± 2.2	2 ± 1.1	5.2 ± 2.7	2.8 ± 0.7	< 0.001
Creatinine (mg/dL ± sd)	1.28 ± 0.21	1.79 ± 0.5	1.30 ± 0.32	1.41 ± 0.35	1.33 ± 0.36	1.21 ± 0.19	0.415
MDRD (± sd)	58.95 ± 16.65	48.42 ± 12.92	59.95 ± 14.91	55.45 ± 14.16	58.64 ± 17.22	59.27 ± 14.32	1.000

¹ Group 1 – azathioprine + calcineurin inhibitors; group 2 – mycophenolic acid; group 3 – rapamycin; group 4 – calcineurin inhibitors + mycophenolic acid; group 5 – CI; group 6 – belatacept + mycophenolic acid. ^{*} Fischer’s exact test. **sd** – standard deviation.

Table 2. mRNA expression [median (interquartile range)]

Groups [†]	FOXP3	TIM-3	TGF- β	CTGF	KIM-1
Blood					
1	0.157 (0.427)	1.441 (3.025)	0.226 (0.256)	0.151 (0.289)	-
2	0.235 (2.790)	1.976 (36.528)	2.390 (4.337)	0.001 (1.763)	-
3	0.695 (8.804)	28.790 (106.262)	1.938 (22.380)	0.592 (33.061)	-
4	0.173 (0.837)	3.277 (16.701)	25.457 (183.860)	0.586 (279.944)	-
5	1.348 (23.288)	8.296 (554.039)	24.342 (33.850)	7.253 (37.753)	-
6	0.374 (0.617)	7.607 (16.877)	1.301 (5.495)	0.163 (0.593)	-
P value*	0.147	0.102	0.012	0.651	-
Urine					
1	0.0002 (0.0007)	0.0037 (0.009)	0.097 (0.139)	0.213 (0.221)	0.0089 (0.588)
2	0.2513 (18.728)	0.1886 (1.468)	0.275 (0.504)	1.965 (3.673)	0.0009 (0.075)
3	0.0007 (0.4648)	0.0018 (0.005)	0.06 (0.226)	0.155 (0.741)	0.0009 (0.006)
4	0.0001 (0.001)	0.0001 (0.001)	0.0001 (0.015)	0.001 (0.067)	0.0009 (0.0001)
5	0.0002 (1.07)	0.0025 (46.796)	0.328 (0.695)	1.614 (7.138)	0.0009 (32.890)
6	0.0004 (0.103)	0.0124 (0.253)	0.461 (3.317)	0.343 (3.824)	0.0009 (0.0001)
P value*	0.001	0.001	<0.001	0.001	0.142

[†] Group 1 – azathioprine + calcineurin inhibitors; group 2 – mycophenolic acid; group 3 – rapamycin; group 4 – calcineurin inhibitors + mycophenolic acid; group 5 – CI; group 6 – belatacept + mycophenolic acid.

*Kruskal-Wallis' test.

Table 3. mRNA expression and relation to calcineurin inhibitors (CI) and micophenolic acid (MFA) use. [median (interquartile range)]

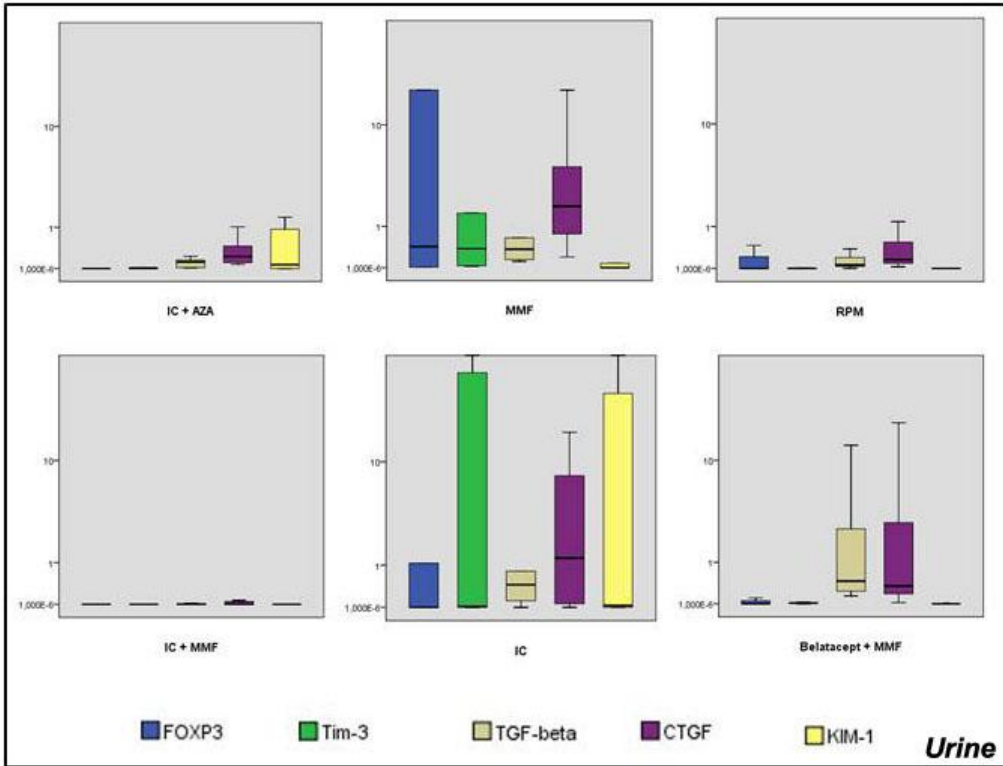
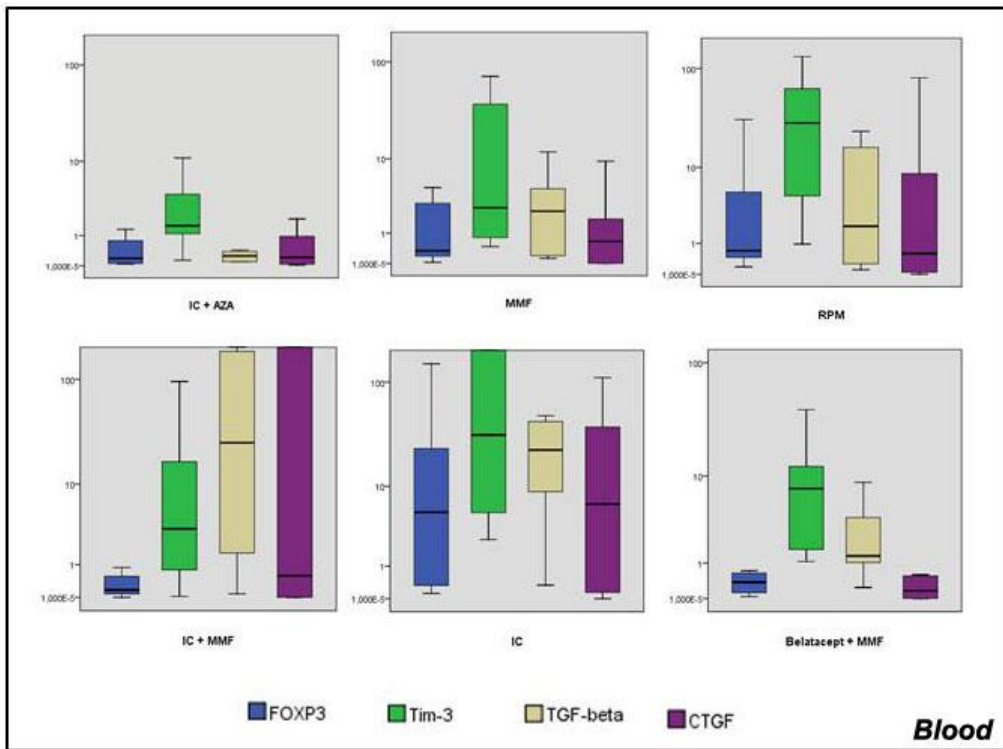
Gene	CI (n=29)	No-CI (n=24)	<i>P value</i> *	MFA (n=32)	No-MFA (n=21)	<i>P value</i> *
Blood						
FOXP3	0.269 (1.189)	0.445 (2.4147)	0.381	0.269 (0.617)	0.595 (2.768)	0.118
TIM-3	3.525 (15.046)	7.608 (35.415)	0.391	3.277 (16.4)	5.268 (35.239)	0.237
TGF-β	2.779 (42.331)	1.551 (6.213)	0.218	2.337 (24.494)	0.433 (22.381)	0.184
CTGF	0.341 (37.871)	0.163 (1.733)	0.213	0.3412 (3.793)	0.3151 (10.614)	0.452
Urine						
FOXP3	0,0001 (0.002)	0.002 (0.465)	0.015	0.0001 (0.103)	0.0004 (0.002)	0.941
TIM-3	0,0007 (0.009)	0,008 (0.028)	0.008	0.0011 (0.029)	0.0037 (0.009)	0.756
TGF-β	0.015 (0.155)	0.266 (0.347)	<0.001	0.144 (0.462)	0.1359 (0.226)	0.978
CTGF	0.074 (0.296)	0.343 (1.855)	0.005	0.194 (0.995)	0.236 (0.678)	0.347
KIM-1	0.00001 (0.062)	0.00001 (0.003)	0.553	0.00001 (0.00001)	0.0028 (0.1297)	0.017

*Mann-Whitney's test

Table 4. mRNA expression correlations – linear regression.

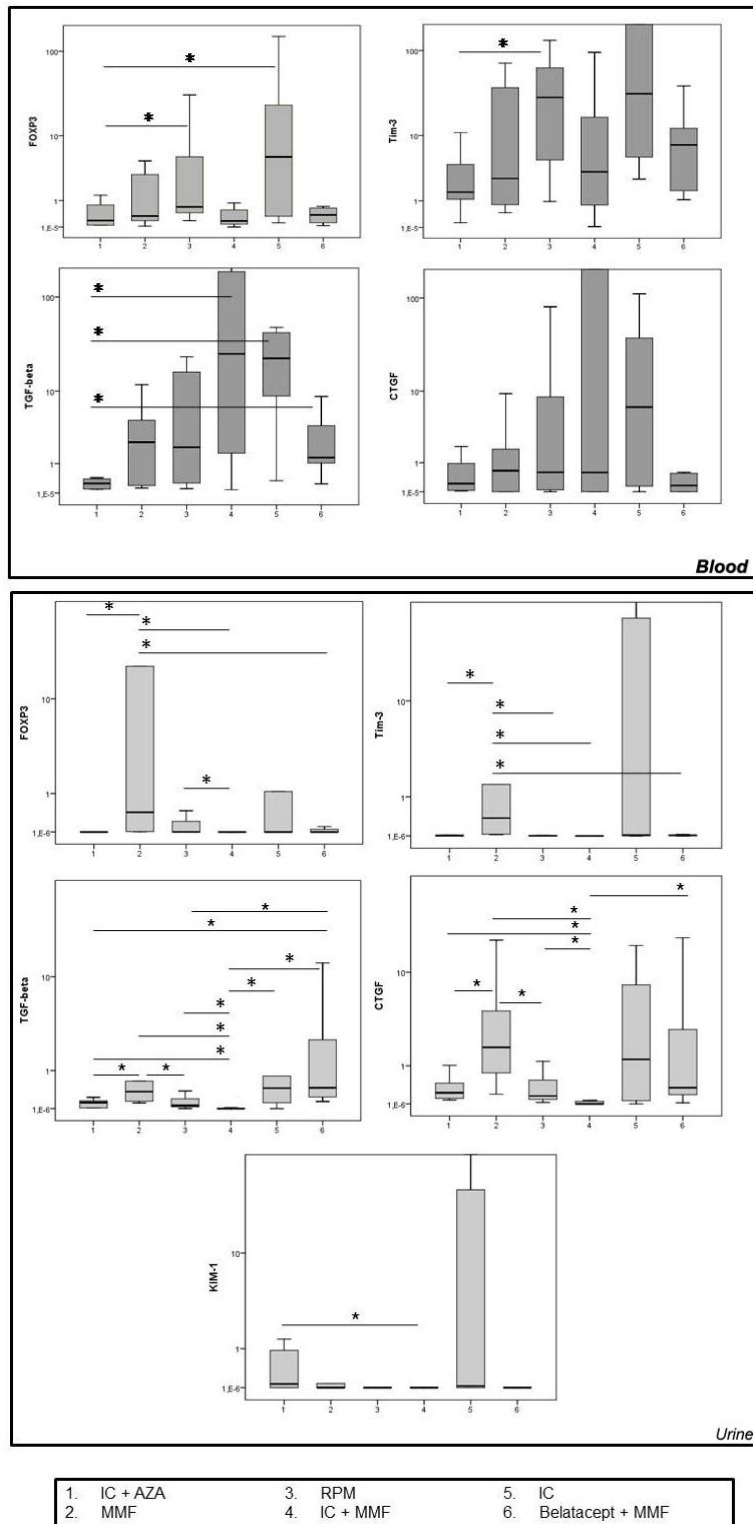
<i>Correlation</i>	<i>Spearman's coefficient</i>	<i>P value</i>
FOXP3 blood - TIM-3 blood	0.798	<0.001
TGF- β blood - CTGF blood	0.499	< 0.001
CTGF blood - FOXP3 urine	0.325	0.012
FOXP3 urine - TGF- β urine	0.307	0.018
FOXP3 urine - CTGF urine	0.398	0.002
KIM-1 urine - TIM-3 urine	0.341	0.008
TIM-3 urine - TGF- β urine	0.405	0.001
TIM-3 urine - CTGF urine	0.400	0.002
TGF- β urine - CTGF urine	0.084	< 0.001

Figure 1. mRNA expression in groups of patients under different immunosuppressive treatment regimens.



IC – calcineurin inhibitors; AZA – azathioprine; RPM – rapamycin; MMF – myophenolic acid.

Figure 2. Comparisons of mRNA expression levels between groups of patients under different immunosuppressive treatment regimens.



* $P < 0.05$ – Mann-Whitney’s test. IC – calcineurin inhibitor; AZA – azathioprin; MMF – mycophenolic acid; RPM – rapamycin.

Capítulo 6. Considerações Finais

Considerando a revisão da literatura e os resultados obtidos ao final do estudo, conclui-se que:

1. O desenvolvimento de ferramentas moleculares para o diagnóstico não-invasivo de agressão do enxerto em transplante renal é de suma importância não apenas por possibilitar a realização de diagnósticos precoces de forma menos arriscada, mas também por fornecer informações acerca dos mecanismos envolvidos na gênese dos processos fisiopatológicos. Podendo possibilitar, também, a compreensão acerca das interações entre o enxerto e as medicações imunossupressoras, favorecendo ajustes na terapêutica possivelmente com embasamento muito mais sólido do que o disponível atualmente.

2. O objetivo do presente estudo foi delinear perfis de expressão gênica associados aos diferentes esquemas de imunossupressão em uso na prática clínica atual, na tentativa de determinar, através da análise combinada da expressão de FOXP3, TIM-3, KIM-1, CTGF e TGF- β , assinaturas moleculares de citotoxicidade, aceitação/tolerância, fibrose e injúria tubular aguda.

3. O grupo de pacientes em uso de inibidores da calcineurina e azatioprina apresentou expressão significativa de KIM-1 na urina em comparação com os demais grupos; as expressões de FOXP3 e TGF- β no sangue, e de TGF- β na urina, aparecem suprimidas nesse grupo. Houve expressão aumentada de TIM-3 no sangue, mas de forma não significativa. A modulação negativa de FOXP3 sugere que este grupo associe-se a menores taxas de desenvolvimento de tolerância; no entanto, os níveis reduzidos de TGF- β sugerem que os mecanismos de fibrose estejam menos ativos. A expressão

aumentada de KIM-1 pode sugerir a presença de dano tubular, ou ainda de nefrotoxicidade associada aos inibidores de calcineurina e evolução a IF/TA. No entanto, este grupo de pacientes apresenta maior tempo de seguimento pós-transplante em relação aos demais, o que pode dificultar a análise comparativa.

4. Pacientes em uso isolado de ácido micofenólico apresentaram expressão significativamente aumentada de TIM-3, FOXP3, TGF- β e CTGF na urina; houve expressão aumentada de TIM-3 no sangue, mas de forma não significativa. O uso de AMF foi considerado um fator independente para a expressão de FOXP3 no sangue. Esses dados sugerem que AMF associe-se ao desenvolvimento de tolerância e modulação dos processos de alo-imunidade, muito embora demonstrem a ativação de mecanismos de fibrose tecidual, em contraponto aos achados descritos na literatura.

5. Pacientes em uso de rapamicina caracterizaram-se por expressão aumentada de TIM-3 e FOXP3 no sangue e de FOXP3 na urina, além de níveis mínimos de expressão de TGF- β na urina. Rapamicina aparece, ainda, como um fator independente para a expressão de TIM-3 na urina. Esses resultados sugerem o papel da rapamicina no desenvolvimento de tolerância e modulação negativa da alo-imunidade. A supressão de TGF- β na urina indica, ainda, a capacidade de reduzir a ativação dos processos indutores de fibrose.

6. O grupo de pacientes em uso de inibidores da calcineurina em associação a ácido micofenólico apresentou níveis elevados de TGF- β no sangue, além de expressão aumentada de TGF- β , CTGF e KIM-1 na urina. O perfil de expressão encontrado associa-se ao desenvolvimento de fibrose e

possivelmente à nefrotoxicidade determinada pelo uso de inibidores da calcineurina.

7. O uso isolado de inibidores da calcineurina associou-se a maior expressão de TGF- β em sangue e urina e FOXP3 no sangue, novamente demonstrando a associação de marcadores de fibrose ao uso de IC; no entanto, esse grupo parece ter o potencial de modular processos de aceitação imune, contrastando com dados presentes na literatura.

8. Belatacept associou-se apenas a expressão aumentada de TGF- β (e CTGF, de forma não significativa) na urina, sugerindo associação a mecanismos de fibrose tecidual. Houve maior expressão também de TIM-3 no sangue, mas sem significância estatística. A utilização de belatacept foi considerada fator independente para expressão de TIM-3 na urina.

9. Apesar de o presente estudo ter conseguido delinear padrões de expressão gênica, observa-se que o nível de expressão dos diversos genes apresentou grande variabilidade entre os pacientes. Isso provavelmente é decorrente do pequeno número de pacientes arrolado e da grande variabilidade de expressão gênica encontrada nesta situação. Estudos com maior amostragem poderiam definir associações mais robustas entre expressão gênica e imunossupressores.

10. Observou-se, ainda, que os níveis de expressão dos diferentes genes em urina foram mínimos. A estabilidade da função renal dos pacientes e a inexistência de processos inflamatórios ou fibróticos significativos pode justificar a mínima expressão encontrada, uma vez que em muitos deles a

pequena quantidade de células presentes na urina limitou a obtenção de quantidades significativas de mRNA, prejudicando, em alguns casos, as análises de expressão gênica.

Conclui-se, assim, que vários processos fisiopatológicos encontram-se associados ao desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto e de outras condições presentes nos transplantes renais, e que a análise dos perfis de expressão gênica nos vários regimes de imunossupressão permite identificar associação de diferentes processos a cada combinação terapêutica. Evidencia-se claramente a associação dos inibidores de calcineurina aos marcadores de fibrose tecidual, enquanto que rapamicina e micofenolato parecem mediar processos de tolerância imune e modulação da aloimunidade. Estudos maiores poderão estreitar essas associações, determinando o real papel da expressão de biomarcadores como ferramentas para o diagnóstico não-invasivo das condições que afetam os aloenxertos renais.

Anexos

Anexo 1. Artigo submetido a publicação da Revista Transplantation Proceedings

TRANSPLANTATION PROCEEDINGS
BARRY D. KAHAN, PhD, MD, Editor-in-Chief

Editorial Office:
11707 Trudeau Drive
Houston, TX 77065
Telephone: 713-984-0533

Barry D. Kahan, PhD, MD - Editor-in-Chief
Email: bkahan@transplantation-proceedings.org

Transplantation Proceedings
2011 Congress of the Brazilian Transplantation Society
Belem, Brazil October 1-5, 2011

BRAZIL11-1

THIS SIGNED FORM IS REQUIRED AND MUST BE ATTACHED WITH YOUR MANUSCRIPT UPON SUBMISSION. WE WILL NOT PROCEED WITH YOUR MANUSCRIPT REVIEW UNLESS THIS FORM IS ATTACHED.

MANUSCRIPT RECEIPT - FINANCIAL AGREEMENT

Title Page With ALL Author Email Addresses: _____

Submitted Text Pages: 3

Submitted Tables: 0

Submitted Figures: 1

Abstract Included

Total Pages Submitted (excluding Title Page and Abstract): 4 by

Manuscript Title: (PLEASE TYPE)

T cell immunoglobulin domain, mucin domain (TID-3) messenger RNA...

By submission of this manuscript to *Transplantation Proceedings*, I acknowledge I have read the Guidelines to Authors of Manuscripts Submitted in Conjunction with Meetings and agree with the contents, and that I have attached a completed and signed Authorship and Conflict of Interest Statement (ACIS) on behalf of each author listed on this manuscript.

I also acknowledge that if accepted, I am responsible for all manuscript page charges, which will be billed to me by Elsevier, the publisher of *Transplantation Proceedings*, at the rate of US\$99.95 per submitted manuscript page, understanding that each Table and Figure will count as one manuscript page each along with the text. I understand that page charges are based on the typed, submitted page, not on the printed page, and no complimentary pages are automatically provided by *Transplantation Proceedings*. Authors will be contacted by the Editorial Office with a tracking number and will be informed of the final number of pages for which they are responsible. Further, I understand that use of color reproduction of graphics will result in an additional charge. The Abstract and Title page are complimentary by *Transplantation Proceedings*.

Additionally, I agree that this manuscript has not been submitted or published in any other journal, including *Transplantation Proceedings*, and no parts of the manuscript are duplicated. I understand that if the manuscript is accepted for publication, copyright of the manuscript is transferred to Elsevier.

Caroline Rech
Signature of Corresponding Author

Signature of Financially Responsible Party

CAROLINE RECH
Printed Name

Printed Name

T cell immunoglobulin domain, mucin domain (TIM-3) messenger RNA expression in the peripheral blood of kidney transplant recipients under different immunosuppressive regimens.

Caroline Rech¹ (carolrech2@yahoo.com.br), Gabriel Joelsons¹ (gjoelsons@gmail.com), Luis Felipe Gonçalves^{1, 2} (lfgoncalves@hcpa.ufrgs.br), Roberto C Manfro^{1,2,3} (rmanfro@hcpa.ufrgs.br)

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

Post-graduate Medical Sciences Program, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Division of Nephrology.

Correspondence: Roberto C. Manfro M.D., Ph.D. Division of Nephrology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350 Ramiro Barcelos Street, Room 2030, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil. Fax number 55 51 3359-8121, e-mail: rmanfro@hcpa.ufrgs.br (e-mail can be published).

Funding sources: The present work was funded by The Research Incentive Fund from Hospital de Clínicas de Porto Alegre and by the Division of Nephrology Fund, also from Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Authors have no conflicts of interest to disclose.

Tables and figures: 1 black-and-white figure

Abstract

T cell immunoglobulin domain, mucin domain (TIM-3) messenger RNA expression in the peripheral blood of kidney transplant recipients under different immunosuppressive regimens.

Background. Non-invasive biomarkers are intensively searched but still an unmet need in the practice of organ transplantation. Accurate quantitative tests that may allow immunosuppressive individualization are also missing. T cell immunoglobulin domain, mucin domain (TIM-3) acts in the effector arm of alloimmune responses.

Methods. Peripheral blood samples were drawn from stable kidney transplant recipients who were divided in three groups according to their immunosuppressive regimen (all receiving low dose steroids): (1) mycophenolic acid derivatives (MFA) (6 patients); (2) rapamycin (RPM) (7 patients); (3) calcineurin inhibitors (CI) (6 patients). TIM-3 mRNA expression was quantified by real-time polymerase chain reaction.

Results. Medians of expression of TIM-3 mRNA were 2.65 (interquartile range 45.18) on group MFA, 28.79 (IQR 106.26) on group RPM, and 61.33 (IQR 555.69) on group CI, with no statistically significant differences identified ($P = 0.684$). Caucasian ethnicity ($P = 0.015$) and estimated GFR ($P = 0.006$) were found to be independently associated to TIM-3 mRNA expression.

Conclusion. TIM-3 mRNA expression is similar in patients under the immunosuppressive regimens studied.

Introduction

Late allograft failure is a major drawback in kidney transplantation (1). Non-invasive techniques for the detection of injuries and able to predict late allograft dysfunction are strongly desired. Identification of mechanisms associated to graft acceptance is also of outmost relevance, allowing immunosuppressive therapy weaning or discontinuation and thus preventing its long term toxicities (2, 3). The development of molecular biomarkers could not only replace invasive procedures but also give a broader comprehension of the immunological alterations associated to kidney transplantation (2-6). T cell immunoglobulin domain, mucin domain (TIM-3) belongs to a family of genes involved in the regulation of immune responses and tolerance induction that has been evaluated as a non-invasive biomarker of acute rejection (7). In this preliminary study we evaluated TIM-3 mRNA expression in the peripheral blood of kidney transplant recipients under different immunosuppressive regimens.

Patients and Methods

Patients and Sample Collection

Nineteen stable kidney transplant recipients were evaluated. The inclusion criteria were: (a) have the kidney graft for at least one year; (b) being in the same immunosuppressive regimen for at least 3 months; (c) stable serum creatinine; (d) estimated glomerular filtration rate (eGFR) by the MDRD equation of at least 30 mL/min. Double-kidney transplants, HLA-identical or 6 HLA-matched (ABDr) recipients were excluded. All patients were on low dose

steroids and were separated in 3 groups according to the other immunosuppressive drug: [1] mycophenolic acid derivatives (MFA) (n=6); [2] rapamycin (RPM) (n=7); [3] calcineurin inhibitors (CI) (n=6).

RNA Extraction and quantification

RNA was extracted from the peripheral blood by using QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was reverse transcribed to cDNA using the cDNA High Capacity Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The 5' nuclease assay was performed using the ABI 7000 Sequence Detection System and TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied 58 Biosystems, Foster City, CA, USA). The design and synthesis of the primers and fluorogenic probes for TIM-3 (ID: Hs 00262170_m1) mRNA were made by Assays-by-DesignSM (Applied Biosystems, USA). 18s rRNA was used as an endogenous control (Taqman PDAR Endogenous Control, Applied Biosystems). Gene expression relative quantification was made by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Statistical Analyses

Data are presented as absolute numbers, means \pm standard deviations, medians or percentages. The mRNA levels were analyzed using Kruskal-Wallis's and Tukey's test for multiple comparisons. Mann-Whitney's and Fisher's tests were used for comparisons between two groups. The statistical significance level was established at P less than .05.

Results

No differences were observed between groups on the main demographical data, renal function and other relevant transplant information. There were 13 (68%) males, 17 (89%) caucasoids and 12 (63%) received kidneys from deceased donors. The mean age was 50.4 ± 11.8 years; patients had 5.7 ± 2.5 years of follow-up after transplantation. Mean serum creatinine level was 1.47 ± 0.43 mg/dL and the eGFR was 55.67 ± 15.18 mL/min/1.73 m²;

TIM-3 mRNA median levels of expression varied among groups: 2.65 (interquartile range 45.18) on MFA group, 28.79 (IQR 106.26) on RPM group, and 61.33 (IQR 555.69) on CI group. No differences were found in gene expression comparisons ($P = 0.684$). Figure 1 shows the logarithmic transformed data for the treatment groups. In multivariate analyses caucasian ethnicity ($P=0.015$) and eGFR ($P=0.006$) were independently associated to TIM-3 mRNA expression.

Discussion

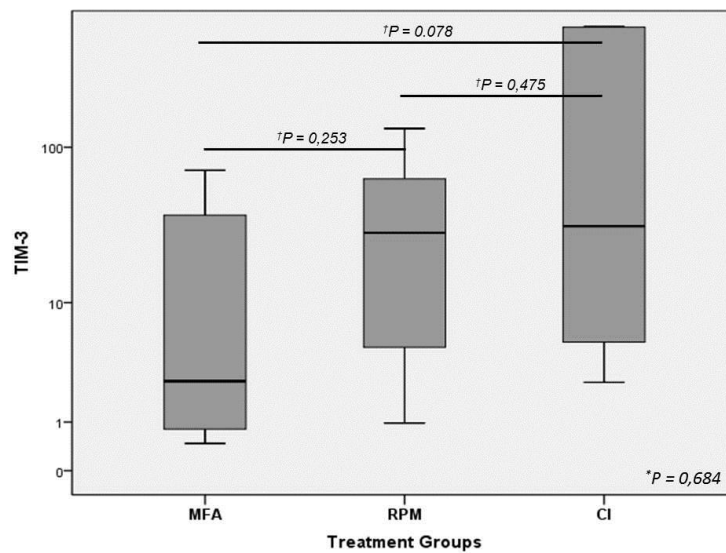
In this preliminary work we analyzed only patients taking one immunosuppressive drug in addition to steroids. No differences were found among treatment groups. However, the levels of expression were low and these data must be cautiously interpreted since only stable grafts were studied. Also, we observed a great variability of the mRNA expression levels among patients. The reasons for such are not entirely clear but the small number of individuals and the heterogeneity of biological human responses might have contributed. Studies in a larger population would probably uncover stronger associations between gene expression profiles and type of immunosuppressive regimens.

Correlating gene expression and immunosuppressive agents may be a promising strategy, and improvements on these evaluations such as multiple gene analyses could better identify these associations and help determining the role for molecular biomarkers for tailoring immunosuppressive therapy.

References

1. Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation* 2006; 81: 643.
2. Anglicheau D, Suthanthiran M. Noninvasive prediction of organ graft rejection and outcome using gene expression patterns. *Transplantation* 2008;86: 192.
3. Strom TB, Suthanthiran M. Transcriptional profiling to assess the clinical status of kidney transplants. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; 2: 116.
4. Hartono C, Dadhania D, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of acute rejection of solid organ transplants. *Front Biosci* 2004; 9: 145.
5. Aquino-Dias EC, Veronese FJ, Santos Gonçalves LF et al. Molecular markers in subclinical acute rejection of renal transplants. *C Transplant.* 2004;18:281.
6. Aquino-Dias EC, Joelsons G, da Silva DM et al. Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney Int* 2008;73:877.
7. Manfro RC, Aquino-Dias EC, Joelsons G et al. Noninvasive TIM-3 messenger RNA evaluation in renal transplant recipients with graft dysfunction. *Transplantation* 2008; 86:1869.

Figure 1.



Log transformed TIM-3 mRNA expression in the peripheral blood of stable kidney transplant recipients according to the immunosuppressive drug received.

MFA = mycophenolic acid; RPM = rapamycin; CI = calcineurin inhibitor. *

Kruskall-Wallis' test. [†] Mann-Whitneys' test.

Anexo 2. Ficha para Coleta de Dados

Paciente:	Prontuário:
Data de nascimento:	
Data transplante:	
Esquema imunossupressor:	
Doador: idade	creatinina
DM2 pré-Tx: () sim () não não	DM2 pós-Tx: () sim ()
HAS pré-Tx: () sim () não	
IPC:	
Colesterol total:	
HDL:	
LDL:	
Triglicerídeos:	
TSH:	
Cálcio:	
Fósforo:	
PTH:	
Ht:	
Hb:	
Leucócitos:	
AST:	
ALT:	