

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

**CORRELAÇÕES MOLECULARES DA FIBROSE INTERSTICIAL E
ATROFIA TUBULAR DE ALOENXERTOS RENAIIS HUMANOS.**

Aline de Lima Nogare

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

Nogare, Aline de Lima
Correlações Moleculares da Fibrose Intersticial e
Atrofia Tubular de Aloenxertos Renais Humanos /
Aline de Lima Nogare. -- 2011.
84 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. Transplante Renal. 2. Análise Molecular. 3.
Fibrose. 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

Ao Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro pela oportunidade, confiança e orientação.

A todos meus familiares que sempre torceram por mim e me apoiaram.

A todos meus amigos, em especial as minhas amigas do grupo de Pesquisa Clínica em Nefrologia e Transplante Renal, que participaram de todas as etapas do meu trabalho, pela amizade e apoio.

A equipe do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo auxílio nas coletas das amostras e pelas informações.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas pela oportunidade de ensino.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), pelo suporte financeiro.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino gratuito e de qualidade.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais Paulo Nogare e Vera Nogare por todo esforço, educação, incentivo e acima de tudo pelo amor que me proporcionaram para que eu conseguisse chegar até aqui.

Aos meus avós Ênio Lima e Ieda Lima pelo carinho e torcida.

Ao meu namorado Joel Franceschini pelo auxílio nos momentos em que precisei, por seu companheirismo e amor.

Sumário

Lista de abreviaturas	5
Resumo	7
Capítulo 1. Introdução	8
Capítulo 2. Revisão da literatura	11
2.1. Transplante renal e a importância do sistema HLA	12
2.2. Imunobiologia do alotransplante	13
2.2.1. <i>Bases imunológicas da rejeição de enxertos</i>	13
2.2.2. <i>A perda crônica da função renal</i>	15
2.3. Potenciais marcadores moleculares nos processos de fibrose renal	17
2.3.1. <i>KIM-1 (kidney injury molecule-1)</i>	17
2.3.2. <i>TGF-β (transforming growth factor- β)</i>	20
2.3.3. <i>CTGF (connective tissue growth factor)</i>	23
2.4. Diagnóstico molecular	25
2.4.1. <i>PCR em tempo real</i>	27
Capítulo 3. Objetivos	30
Capítulo 4. Referências da revisão da literatura	32
Capítulo 5. Artigo	42
Capítulo 6. Considerações finais	69
Anexos	72

Lista de Abreviaturas

APCs - células apresentadoras de antígenos

BMPs - proteínas morfogenéticas ósseas

CCN - família de proteínas composta por CTGF, Cyr61 e NOV, entre outras.

cDNA – DNA complementar

CPH - complexo principal de histocompatibilidade

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

CYR61 - *cystein-rich protein*

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

DNA - ácido desoxirribonucléico

DRC - doença renal crônica

EMC - componentes da matriz extracelular

HAVCR-1 - *hepatitis A vírus cellular receptor-1*

HLA - antígenos dos leucócitos humanos (*human leukocyte antigen*)

HSD - *honestly significant difference*

IL-2 - interleucina-2

IFN- γ - interferon-gama

IF/TA - fibrose intersticial/ atrofia tubular (*interstitial fibrosis/ tubular atrophy*)

Kim-1 - molécula de injúria renal-1 (*kidney injury molecule-1*) em roedores

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

LAP - latência associada a peptídeo

MHC - complexo de histocompatibilidade maior

MMPs - metaloproteinases

MMP-2 - matriz metalloproteinase-2

mRNA - RNA mensageiro

NCE - nefropatia crônica do enxerto

NOV - *nephroblastoma overexpressed gene*

PAI-1 - plasminogênio ativador-inibidor-1

PCR - reação em cadeia da polimerase

PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas

RT-PCR - PCR em tempo real

RNA - ácido ribonucléico

R-Smads - smads receptor-ativados

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

Th – linfócito T *helper*

TIM-1 - *T-cell immunoglobulin mucin-1*

TNF- β - fator de necrose tumoral-beta

Tsp-1 – trombospondina-1

Resumo

Neste estudo, avaliamos quantitativamente, pela técnica de PCR em tempo real, a transcrição do mRNA dos genes CTGF, TGF- β e KIM-1, em biópsias de pacientes transplantados renais com disfunção do enxerto. Testamos a hipótese de que, em pacientes com doença crônica do transplante renal, essas moléculas estão envolvidas no desenvolvimento de fibrose desses enxertos, apresentando aumento da sua expressão gênica, e que essa expressão aumenta na medida em que o grau de fibrose tecidual é mais intenso. Setenta e sete pacientes transplantados renais que foram submetidos a biópsia renal por disfunção do enxerto entre janeiro de 2008 e dezembro de 2009 foram incluídos no estudo. Pacientes e biópsias foram classificados em quatro grandes grupos de diagnóstico, de acordo com a classificação Banff-2007: necrose tubular aguda (NTA; n = 9), rejeição aguda (RA, n = 49), nefrotoxicidade aguda por inibidor da calcineurina (NIC; n = 10) e fibrose intersticial e atrofia tubular (IF/TA; n = 29). Para os genes CTGF e TGF- β , os níveis de mRNA foram significativamente maiores em IF/TA em comparação com NIC e RA. Para o gene KIM-1, os níveis de mRNA no grupo IF/TA foram maiores do que no grupo NIC. Além disso, verificamos que a expressão dos genes CTGF, TGF- β e KIM-1 aumenta com a intensidade da fibrose observada nos exames patológicos. A avaliação molecular do tecido do enxerto renal pode ser usada para aprimorar o diagnóstico patológico e para o possível desenvolvimento de biomarcadores.

Capítulo 1. Introdução

O transplante renal é, para uma porção significativa dos pacientes portadores de doença renal crônica, a opção terapêutica com maior potencial para restauração de uma vida saudável e produtiva (1).

O primeiro transplante renal realizado com sucesso ocorreu em 1954 em Boston entre gêmeos idênticos. Nessa década, estudos demonstraram a importância de mecanismos imunológicos e da identidade genética entre doador e receptor para que a transplantação fosse facilitada. Na década de 1960, a partir do reconhecimento das propriedades imunossupressoras da azatioprina em combinação com corticosteróides, se tornou possível a realização de transplantes envolvendo doadores e receptores não-idênticos.

A evolução das técnicas cirúrgicas e o desenvolvimento de novos fármacos e de agentes biológicos, com propriedades imunossupressoras, principalmente os inibidores da calcineurina, foram fatores que contribuíram de forma significativa para um aumento progressivo da sobrevida do paciente e do enxerto no primeiro ano de pós - transplante, permitindo que a incidência de episódios de rejeição aguda fosse reduzida (2,3). Contudo, a sobrevida em longo prazo não tem se modificado. Por essa razão, os fatores que influenciam nos resultados tardios têm assumido maior importância, sendo o principal a fibrose intersticial e atrofia tubular (IF/TA) (4). A falta de sensibilidade e de especificidade de biomarcadores para detectar o tipo de lesão tem dificultado o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para melhorar os desfechos relacionados ao transplante (5). Acredita-se que com melhores biomarcadores, se poderá ter a capacidade de detectar e identificar precocemente lesões subclínicas, fornecer prognósticos e informações sobre o curso da insuficiência renal e proporcionar uma base racional para avaliar a resposta terapêutica (6).

Presentemente os diagnósticos das condições que causam agressões aos enxertos dependem sobremaneira da análise do tecido renal obtido por biópsias. Estas, no entanto, são procedimentos arriscados, caros, sujeitos a complicações e a erros de amostragem (7,8,9), tornando-se assim desejável o desenvolvimento de técnicas não invasivas que possibilitem um diagnóstico preciso (9).

Estudos demonstraram, recentemente, que em pacientes com disfunção inicial do enxerto (DGF, do inglês *delayed graft function*), assim como em rins previamente funcionantes que apresentem episódios de disfunção aguda, é possível diagnosticar-se a rejeição aguda de forma não invasiva pela mensuração do mRNA de genes selecionados em células sanguíneas e do sedimento urinário (10,11). E, por meio da análise transcripcional, verificou-se a presença de episódios inflamatórios aloimunes sem que tenha sido possível evidenciar, através da análise de biomarcadores, a injúria decorrente das lesões causadoras de perda progressiva da função renal pela determinação de fibrose intersticial e atrofia tubular. Isso representa um elo perdido nessa cadeia de agressão, injúria e reparação inerente a alotransplantação.

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os potenciais novos marcadores moleculares de IF/TA, KIM-1 (*Kidney injury molecule-1*), TGF- β (*transforming growth factor – beta*) e CTGF (*connective tissue growth factor*), visando validar métodos moleculares não invasivos para esse diagnóstico.

2. Revisão da literatura

2.1 Transplante renal e a importância do sistema HLA

A história dos transplantes é marcada por frustrações e conquistas. Várias tentativas em animais foram feitas até que se conseguisse realizar o procedimento no ser humano. Em 1933, realizou-se na Ucrânia, o primeiro transplante renal em humanos, sendo seu insucesso atribuído a processos imunológicos. Os êxitos iniciaram por volta de 1946, quando um enxerto renal funcionou por três dias. No entanto, embora as técnicas cirúrgicas tivessem evoluído, observou-se um novo problema: a rejeição do órgão transplantado (12). Posteriormente os avanços no conhecimento do sistema HLA em muito contribuíram para o avanço na transplantação. Isto decorre do fato que as moléculas HLA são o principal alvo das respostas imunológicas causadoras da rejeição de órgãos. Diante disso, a compatibilidade HLA entre o par doador-receptor, avaliada com a prova cruzada, é de fundamental importância para o sucesso do transplante renal (13).

As moléculas do sistema HLA são codificadas no complexo principal de histocompatibilidade (CPH), localizado no braço curto do cromossomo seis humano e constitui-se por genes com importantes funções imunológicas. O sistema divide-se em três regiões que codificam os antígenos de classe I, classe II e classe III, de acordo com a estrutura e função dos seus genes. Os antígenos de classe I e II estão expressos na superfície celular, apresentando grande polimorfismo genético. A experiência clínica tem demonstrado que de todos os loci das classes I e II, HLA-A, HLA-B e HLA-DR são os que apresentam melhor desempenho prognóstico em transplante de órgãos (14).

A rejeição dos transplantes pode ser prevenida ou tratada pela minimização da imunogenicidade do enxerto, pela indução de tolerância e por imunossupressão do hospedeiro. A imunossupressão é principalmente direcionada às respostas de células T e compreende o uso de medicamentos imunossupressores, anticorpos monoclonais e policlonais e proteínas de fusão. As drogas e agentes imunossupressores com diferentes mecanismos de ação são usados de forma combinada de modo a produzir efeito imunossupressor complementar e aditivo (15,16,17).

2.2 Imunobiologia do alotransplante

2.2.1 Bases imunológicas da rejeição de enxertos

As células T desempenham papel fundamental na rejeição de aloenxertos. A ativação dessas células depende da apresentação de aloantígenos por células apresentadoras de antígenos (APCs), derivadas do doador, presentes no enxerto (apresentação direta de antígenos) ou por APCs do hospedeiro que captam e apresentam aloantígenos do enxerto (apresentação indireta). As células dendríticas são as APCs residentes na maior parte dos órgãos. A apresentação indireta pode resultar em alo-reconhecimento por células T CD4⁺ (auxiliares, Th), apresentadas por moléculas do MHC (complexo de histocompatibilidade maior, denominado sistema HLA em humanos) classe II, enquanto a via de reconhecimento de antígenos de MHC classe I é indiretamente reconhecida por células T CD8⁺ (citotóxicas, Tc) (18,19). O processo de rejeição de enxertos pode ser dividido

em duas etapas: uma fase de sensibilização, na qual linfócitos do receptor reativos ao antígeno proliferam em resposta aos aloantígenos do enxerto e uma fase efetora, na qual células T citotóxicas e anticorpos isoladamente ou em conjunto levam a destruição do enxerto. As citocinas secretadas pelas células Th participam das duas fases, amplificando a resposta imune e perpetuando ou modulando a inflamação. A IL-2, o IFN- γ e o TNF- β são importantes mediadores da rejeição do enxerto, participando respectivamente da proliferação de células T, do desenvolvimento de uma resposta de hipersensibilidade tardia, promovendo o influxo de macrófagos para o enxerto e sua subsequente ativação em células destrutivas, e no efeito citotóxico direto sobre as células do enxerto. A rejeição do aloenxerto mediada por células se manifesta como uma rejeição aguda e geralmente ocorre após a primeira semana do transplante. Em contrapartida, a rejeição mediada por anticorpos (antiga rejeição humoral), pode ser manifestada como rejeição hiperaguda, aguda ou crônica. Na rejeição hiperaguda o órgão transplantado é rejeitado rápida e inexoravelmente. Os complexos antígeno-anticorpos formados ativam o sistema complemento, resultando em intensa infiltração de neutrófilos e oclusão trombótica da vasculatura do enxerto. Os aloanticorpos IgG preexistentes frequentemente mediam esse tipo de rejeição nos primeiros dias após o transplante. Na rejeição aguda mediada por anticorpos geralmente há disfunção do enxerto que ocorre rapidamente, ao passo que na crônica a disfunção ocorre mais lentamente e geralmente se acompanha de proteinúria (20). Na figura 1 abaixo, estão representadas de forma esquemática as repostas celulares da rejeição de aloenxertos e seus principais mecanismos efetores.

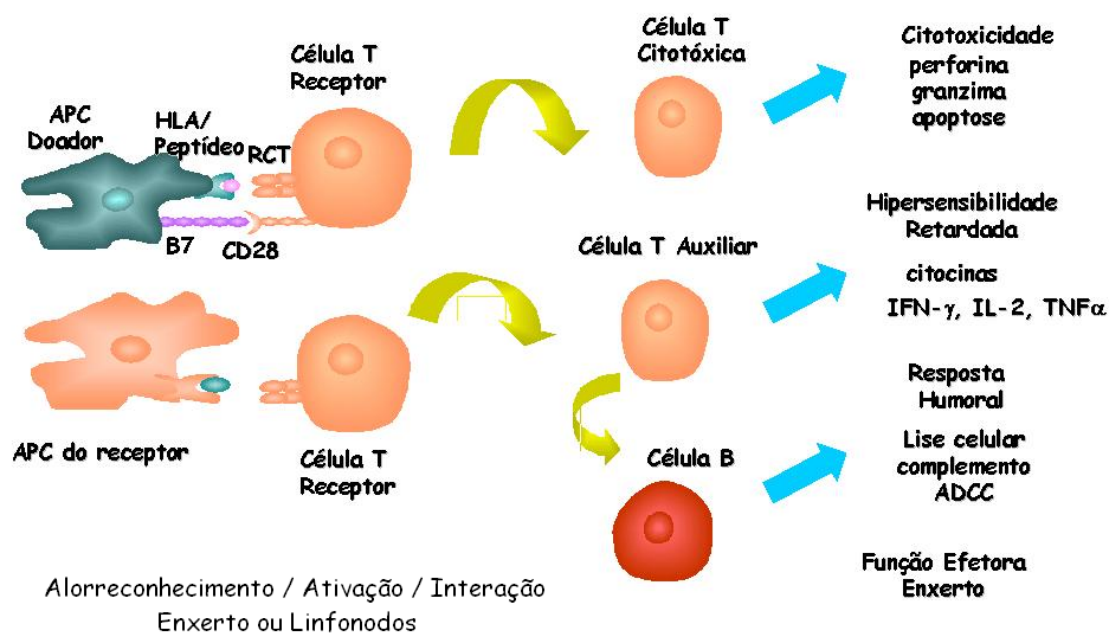


Figura 1 - Mecanismos efetores da rejeição alôgênica. O reconhecimento alôgênico, pelos linfócitos T, desencadeia uma série de interações entre diferentes células do sistema imune, ativando diversos mecanismos efetores de agressão ao enxerto, como: (i) citotoxicidade mediada por células, seja por apoptose, 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.

2.2.2 A perda crônica da função renal

A doença renal crônica (DRC) tem alcançado proporções epidêmicas, estimando-se que 10% da população seja afetada por essa condição. Tal em todo o mundo representa não só um problema de saúde, mas também um enorme problema econômico e social. Com o aumento da incidência de diabetes, hipertensão e obesidade o número de pacientes com DRC deverá subir ainda mais. Pacientes com insultos repetitivos agudos também poderão desenvolver DRC e, eventualmente, doença renal terminal (21). A fibrose renal, determinada pela fibrose tubulointersticial e glomerulosclerose, é a

manifestação final da DRC e decorre de uma acumulação excessiva e deposição de componentes da matriz extracelular (ECM) (22). Durante esse processo, os fibroblastos migram para o tecido danificado, onde produzem e subsequente remodelam a matriz extracelular, resultando em cicatrização e reconstituição do tecido conjuntivo. Os miofibroblastos, forma especializada dos fibroblastos, são responsáveis por mediar esses eventos e persistem nas lesões fibróticas (23).

No contexto do transplante renal a rejeição crônica caracteriza-se pela perda progressiva da função renal, acompanhada de fibrose intersticial, atrofia tubular, alterações oclusivas vasculares e glomerulosclerose. O sistema de Classificação Banff, iniciado em 1997 e tendo sofrido importantes modificações sucessivas até 2007, na *9th Banff Conference in Allograft Pathology*, é utilizado como padrão ouro para o diagnóstico das afecções dos rins transplantados. No que se refere à perda crônica de função dos rins transplantados, o termo fibrose intersticial e atrofia tubular (IF/TA) é utilizado para classificar as lesões crônicas destes compartimentos, para as quais não se chega a diagnóstico específico, e substituiu o termo “nefropatia crônica do enxerto” por ser este descritivo e inespecífico (24). A patogênese desse tipo de lesão é provavelmente multifatorial mediada por mecanismos imunes, aloantígenos-dependentes (rejeição aguda, retardo na função do enxerto, histocompatibilidade, hipersensibilização) e não imunes, aloantígenos-independentes (massa de néfrons, hipertensão, imunossupressão inadequada, hiperlipidemia, má aderência às medicações, infecção pelo citomegalovírus, poliomavírus, nefrotoxicidade por ciclosporina ou tacrolimo) (25,26). As reações de rejeição crônica são difíceis de controlar com medicamentos

imunossupressores e, por isso, os pacientes que virem a manifestar essa condição apresentam geralmente perda progressiva com esgotamento da função do enxerto e retorno à terapia dialítica (13).

2.3. Potenciais marcadores moleculares nos processos de fibrose renal

2.3.1 KIM-1 (*Kidney injury molecule-1*)

A molécula de injúria renal -1 (designada como Kim-1 em roedores e KIM-1 em humanos) (27) é uma glicoproteína transmembrana do tipo I com domínios constituídos por imunoglobulina e por mucina na porção extracelular, sendo o domínio mucina altamente glicosilado (28). KIM-1, também referida como TIM-1 (T-cell immunoglobulin mucin-1) e HAVCR-1 (hepatitis A vírus cellular receptor-1) (29), apresenta o gene localizado no cromossomo 5q33.2 em humanos (30), sendo sua expressão indetectável no rim ou urina de indivíduos saudáveis. No entanto, está marcadamente presente na insuficiência renal aguda, após eventos isquêmicos ou nefrotóxicos, possivelmente desempenhando um papel protetor na fase inicial da lesão renal, e na doença renal crônica (31-32).

O domínio citoplasmático dessa molécula é relativamente curto e possui um sítio potencialmente fosforilado, indicando que Kim-1 talvez seja um sinalizador molecular. O ectodomínio é clivado por uma metaloproteinase e lançado na urina. O peptídeo remanescente pode ser detectado como um produto desse lançamento (33). A figura 2 abaixo mostra de forma esquematizada a estrutura da molécula.

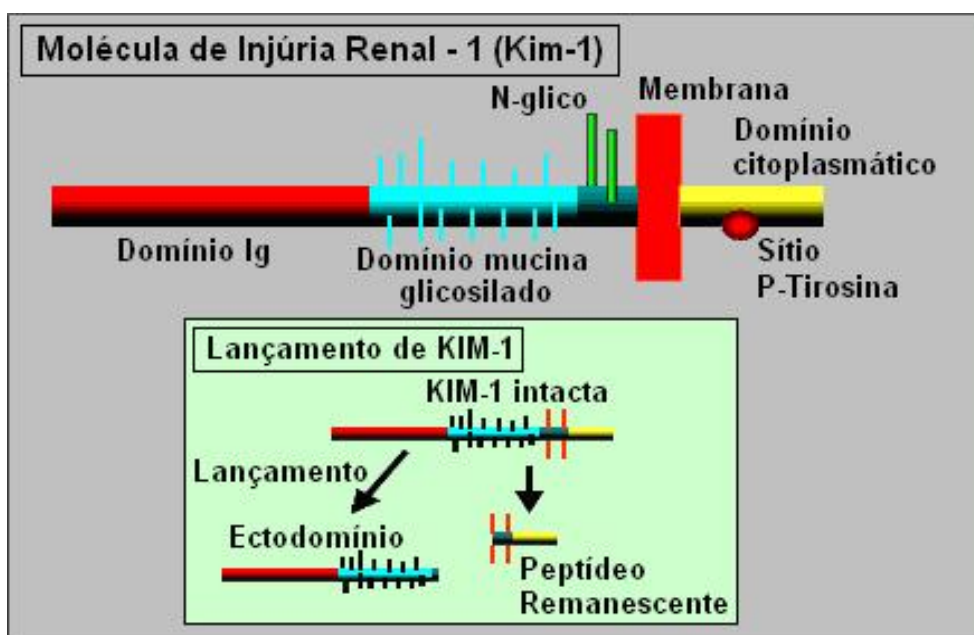


Figura 2 - Molécula de injúria renal-1 (KIM-1). Modificado da referência (34)

Os níveis urinários de KIM-1 (uKIM-1) estão intimamente relacionados a lesão tecidual e se correlacionam com a gravidade da lesão renal, oferecendo a oportunidade para a quantificação uKIM-1 como um potencial método não invasivo de detecção de agressão renal e para monitorar a evolução e resposta terapêutica da lesão (35).

Há um grande número de estudos em animais, nos quais foi demonstrada elevada produção da proteína Kim-1 nos segmentos do túbulo proximal, predominantemente no segmento S3, isto ocorreu experimentalmente em decorrência de agressão por diferentes toxinas ou como resultado de desdiferenciação fisiopatológica no epitélio tubular (36,37). Desdiferenciação é uma resposta celular epitelial precoce em resposta à injúria (38). A expressão de Kim-1 no epitélio tubular desdiferenciado sugere que essa proteína participe dos processos de fibrose tubular (39), sugerindo também a função de marcador da proliferação com possível papel em mecanismos regenerativos (33).

KIM-1 é expresso predominantemente em células Th2 (40) e atua no rim como um receptor PS (*phosphatidylserine*) responsável pela captação de células apoptóticas e de exosomas. Desse modo, talvez funcione como um sensor extracelular ou um receptor de adesão sinalizando uma variedade de processos envolvendo interações célula-célula ou célula-patógeno (41).

As células epiteliais do túbulo proximal do rim são particularmente sensíveis à nefrotoxicidade química, às drogas e à isquemia. Em resposta a esses fatores, células tubulares são submetidas a uma série de eventos: perda da polaridade e integridade do citoesqueleto; apoptose e morte celular necrótica, incluindo necroses secundárias; desdiferenciação e proliferação de células sobreviventes; repopulação e rediferenciação de células regeneradas.

Nesse contexto, umas das manifestações patológicas são o acúmulo de células apoptóticas e de fragmentos necróticos, e a formação de agregados de células mortas, semi-viáveis e viáveis e de outros fragmentos celulares no lúmen do túbulo proximal danificado (31). Essas células e fragmentos poderiam desaparecer com processos de reparação. Em contrapartida, uma falha na remoção dessas células poderá acarretar processos inflamatórios e autoimunes. A atividade fagocitária é, nesse caso, de extrema importância para a reparação do tecido renal. Foi demonstrado, em humanos, que células apoptóticas e necróticas do lúmen tubular foram fagocitadas por células epiteliais que expressam KIM-1, o qual estava localizado, predominantemente, na membrana apical proximal. Funcionalmente, esse processo é crítico para a remodelação após a lesão, pois é importante que o lúmen dos túbulos proximais sejam limpos de restos de células mortas para facilitar a desobstrução intratubular (41).

Em um estudo com 102 biópsias renais foi demonstrado que KIM-1 estava significativamente expresso e localizado no lado apical dos túbulos dilatados em áreas fibróticas de todas as doenças renais, exceto para doenças de lesões mínimas. Adicionalmente, a sua expressão foi significativamente associada à condição patológica glomerular e ao fluxo glomerular dos macrófagos. A dupla marcação imunohistoquímica para KIM-1 mostrou, ainda, a presença desta molécula principalmente em regiões com macrófagos intersticiais e nas lesões pré-fibróticas, e positividade de KIM-1 em células tubulares desdiferenciadas (42). Em um estudo do nosso grupo, em que a expressão gênica de KIM-1 foi analisada por PCR em tempo real, em 59 biópsias de transplantados renais, classificadas de acordo com o esquema Banff 1997, verificou-se aumento significativo ($P < 0,05$) de KIM-1 em IF/TA quando comparada à expressão observada na rejeição aguda e na necrose tubular aguda com episódios de rejeição aguda superimposta (43).

Portanto, com base nos dados descritos, suporta-se a noção de que a molécula KIM-1 funciona como mediador da fagocitose e reparador celular, mas devido à proliferação excessiva de células causada por essa reparação KIM-1 pode estar relacionado ao desenvolvimento de fibrose do tecido renal previamente agredido.

2.3.2 TGF- β (*Transforming growth factor-B*)

Transforming growth factor-beta (TGF- β) foi um dos primeiros fatores pró-fibróticos descritos na literatura sendo, provavelmente, um dos muitos fatores envolvidos na fibrogênese, atuando em conjunto com outras moléculas

(21). TGF- β é um polipeptídeo que juntamente com as ativinas, inibinas, fatores de diferenciação de crescimento, proteínas ósseas morfogenéticas, constituem a superfamília TGF- β de citocinas. Essa proteína encontra-se em três subtipos, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, sendo a primeira isoforma a mais comumente encontrada em seres humanos (44,45). TGF- β 1 localiza-se no cromossomo 19q13 (46) e desempenha diferentes funções celulares incluindo o crescimento celular, diferenciação, proliferação, migração, adesão, apoptose e produção de matriz extracelular (47,48).

TGF- β 1 está presente nas células endoteliais, células musculares lisas vasculares, miofibroblastos, macrófagos (49), citoplasma das células epiteliais tubulares e em pequenas áreas do interstício (50), desempenhando funções de reparo por aumentar a síntese de colágeno e angiogênese. Verificou-se, ainda, que essa molécula suprime a proliferação de linfócitos, sendo produzida por linfócitos ativados (51,52), e que está envolvida na patogênese de doenças renais por estimular a proliferação de células mesangiais e pela síntese de componentes da matriz extracelular, induzindo a transformação de células do epitélio mesenquimal no tecido renal (53). Assim, o TGF- β induz fibrose durante o processo de reparação do tecido e contribui para a patogênese de uma variedade de doenças renais: nefropatia por IgA, nefrite lúpica, glomeruloesclerose focal e segmentar, nefropatia diabética. Estudos demonstraram significativa correlação da expressão de TGF- β com fibrose celular, bem como foram evidenciados aumentos dos seus níveis urinários em pacientes com quadros nefríticos comparados a indivíduos saudáveis. Além disso, níveis urinários elevados de TGF- β correlacionam-se a má resposta à terapia imunossupressora (54,55).

Normalmente a liberação de TGF- β 1 cessa por mecanismos de *feed-back*, quando o processo de cicatrização foi completado. Contudo, se esse mecanismo não for controlado, ocorrerá acúmulo de matriz extracelular, levando à fibrose tecidual (56,57). Este é o mecanismo pelo qual, possivelmente, a produção aumentada de TGF- β esteja associada à falha progressiva de aloenxertos renais decorrentes de processo de fibrose como os que ocorrem na rejeição crônica e na nefrotoxicidade crônica decorrente do uso de inibidores de calcineurina (58).

TGF- β apresenta-se nos tecidos na sua forma latente como uma proteína precursora inativa, LAP (latência associada a peptídeo). Quando os tecidos são danificados e precisam ser reparados, TGF- β dissocia LAP sendo ativado e liberado. Esse processo envolve vários fatores incluindo a plasmina, MMPs (metaloproteinases) e Tsp-1.(trombospondina-1) (52). A forma ativa do TGF- β se liga aos seus receptores e induz a fosforilação de Smad 2/3 (proteínas intracelulares que sinalizam a transcrição de TGF- β no núcleo), e BMPs (proteína morfogenética óssea) induzem a fosforilação de Smad 1/5/8. Após ativação, R-Smads (Smads receptor-ativados) formam complexos com Smad 4 heteromérico e regulam a expressão de genes alvo de TGF- β , como fibronectina, colágeno tipo I, PAI-1 (plasminogênio ativador-inibidor1) e MMP-2 (matriz metaloproteinase-2) no núcleo (44,59). A figura 3 abaixo ilustra esses mecanismos.

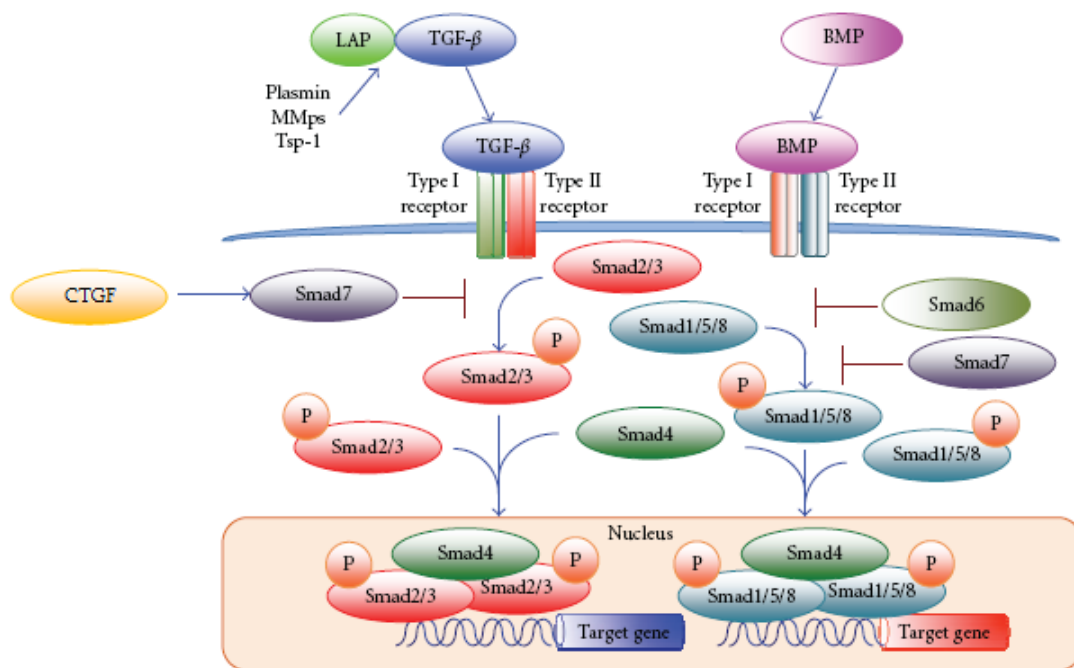


Figura 3 - Via de sinalização celular e ativação do TGF-β, e ação do CTGF na molécula Smad7. Adaptado da referência 44.

2.3.3 CTGF (*Connective tissue growth factor*)

Connective tissue growth factor (CTGF) é descrito como um mediador dos efeitos pró-fibróticos do TGF-β1, incluindo proliferação e produção de matriz extracelular, e facilitando a interação com seu receptor. CTGF é estimulado por todas as isoformas de TGF-β, sendo abundante na glomeruloesclerose e em outras desordens fibróticas (60).

CTGF foi inicialmente identificado como uma proteína secretada por cultura de células endoteliais humanas, também conhecido como CCN2, pertence à família CCN (*ctgf/cyr61/nov*) de genes de resposta precoce, situando-se no cromossomo 6q23.1 (61). As proteínas dessa família agem através de integrinas e de heparan sulfato proteoglicanos, sinalizando direta e indiretamente a modulação das atividades funcionais de outros ligantes

extracelulares, tais como citocinas, fatores de crescimento, morfogenes e componentes da matriz extracelular (62). Além disso, todos os genes dessa família são caracterizados por uma alta porcentagem de homologia de aminoácidos em sua seqüência e apresentam 38 resíduos de cisteína que se agrupam em um dos seguimentos, 22 na região N-terminal e 16 na região C-terminal. Isso é típico de outros fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento neural e TGF- β (63,64). CTGF está expresso de forma proeminente nos compartimentos glomerular e tubular na doença renal progressiva (65,66), não sendo seu mRNA detectado em túbulos renais humanos normais (67). Doenças como desordens proliferativas e lesões fibróticas, doenças da pele, aterosclerose, fibrose pulmonar e diversas patologias renais apresentam níveis teciduais elevados de CTGF, localizado principalmente em áreas fibróticas (61).

CTGF estimula diretamente a adesão de fibroblastos, um processo que decorre provavelmente da interação dessa molécula com as integrinas. Além disso, verificou-se que em cultura de fibroblastos estimula a produção de vários componentes da matriz extracelular como colágeno I, fibronectina, $\alpha 5$ -integrina, em rim saudável de modelos experimentais; fibronectina, colágeno I e colágeno IV, em células mesangiais; e lisil-oxidase e colágeno em fibroblastos da gengiva de humanos (68). A relação entre CTGF e TGF- β na estimulação da síntese de ECM foi recentemente definida. Ambos induzem expressão significativa de colágeno em células mesangiais, mas apenas o TGF- β estimula síntese dessa proteína em células tubulares epiteliais. Contudo, CTGF induz a expressão de TN-C (tenascina-C), a qual está elevada em diversos tipos de lesão de túbulos renais, facilitando o processo no qual células epiteliais

adquirem características de células mesenquimais/fibroblastos, durante a fibrose renal (69). Anticorpos anti-CTGF bloqueiam a síntese de colágeno por TGF- β nos fibroblastos, *in vitro*, e na cicatrização de feridas, *in vivo*. Baseado nessa observação tem sido proposto CTGF ser um mediador pró-fibrótico de TGF- β (70).

CTGF pode exercer seu efeito estimulante sobre TGF- β interferindo na disponibilidade de Smad7/Smad2 (71) por suprimir a indução de Smad 7 (vide figura 3) em células mesangiais renais, aumentando a via de sinalização TGF- β / Smads, e emitindo sinais ao TGF- β para fosforilação de Smad2, para que exerça sua resposta fibrogênica no túbulo próximas de células humanas. A sinalização de Smad é atenuada por Smad 7, uma Smad inibitória que previne a fosforilação de R-Smad e interfere a formação do complexo R-Smads. Desse modo, Smad 7 inibe o efeito fibrótico de TGF-B em células tubulares renais, bloqueando a ativação de Smad2 (62,71).

Níveis urinários aumentados de CTGF (uCTGF) são relatados na nefropatia diabética, nefropatia crônica do enxerto (NCE), nefropatia por IgA, glomeruloesclerose focal segmentar e nefropatia membranosa idiopática (62), estando relacionados a gravidade da doença renal em nefropatias crônicas, correlacionando-se, também, com os achados histológicos e com a intensidade da proteinúria (72).

2.4. Diagnóstico Molecular

O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular proporcionou um dos maiores avanços no âmbito das ciências biológicas no final do século

passado. A descrição e o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR), por Kary Mullis, em 1983, foi um dos grandes impulsos nestas tecnologias, e este pesquisador recebeu em 1993 o Prêmio Nobel da Química, por seus trabalhos nessa área (73). Na sequência destes acontecimentos ocorreram grandes avanços na investigação científica e no diagnóstico laboratorial, incluindo sequenciamento de genomas, diagnóstico de doenças infecciosas, determinação da paternidade, bem como o estudo da expressão de genes (74).

Uma inovação tecnológica da PCR, denominada PCR em tempo real (RT-PCR), vem ganhando espaço nos laboratórios clínicos e de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos. Essa técnica permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida em relação à PCR convencional, a qual apresenta somente resultados qualitativos (75). De modo geral, o uso dessa ferramenta da biologia molecular, associada aos critérios morfológicos e clínico-laboratoriais convencionais, deverá permitir diagnóstico mais preciso e, conseqüentemente, o entendimento mais aprofundado da fisiopatologia das doenças renais. Mais ainda, a mensuração dos transcritos de mRNA pode se tornar método sensível e específico de prever o curso de doenças renais, monitorar a resposta terapêutica e eventuais efeitos adversos (76). Outra importante ferramenta nesta área são os microarranjos de DNA (DNA microarrays). Conceitualmente e de forma muito simples os microarranjos são melhor utilizados para a geração de hipóteses enquanto a PCR, em especial a PCR em tempo real, descrita abaixo, é utilizada para a confirmação de hipóteses, ambas em estudos que envolvem avaliações gênicas (77).

2.4.1 PCR em tempo real

Na área da genômica funcional a introdução da reação em cadeia da polimerase (PCR), após a transcrição reversa do RNA por ação da enzima transcriptase reversa, permitiu o conhecimento e descrição de perfis transcriptômicos de várias doenças. Nestas avaliações o RNA é extraído de células de amostras biológicas e, a partir desse, é sintetizado o DNA complementar (cDNA) por ação da transcriptase reversa. Ao cDNA obtido são adicionados TaqDNA polimerase (enzima termoestável), desoxinucleotídeos e as seqüências de DNA iniciadoras específicas do gene de interesse ("primers") (73), bem como fluorocromos intercalados em cadeias de DNA (metodologia SyberGreen) ou presentes em sondas de hibridização específicas (metodologia TaqMan), para a realização da técnica PCR em tempo real (78).

A metodologia TaqMan utiliza a atividade exonucleásica 5'-3' da TaqMan® DNA Polimerase e tem sido amplamente utilizada. Essa enzima digere uma sonda marcada que anela especificamente na parte interna do seguimento a ser amplificado entre dois *primers*. A sonda TaqMan possui na extremidade 5' uma molécula fluorescente cuja função é denominada "*reporter*" e na extremidade 3', outra molécula que pode ou não ser fluorescente, com comprimento de onda diferente, cuja função é chamada de "*quencher*". Enquanto a sonda está íntegra, o "*quencher*" oculta o sinal fluorescente do "*reporter*". Esse efeito desaparece quando a sonda, anelada entre os *primers*, é clivada pela atividade exonucleásica da enzima Taq® DNA polimerase. Enquanto a reação de PCR se processa, a polimerase sintetiza novas cadeias a partir dos *primers* e cliva a sonda correspondente, resultando em aumento do

sinal fluorescente, o qual é captado a cada ciclo até atingir um limiar (*threshold*), no qual todas as amostras podem ser comparadas. Esse limiar corresponde ao momento utilizado para análise da fluorescência e obrigatoriamente deve estar na faixa em que a quantidade de fluorescência gerada pela amplificação das amostras torna-se significativamente maior que a fluorescência de base (*background*). O limiar é definido na fase exponencial da reação de PCR, quando a quantidade de produto formada traduz de forma satisfatória a concentração inicial de fitas molde (mRNA/cDNA) amplificadas pela reação (79).

Os equipamentos destinados a realização de PCR em tempo real, associam um termociclador a um leitor de fluorescência capaz de medir a luz proveniente da reação de amplificação. Na presença do produto amplificado, os fluorocromos, excitados por uma fonte de luz (laser), emitem um sinal proporcional à quantidade de produto sintetizado que, por sua vez, será proporcional à quantidade inicial de seqüências-alvo presentes na reação de amplificação. Os sinais produzidos, à medida que o produto é amplificado, são detectados por um sistema óptico, analisados por software específico e expressos graficamente (sinais de fluorescência versus número de ciclos) permitindo monitorar, em tempo real, a cinética e a eficiência da reação de amplificação (80). A quantificação do produto amplificado pode ser absoluta, quando esse é comparado com uma curva padrão, ou relativa, quando relaciona o sinal de PCR da transcrição alvo com o de um calibrador (amostra utilizada como base para resultados de expressão comparativa). Nesse caso, o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ é utilizado para análise da expressão gênica (81). Esta seqüência de acontecimentos está sumarizada na figura 4 abaixo.

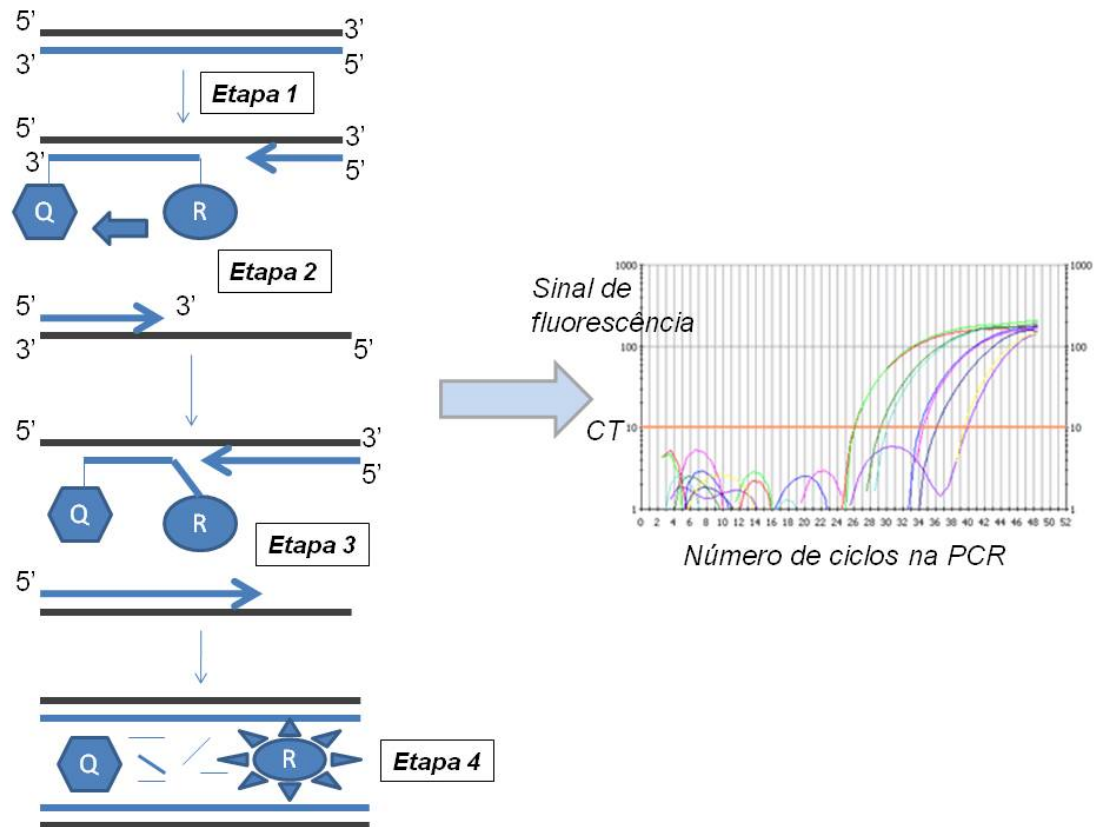


Figura 4 - Reação de PCR em tempo real. Etapa 1 – desnaturação e anelamento de sonda e primers. Etapa 2 – absorção da fluorescência. Etapa 3 – deslocamento da sonda. Etapa 4 – Degradação da sonda. O sinal de fluorescência emitido é detectado pelo aparelho e gera curvas de fluorescência. CT – *cycle threshold* (limite de detecção); Q – *quencher*; R – repórter. Adaptado de 82.

O presente estudo foi conduzido para testar a hipótese de que em pacientes com doença crônica do enxerto renal as moléculas envolvidas no desenvolvimento de fibrose desses enxertos apresentam expressão gênica aumentada e que esta expressão é tanto maior quanto mais intenso o grau de fibrose tecidual.

CAPÍTULO 3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar quantitativamente a transcrição do mRNA de genes relacionados ao desenvolvimento de fibrose renal em biópsias de pacientes transplantados renais com disfunção do enxerto.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão tecidual do gene molécula de injúria renal – 1 (KIM-1);
- Avaliar a expressão tecidual do gene fator de crescimento transformador beta (TGF- β);
- Avaliar a expressão tecidual do gene fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF);
- Correlacionar a expressão dos genes KIM-1, TGF- β e CTGF com o grau de fibrose intersticial e atrofia tubular da biópsia do enxerto conforme a classificação de Banff 2007.

CAPÍTULO 4. Referências da revisão da literatura

1. Cecka JM. The OPTN/UNOS renal transplant registry. In: Cecka, J.M., Terasaki, P.I., editors. Clin Transplant. Los Angeles (Calif): UCLA tissue typing laboratory 2005; 1-16.
2. Morris P. Results of renal transplantation. In: Kidney Transplantation, Principles and Practice, P. Morris, Editor. W.B. Saunders: Philadelphia, 2001.
3. Manfro RC, Gonçalves LF. Transplante renal: imunologia e farmacologia das drogas imunossupressoras In Nefrologia: Rotinas e diagnóstico, E. Barros, Manfro, RC, Thomé FS, Gonçalves, LFS e col. Editor Artmed: Porto Alegre, 2006.
4. Klein J, Miravete M, Buffin-Meyer B et al. Tubulo-interstitial fibrosis: an emerging major health problem. Med Sci. 2011; 27(1):55-61.
5. Vaidya VS, Waikar SS, Ferguson MA et al. Urinary Biomarkers for Sensitive and Specific Detection of Acute Kidney Injury in Humans. Clin Transl Sci. 2008; 1(3): 200–208.
6. Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of Acute Kidney Injury. Toxicol. 2008; 48:463-93.
7. Sorof JM, Vartanian RK, Olson JL et al. Histopathological concordance of paired renal allograft biopsy cores. Effect on the diagnosis and management of acute rejection. Transplantation 1995; 60(11):1215-9.
8. Colvin RB, Cohen AH, Saiontz C et al. Evaluation of pathologic criteria for acute renal allograft rejection: reproducibility, sensitivity, and clinical correlation. J Am Soc Nephrol 1997; 8(12):1930-41.
9. Rush D. Protocol transplant biopsies: an underutilized tool in kidney transplantation. Clin J Am Soc Nephrol 2006; 1(1):138-43.

10. Aquino-Dias EC, Joelsons G, da Silva D.M et al. Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney Int* 2008.; 73(7):877-84.
11. Manfro RC, Aquino-Dias EC, Joelsons G et al. Non Invasive Tim-3 mRNA Evaluation in Renal Transplant Recipients with Graft Dysfunction. *Transplantation* 2008; 86(12):1869-1874.
12. Garcia VD, Abbud Filho M, Neumann J, et al. *Transplante de órgãos e tecidos*, 2^a ed., São Paulo: Segmento Farma, 2006.
13. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Imunologia de Kuby*. Editor Artmed, Porto Alegre, 2008.
14. U. Shankarkumar. The Human Leukocyte Antigen (HLA) System. *Int J Hum Genet* 2004; 4(2): 91-103.
15. Game DS, Lechler RI. Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Transplant Immunology* 2002; 10(2-3):101-108.
16. Kuypers DRJ, Vanrenterghem YFC. Monoclonal antibodies in renal transplantation: old and new. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19(2): 297–300.
17. Green CJ. Immunosuppression with cyclosporin A: a review. *Diagn Histopathol*. 1981; 4(2):157-74.
18. Gould DS, Auchincloss HJr. Direct And Indirect Recognition: The Role Of MHC Antigens In Graft Rejection. *Immunol Today* 1999; 20(2):77-82.
19. Csencsits K, Wood SC, Guanyi Lu et al. Graft rejection mediated by CD4+ T cells via indirect recognition of alloantigen is associated with a dominant Th2 response. *Eur. J. Immunol* 2005; 35(3):843-851.
20. Abbas K, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*, 6th Saunders: Elsevier, Philadelphia, 2007.

21. Boor P, Floege J. Chronic kidney disease growth factors in renal fibrosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011; 38(7):391-400.
22. Cho MH. Renal fibrosis. *Korean J Pediatr* 2010; 53(7):735-740
23. Kapoor M, Liu S, Huh K et al. Connective tissue growth factor promoter activity in normal and wounded skin. *Fibrogenesis and Tissue Repair* 2008; 1(1):3.
24. Sementilli A, David DR, Malheiros D et al. Patologia do transplante renal: achados morfológicos principais e como laudar as biópsias. *J. Bras. Patol. Med. Lab* 2008; 44(4):293-304.
25. Maluf DG, Mas VR, Archer KJ et al. Molecular Pathways Involved In Loss Of Kidney Graft Function With Tubular Atrophy And Interstitial Fibrosis. *Mol Med* 2008; 14(5-6):276-85.
26. 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(3):518-26.
27. Witzgall R, Brown D, Schwarz C et al. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest* 1994; 93(5):2175-88.
28. 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(1): 237–244.
29. Meyers JH, Sabatos CA, Chakravarti S et al. The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases. *Trends Mol Med* 2005; 11(8):362–369.

30. 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(6871):536- 541.
31. 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(7):4135-4.
32. 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(2):F517-29.
33. Bailly V, Zhang Z, Meier W et al. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem* 2002; 277(42):39739–48.
34. Ichimura T, Mou S. *Journal of Chinese Integrative Medicine* 2008; 6(5): 533-538.
35. Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24(11):3265-8.
36. Ichimura T, Hung CC, Yang SA et al. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(3):552–563.
37. Zhou Y, Vaidya VS, Brown RP et al. Comparison of kidney injury molecule-1 and other nephrotoxicity biomarkers in urine and kidney following acute exposure to gentamicin, mercury, and chromium. *Toxicol Sci* 2008; 101(1): 159-170.

38. Bonventre JV. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(1):S55–61.
39. Humes HD, Liu S. Cellular and molecular basis of renal repair in acute renal failure. *J Lab Clin Med* 1994; 124(6):749–754.
40. Degauque N, Mariat C, Kenny J et al. Regulation of T-cell immunity by T-cell immunoglobulin and mucin domain proteins. *Transplantation*. 2007; 84(1):12-16.
41. Ichimura T, Asseldonk EJP, Humphreys BD et al. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest* 2008;118(5):1657-68.
42. Huo W, Liu R, Zhang K et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel kidney specific injury molecule playing potential double-edged functions in kidney injury. *Transplantation reviews* 2010; 24(3):143-146.
43. A. L. Nogare, G Joelsons, J.A.R. Pedroso, et al. Quantitative Analyses of Kidney Injury Molecule-1 Messenger RNA in Kidney Transplant Recipients With Graft Dysfunction. *Transplantation Proceedings* 2010; 42(2):473-474.
44. Aihara K, Ikeda Y, Yagi S et al. Transforming Growth Factor- β 1 as a Common Target Molecule for Development of Cardiovascular Diseases, Renal Insufficiency and Metabolic Syndrome. *Cardiol Res Pract.*2010; 2011:175381.
45. Ling Yu, Wayne A Border, Yufeng, et al. TGF- β isoforms in renal fibrogenesis. *Kidney International* 2003; 64(3):844–856.
46. Fujii D, Brissenden JE, Derynck R et al. Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. *Somat Cell Mol Genet*. 1986; 12(3):281-8.

47. Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A et al. Tgf- β 1 Induces Proliferation In Human Renal Fibroblasts Via Induction Of Basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2). *Kidney Int.* 2001; 59(2):579-92.
48. García-Sánchez O, López-Hernández FJ, López-Novoa JM. An integrative view on the role of TGF- β in the progressive tubular deletion associated with chronic kidney disease. *Kidney International* 2010; 77(11):950-955.
49. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. "Making sense of latent TGF- β activation," *J Cell Sci.* 2003; 116(2):217-24.
50. Yokoi H, Mukoyama M, Sugawara A et al. Role Of Connective Tissue Growth Factor In Fibronectin Expression And Tubulointerstitial Fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282(5): F933-42.
51. Surazynski A, Miltyk W, Prokop I et al. Prolidase-dependent regulation of TGF α and TGF β receptor expressions in human skin fibroblasts. *Eur J Pharmacol.* 2010; 649(1-3):115-9.
52. Taylor AW. Review of the activation of TGF- β in immunity. *J Leukoc Biol.* 2009;85(1):29-33.
53. Fukuda N, Tahira Y, Matsuda H et al. Transforming growth factor- β as a treatment target in renal diseases. *Jnephrol* 2009; 22(6):708- 715.
54. August P, Sharma V, Ding R et al. Growth Factor Beta And Excess Burden Of Renal Disease. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2009; 120:61-72.
55. Goumenos DS, Kalliakmani P, Tsakas S et al. Urinary Transforming Growth Factor beta 1 as a marker of response to immunosuppressive treatment, in patients with crescentic nephritis. *BMC Nephrology* 2005; 6:16.
56. Lawrence DA. Transforming growth factor- beta: An overview. *Kidney Int Suppl.* 1995; 49:S19-23.

57. Basile DP. The transforming growth factor beta system in kidney disease and repair: recent progress and future directions. *Curr Opin Nephrol Hypert* 1999; 8(1):21-30.
58. Sharma VK, Bologa RM, Xu GP et al. Intragraft TGF-beta 1 mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 1996; 49(5):1297– 303.
59. Derynck R, Zhang YE. Smad-Dependent and Smad-Independent Pathways in TGF-B Family Signalling. *Nature*. 2003; 425(6958):577-84.
60. Ito Y, Goldschmeding R, Kasuga H et al. Expression patterns of connective tissue growth factor and of TGF- β isoforms during glomerular injury recapitulate glomerulogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010; 299(3):F545-58.
61. Sánchez-López E, Díez RR, Vita JR et al. Connective tissue growth factor (CTGF): a key factor in the onset and progression of kidney damage *Nefrología* 2009; 29(5):382-391.
62. Leask A, Parapuram SK, Shi-wen X et al. Abraham Connective tissue growth factor (CTGF, CCN2) gene regulation: a potent clinical bio-marker of fibroproliferative disease? *J. Cell Commun. Signal*. 2009; 3(2):89–94.
63. Perbal B. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* 2004; 363(9402):62-4.
64. Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett* 1993; 327(2):125-30.
65. Shimizu F, Kawachi H, Orikasa M. Role of mesangial cell damage in progressive renal disease. *Kidney Blood Press Res* 1999; 22(1-2): 5–12.
66. Strutz F, Muller GA. Interstitial pathomechanisms underlying progressive tubulointerstitial damage. *Kidney Blood Press* 1999; 22(1-2): 71–80.

67. Kroening S, Neubauer E, Wullich B et al. Characterization of connective tissue growth factor expression in primary cultures of human tubular epithelial cells: modulation by hypoxia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 298(3): F796-806.
68. Moussad EEA, Brigstock DR. Connective Tissue Growth Factor: What's in a Name? *Molecular Genetics and Metabolism* 2000; 71(1-2):276-292.
69. Gore-Hyer E, Shegogue D, Markiewicz M et al. TGF- β and CTGF have overlapping and distinct fibrogenic effects on human renal cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283(4): F707-16.
70. Duncan MR, Frazier KS, Abramson S et al. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J* 1999; 13(13):1774-1786.
71. Qi W, Chen X, Twigg S et al. The differential regulation of Smad7 in kidney tubule cells by connective tissue growth factor and transforming growth factor-beta1. *Nephrology* 2007; 12(3):267–274.
72. Gerritsen KG, Peters HP, Nguyen TQ et al. Renal Proximal Tubular Dysfunction Is A Major Determinant Of Urinary Connective Tissue Growth Factor Excretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 298(6): F1457-64.
73. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 2006; 27(2-3):95–125.
74. Valones MAA, Guimarães AL, Cavalcanti LA et al. Principles And Applications Of Polymerase Chain Reaction In Medical Diagnostic Fields: A Review. *Brazilian Journal Of Microbiology* 2009; 40:1-11.
75. Bustin SA, Benes V, Nolan T et al. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 2005; 34(3):597–601.

76. Soares MF, Franco M. Aplicações da Biologia Molecular à Patologia Renal: Revisão da Literatura. J. Bras. Nefrol. 2007; 29(2):95-102.
77. Sarwal M, Chua MS, Kambham N et al. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. N Eng J Med 2003; 349(2):125-138.
78. Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG et al. Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction to Study mRNA Decay: Comparison of Endpoint and Real-Time Methods. Analytical Biochemistry 2000; 285(2): 194-204.
79. Almeida PSR, Saddi VA. Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real. Rev. bras. hematol. hemoter. 2007;29(4):382-386.
80. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. Experimental Hematology 2002; 30(6):503- 512.
81. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2^{-DDCT} Method. Methods 2001; 402–408.
82. Farah, SB. DNA: segredos e mistérios. São Paulo: Sarvier, 2007. 538 p.

Capítulo 5. ARTIGOS

5.1. “Molecular correlates of interstitial fibrosis and tubular atrophy of human renal allografts.”

Formatado para submissão à revista *American Journal of Transplantation*

Molecular correlates of intestinal fibrosis and tubular atrophy of human renal allografts.

Nogare AL¹

Fraga D²

Dalpiaz T¹

Gonçalves LF^{1,2}

Manfro RC^{1,2,3}

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

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, email: rmanfro@hcpa.ufrgs.br*

Running title: Molecular Evaluation of Allograft Fibrosis.

Key words: Kidney transplantation, biopsy, molecular analysis, fibrosis

Abbreviations

ATN – acute tubular necrosis

AR – acute rejection

cDNA - complementary desoxiribonucleic acid

CIN – acute calcineurin inhibitor nephrotoxicity

CT- threshold cycle

CTGF - connective tissue growth factor

ECM – extra cellular matrix

HLA – human leukocyte antigen

HSD- honestly significant difference

IF/TA - interstitial fibrosis / tubular atrophy

KIM-1 – Kidney injury molecule -1

mRNA - messenger RNA

PRA- last panel reactive antibody

RT-PCR - real-time polymerase chain reaction

RNA - ribonucleic acid

TGF- β - transforming growth factor beta

Abstract

We quantitatively assessed messenger RNA transcripts of the CTGF, TGF- β and KIM-1 genes, in biopsies of renal transplant recipients with graft dysfunction to test the hypothesis that in patients with chronic disease of the renal transplant, these molecules are biomarkers of graft fibrosis, presenting elevated mRNA transcripts levels. Seventy-seven kidney transplant recipients who undertook an indication graft biopsy between January 2008 and December 2009 were included. Patients and biopsies were classified into four major diagnostic groups, according to the Banff-2007 classification: acute tubular necrosis (ATN; n= 9), acute rejection (AR; n= 49), acute calcineurin inhibitor nephrotoxicity (CIN; n=10) and interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA; n=29). mRNA transcripts of the CTGF and TGF- β genes were significantly higher in IF/TA as compared with CIN and AR. mRNA transcripts of the KIM-1 gene in IF/TA group was higher than the CIN group. In addition it was observed that gene expression of CTGF, TGF- β and KIM-1 increased with the intensity of fibrosis observed in the pathological examinations. In conclusion molecular evaluation of the kidney graft tissue may be used to improve pathological diagnosis of renal graft fibrosis and can be used as biomarkers of such process.

Introduction

Renal transplantation is currently the best therapeutic option for a significant portion of patients with end-stage renal disease (1). Overtime the better understanding of transplantation immunobiology, improvements in immunosuppressive therapy and general medical care contributed significantly to a progressive increase of the patients' and short-term graft's survival rates also allowing an impressive reduction of the incidence of acute rejection (2). However long-term survival remains largely unsatisfactory as demonstrated by the slowly increasing half-life of the renal grafts (3).

Most of the conditions that lead to late allograft failure are characterized at histology by the presence of fibrosis and atrophy that, in the absence of determined causes, are currently grouped under the interstitial fibrosis and tubular atrophy category (IF/TA) in the current Banff classification (4). Moreover a recent publication of the Banff working group it was suggested that the development of a genomics supported Banff classification could be relevant for refining pathological diagnosis and set the venue for the development of new biomarkers that could ultimately be applied to non-invasive samples or tissue specimens (5).

The present study was undertaken to test the hypothesis that, in patients with chronic disease of the kidney transplant, molecules related to the development of fibrosis would have increased mRNA expression in the graft tissue. Besides, we hypothesized that expression would correlate with the IF/TA categories of the Banff classification. In order to test these hypotheses we accessed, by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), mRNA transcripts

of genes encoding proteins related to the development of allograft fibrosis and correlated to the diagnostic category IF/TA of the current Banff classification.

Patients and Methods

Patients

Seventy-seven kidney transplant recipients who undertook an indication graft biopsy between January 2008 and December 2009 were included in the present study. Primary renal disorders leading to end stage renal failure were: hypertensive glomerulosclerosis in 26 patients (33.7%), diabetic nephropathy in 12 (14.6%), chronic glomerulonephritis in 11 (14.3%), obstructive uropathy and chronic pyelonephritis in 7 (9.1%), adult polycystic kidney disease in 6 (7.8%) and other causes or undetermined in 15 patients (19.5%).

In all patients immunosuppressive therapy was initiated before transplantation and consisted of corticosteroids, sodium mycophenolate and calcineurin inhibitors. Thirty five patients received induction therapy, twenty-nine with Basiliximab® and six with Thymoglobulin®. Immunosuppressive therapy was kept throughout the course of the transplant and adjusted overtime according to protocol, blood levels, occurrence of acute rejection, drug toxicities, infections and other side effects.

Graft dysfunction was investigated for vascular, urological, drug toxicity or infectious causes by doppler ultrasound, nuclear scans, calcineurin inhibitors blood levels and urine cultures before the biopsies were performed. At the biopsies two core fragments were obtained under ultrasound guidance, using a 16G semi-automatic biopsy gun. One and a half fragments were used for

histological analyses and half a fragment was immediately frozen in liquid nitrogen and maintained at -70°C for later RNA extraction. Slide evaluation was performed by a kidney transplant pathologist unaware of the clinical data. The Banff-2007 classification was used for the histopathological diagnoses (5). The final diagnosis for each biopsy situation was established by evaluation of the pathological criteria, clinical course, response to treatments and clinical outcomes. Patients and biopsies were then classified into four major diagnostic groups: (a) acute tubular necrosis (ATN; n= 9), acute rejection (AR; n= 49), acute calcineurin inhibitor nephrotoxicity (CIN; n=10) and interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA; n=29). A group of six renal transplant recipients who had protocol biopsies interpreted as normal were used as a calibrator for the molecular analyzes.

All patients agreed to participate in the study that was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, which is accredited by the National Research Council of the Brazilian Ministry of Health and registered at the Office for Human Research Protection- OHRP-USDHHS (Institutional Review Board - IRB 00000921).

Methods

RNA Extraction and cDNA transcription

Graft fragments were defrosted, macerated and processed for RNA extraction, using the QIAamp® RNA Blood mini kit (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Total RNA quantification were made using the Nano'drop® 1000 Spectrophotometer v.3.7 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE, USA) and RNA purity was

observed as ratio of absorbances at the wave lengths 260/280 nM. 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 20 μ L and stored at -20°C.

Gene expression analyses

Real time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed by using the TaqMan Universal PCR Master Mix, composed by AmpliTaq Gold® DNA polymerase, Amperase UNG, passive reference (ROX), buffer and dNTP's (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and specific primers for mRNA amplification of the following genes, (all provided by Applied Biosystems USA): KIM-1 (kidney injury molecule-1, HAVCR1 (ID: Hs00273334_m1); TGF- β (transforming growth factor-beta, ID: Hs00998133_m1*) and CTGF (connective tissue growth factor, ID: Hs00170014_m1*), according to the manufacturer's instructions. 18s rRNA (TaqMan® PDAR) was used as an endogenous control for sample normalization. FAM (6- carboxyfluorescein) and VIC dye-labeled TaqMan minor groove binder (MGB) probes sets were used respectively for KIM-1, TGF- β , CTGF and 18s rRNA, as fluorescent reporter dyes and conjugated at 5' ends of probes to detect amplification products. The amount of FAM or VIC fluorescence en each reaction liberated by the exonuclease degradation of the TaqMan probe during PCR amplification was measured as a function of PCR cycle using ABI 7000 Prism (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Real time polymerase chain reaction was carried out in duplicates in 96-well plates on 2 μ L of cDNA. Thermal cycling conditions were 50°C for 2

minutes, 60°C for 30 minutes followed by heating to 95°C for 5 minutes and 40 cycles using the temperatures of 94°C for 20 seconds and 62°C for 60 seconds. Data were collected by using the ABI PRISM 7000 SDS analytical thermal cycler (Applied Biosystems). The relative quantification of target gene expression was performed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ comparative method. Where CT (threshold cycle) value is defined as the point where a statistically significant increase in the fluorescence has occurred.

Statistical analyses

Data are presented as descriptive analyses, means \pm standard deviations, medians and percentiles (P25-75) values. Fisher's exact tests and residual analysis were used to test associations between categorical variables. Multiple comparisons were made by Tukey's HSD (honestly significant difference) test, and nonparametric data was analyzed by Kruskal-Wallis test to compare respectively means and medians between groups. The correlations between the mRNA levels of expression of CTGF, TGF- β and KIM-1 in the biopsies were calculated using the Spearman's correlation test. The box-plot representation graphics show the medians and percentile values 25–75 of the relative quantification of gene expression. Receiver operating characteristics (ROC) curves were constructed to evaluate diagnostic parameters of IF/TA and to calculate the cut-off values. 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

Patients and transplant demographics are presented in the Table 1. No significant difference was observed among groups in the parameters of age, gender, ethnicity, mean number of HLA mismatches, last panel reactive antibody (PRA) and use of antibody induction therapy. Forty-nine (64%) patients received grafts from deceased donors. Residual analysis showed that the ATN group had a significantly higher number of deceased donor organ recipients compared to the other groups ($P < 0.05$). Also a significantly higher serum creatinine, at the day of the biopsy, was observed in the ATN group as compared to the patients classified in the CIN and IF/TA groups ($P < 0.05$). The group with AR also presented higher serum creatinine as compared to the CIN group ($P < 0.05$). Cold ischemia time was significantly higher in the ATN group as compared to the CIN group ($P < 0.05$). Time interval between the transplant surgery and graft biopsy was higher in the IF/TA group as compared to other groups ($P < 0.05$). Finally there was no significant difference in last PRA, either class I or II, among groups.

Here Table 1

Table 2 depicts the medians and percentiles (25-75) of the quantified mRNA in the four diagnostic groups. Messenger RNA levels were higher in IF/TA group for all the genes evaluated. Statistically significant differences were observed for the CTGF and TGF- β mRNA expression levels between the groups IF/TA and AR and IF/TA and CIN. For the KIM-1 gene a significant difference was present between groups IF/TA and CIN and AR and CIN. These data is also presented in Figure 1 as box-plot representations of the logarithmic transformed data of the normalized mRNA for each group. In addition it was

observed that the expression of CTGF, TGF- β and KIM-1 increases, although not significantly, with the intensity of fibrosis observed in the pathological examinations. Table 3 displays the median values of mRNA expression levels for each IF/TA score of the Banff classification.

Here Table 2

Here Figure 1

Here Table 3

In figure 2 it is demonstrated the correlations between each pair of genes. An elevated correlation between mRNA levels of expression was found. All correlations, CTGF and TGF- β ($r = 0.871$), KIM-1 and CTGF ($r = 0.725$) and KIM-1 and TGF- β ($r = 0.720$) were statistically significant ($P < 0.01$).

Here Figure 2

Receiver operating characteristic curves were generated in order to find the cut-off points for the analysis of the diagnostic parameters of IF/TA and are shown in Figure 3 along with the diagnostic parameters and the area under the curve (AUC) values. The observed accuracy of the AUCs was very similar for the CTGF, TGF- β and KIM-1 genes. The combined analyzes for pairs of genes lead to an increment in sensitivity to 89% (TGF- β and KIM-1) and the best

accuracy was obtained with the combined analysis of TGF- β and CTGF (72%). The combined analysis of the three genes did not improve the diagnostic parameters.

Here Figure 3

Discussion

Fibrosis of the renal tissue is the final phenotypic manifestation of chronic renal diseases, including grafted organs, and ultimately originates from an excessive accumulation of components from the extra cellular matrix (ECM) (6). During the fibrosis process fibroblasts migrate to the damaged tissue, where they produce and remodel the ECM resulting in healing and reconstitution of the connective tissue (7). In the present study we found an increased expression of the fibrosis related genes CTGF, TGF- β and KIM-1 in for cause kidney transplant biopsies classified as having IF/TA according to the Banff classification.

Connective tissue growth factor directly stimulates the adhesion of fibroblasts, a process that probably derives from the interaction of this molecule with the integrins. CTGF is a member of the CCN (ctgf/cyr61/nov) protein family, that act through the integrins and heparan proteoglycane sulphate, signaling the modulation of the functional activities of other extra cellular binders, such as cytokines, growth factors, morphogenes and extra cellular matrix components (8,9). In fibroblasts culture CTGF stimulates the production of several components of the extra cellular matrix (10). The relationship between the CTGF and TGF- β in the ECM synthesis has been demonstrate.

Both molecules induce collagen expression in mesangial cells but, only TGF- β stimulates it tubular epithelia. Nevertheless, the CTGF induces tenascin C expression, which is demonstrable in several types of renal tubular lesions and facilitates the process by which epithelial cells acquire the characteristics of mesenchymal/fibroblast cells, during renal fibrosis process (11). Besides, CTGF might exert its stimulating effect on TGF- β , promoting the fibrotic response of this molecule in the proximal tubule of human cells (9,12). Our findings are supportive of this interaction in kidney transplant recipients with graft fibrosis. Even though we did not perform mechanistic studies a very high correlation between these molecules mRNAs was found. CTGF has being previously studied in kidney transplant recipients by Cheng and collaborators who found elevated levels of CTGF in the urine (13). Their findings are in keeping with the CTGF results in the present study where we demonstrated increased mRNA expression in patients with IF/TA.

Transforming growth factor- β is a member of the TGF- β cytokine super family (14). It is present in endothelial cells, smooth muscle vascular cells, myofibroblasts, macrophages, cytoplasm of the tubular epithelial cells and in small interstitial areas (15,16), fulfilling repairing functions through collagen synthesis and angiogenesis. TGF- β is also involved in the pathogenesis of renal disease, since it stimulates the proliferation of mesangial cells, synthesis of the ECM components, inducing phenotypic changes of the epithelial cells in the renal tissue (17,18).

Under normal circumstances TGF- β 1 expression is down regulated once the healing process is completed. When this negative feed back does not occur an accumulation of the extra cellular matrix takes place leading to tissue fibrosis

(19,20). This is possibly an operative mechanism in the progressive scarring of renal grafts undergoing either chronic alloantigen mediated injury (chronic rejection) or chronic calcineurin inhibitor nephrotoxicity. In the present study we find increased TGF- β mRNA in the biopsies of patients with IF/TA. Previously Sharma and collaborators have reported a significant association between intragraft TGF-beta 1 mRNA expression and renal allograft interstitial fibrosis (21). Latter, Mas and collaborators found increased TGF- β mRNA levels in the urine of kidney transplant recipients as compared to normal controls suggesting a possible role of this molecule as a biomarker for chronic allograft nephropathy (22).

Kidney injury molecule – 1 is a recently described protein that probably has an important role in fibrosis processes (23). It is a type I transmembrane glycoprotein with domains constituted by immunoglobulin and by mucin in the extra cellular portion (24). The cytoplasmic domain is relatively short and has a potentially phosphorylated site, indicating that KIM-1 is perhaps involved in molecular signalling (25). KIM-1 is predominantly expressed in Th2 cells (26) and acts in the kidney as a phosphatidyl serine receptor responsible for the pick up of apoptotic cells and exosomes. In humans it has been demonstrated that apoptotic and necrotic cells of the tubular lumen were phagocytated by KIM-1 expressing epithelial cells which were located, predominantly, in the proximal apical membrane (27). KIM-1 upregulation has being demonstrated in the dedifferentiated tubular epithelium following injury by toxins as an early epithelial cell response (28, 29).

The above information lends support to the notion that by acting in the phagocytosis and reparation processes KIM-1 is also involved in the

development of fibrosis. In fact, a recent study with renal biopsies showed that KIM-1 was significantly expressed in the apical side of the dilated tubules and in fibrotic areas of the renal tissue (30). These authors found increased KIM mRNA expression in the grafts of patients with IF/TA as compared to other causes of renal dysfunction confirming our previous results (31). Interestingly and giving support to our data, urinary KIM-1 levels were found to be an independent predictor of late allograft loss in two recent studies (32, 33).

KIM-1 was initially proposed as a marker for acute tubular damage (34). Later it became evident that this molecule may signal other processes including fibrosis. It is perhaps surprising, in the present study, that this molecule was not over expressed in patients with acute tubular necrosis. This finding is probably explained by the timing of the surveillance biopsies in kidney grafts with delayed graft function. KIM-1 is an early marker for ATN and the biopsies in this subset of patients are typically done after one or two weeks following transplantation, a time when message for KIM-1 RNA is no longer present.

It is interesting to notice that mRNA expression of the molecules here evaluated presented, except for the CTGF gene in the IF/TA III category a stepwise increment of expression as the intensity of fibrosis increased. The small sample size in each category is perhaps the reason for the lack of statistical significance.

We believe that molecular tools, including RT-PCR and newer platforms such as DNA microarrays and microRNAs have a great potential to improve and sophisticate the pathological diagnoses. Besides, the evolution of these tools to properly validated non-invasive molecular tests will probably evolve into accurate biomarkers that could be used for diagnosis of clinical and sub-clinical

injuries, to prognosticate and to guide immunosuppressive therapy in organ transplant recipients.

References

1. Cecka JM. The OPTN/UNOS renal transplant registry. In: Cecka, J.M., Terasaki, P.I., editors. Clin Transplant. Los Angeles (Calif): UCLA tissue typing laboratory 2005; 1-16.
2. Ponticelli C. Acute rejection, in Medical Complications of Kidney Transplantation Ponticelli C, Editor. Informa healthcare; United Kingdom, 2007.
3. Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche HU. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. Am J Transplant 2011; 11(3):450-62.
4. Klein J, Miravete M, Buffin-Meyer B, Schanstra JP, Bascands JL. Tubulo-interstitial fibrosis: an emerging major health problem. Med Sci. 2011; 27(1):55-
5. Soleza K, Colvin RB, Racusen LC et al. Banff 07 Classification of Renal Allograft Pathology: Updates and Future Directions. Am J Transplant 2008; 8(4): 753–760.
6. Cho MH. Renal fibrosis. Korean J Pediatr 2010; 53(7):735-740.
7. Kapoor M, Liu S, Huh K et al. Connective tissue growth factor promoter activity in normal and wounded skin. Fibrogenesis Tissue Repair 2008; 13:1(1):3.
8. Sánchez-López E, Rodrigues Díez R, Rodríguez Vita J et al. [Connective tissue growth factor (CTGF): a key factor in the onset and progression of kidney damage]. Nefrología 2009; 29(5):382-391.
9. Leask A, Parapuram SK, Shi-wen et al. Connective tissue growth factor (CTGF, CCN2) gene regulation: a potent clinical bio-marker of fibroproliferative disease? J. Cell Commun. Signal. 2009; 3(2):89–94.
10. Moussad EE, Brigstock DR. Connective Tissue Growth Factor: What's in a Name? Molecular Genetics and Metabolism 2000; 71(1-2): 276–292.

11. Gore-Hyer E, Shegogue D, Markiewicz M et al. TGF- β and CTGF have overlapping and distinct fibrogenic effects on human renal cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283(4): F707-16.
12. Qi W, Chen X, Twigg S et al. The differential regulation of Smad7 in kidney tubule cells by connective tissue growth factor and transforming growth factor-beta1. *Nephrology* 2007; 12(3):267–274.
13. 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(10):2292-306.
14. Aihara K, Ikeda Y, Yagi S et al. Transforming Growth Factor- β 1 as a Common Target Molecule for Development of Cardiovascular Diseases, Renal Insufficiency and Metabolic Syndrome. *Cardiol Res Pract.* 2010; 2011:175381.
15. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. “Making sense of latent TGF- β activation”. *J Cell Sci.* 2003; 116(Pt 2):217-24.
16. Yokoi H, Mukoyama M, Sugawara A et al. Role Of Connective Tissue Growth Factor In Fibronectin Expression And Tubulointerstitial Fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282(5): F933- 42.
17. Surazynski A, Miltyk W, Prokop I et al. Prolidase-dependent regulation of TGF α and TGF β receptor expressions in human skin fibroblasts. *Eur J Pharmacol.* 2010; 649(1-3):115-9.
18. Fukuda N, Tahira Y, Matsuda H et al. Transforming growth factor- β as a treatment target in renal diseases. *J Nephrol* 2009; 22 (6):708- 715.
19. Lawrence DA. Transforming growth factor- beta: an overview. *Kidney Int Suppl.* 1995; 49:S19-23.

20. Basile DP. The transforming growth factor beta system in kidney disease and repair: recent progress and future directions. *Curr Opin Nephrol Hypert* 1999; 8(1):21-30.
21. Sharma VK, Bologa RM, Xu GP et al. Intragraft TGF-beta 1 mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 1996; 49(5):1297– 303.
22. 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(4):448-57.
23. 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(2): 209-17.
24. 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(7):4135-42.
25. Bailly V, Zhang Z, Meier W et al. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem* 2002; 277(42): 39739–48.
26. Degauque N, Mariat C, Kenny J et al. Regulation of T-cell immunity by T-cell immunoglobulin and mucin domain proteins. *Transplantation*. 2007; 84(1 Suppl): S12-16.
27. Ichimura T, Asseldonk EJ, Humphreys BD et al. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest* 2008;118(5):1657-68.

28. Ichimura T, Hung CC, Yang SA et al. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(3): 552–563.
29. Zhou Y, Vaidya VS, Brown RP et al. Comparison of kidney injury molecule-1 and other nephrotoxicity biomarkers in urine and kidney following acute exposure to gentamicin, mercury, and chromium. *Toxicol Sci* 2008; 101(1):159–170.
30. Huo W, Liu R, Zhang K et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel kidney specific injury molecule playing potential double-edged functions in kidney injury. *Transplant Rev* 2010; 24(3):143-6.
31. Nogare AL, Joelsons G, Pedroso JAR et al. Quantitative analyses of kidney injury molecule-1 messenger RNA in kidney transplant recipients with graft dysfunction. *Transplant Proc* 2010; 42:473-474.
32. 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(12):1625-30.
33. Nauta FL, Bakker SJ, van Oeveren W et al. Albuminuria, proteinuria, and novel urine biomarkers as predictors of long-term allograft outcomes in kidney transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 2011; 57(5):733-43
34. 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(1): 237–244.

Table 1: Demographics and transplant data.

	ATN	AR	CIN	IF/TA	P
Pathologic diagnosis	(9)	(49)	(10)	(29)	
Age (mean ± SD)	44±14	40±14	42±11	41±11	0.848
Gender (male/female)	6/3	34/15	7/3	14/15	0.289
Ethnicity (caucasian/non-caucasian)	8/1	45/4	9/1	26/3	0.951
HLA mismatches (A,B,DR; mean ± SD)	3.0±1.2	3.2±0.9	2.7±0.6	3.40±1.1	0.641
Induction (Basiliximab/Thymoglobulin)	3/2	12/3	3/0	11/1	0.414
Donor (deceased/living)	9/0	30/19	3/7	20/9	<0.05 ^a
Serum creatinine (mg/dL; mean ± SD)	6.4±1.9	4.5±2.3	2.0±0.71	3.5±1.6	<0.05 ^b
Cold ischemia time (hr; mean ± SD)	23.6±5.7	16.4±6.1	13.3±9.6	16.7±7.1	<0.05 ^c
Time to biopsy (days; median (25-75))	17(11-62)	14(9-48)	39(18-198)	672(242-1752)	<0.05 ^d
Last PRA (%; mean ± SD):					
Class I	5.4±16.3	3.6±17.0	1.5±4.7	12.2±25.1	0.227
Class II ¹	25.3±38.8	3.3±12.8	0	19.4±30.7	0.018

ATN = acute tubular necrosis; AR = acute rejection; CIN = calcineurin inhibitor nephrotoxicity;

IF/TA = interstitial fibrosis and tubular atrophy. ^aResidual analysis for ATN (deceased donor > living donor)

^{b, c} Tukey HSD (ATN > CIN and IF/TA) and ^c (ATN > CIN); ^d Kruskal Wallis (IF/TA > all other group);

¹ Hypothesis test summary by Kruskal Wallis revealed a statistically significant difference (P <0.05). Pairwise comparisons did not reveal significant differences.

Table 2: Median and percentiles values (P25 – P75) of CTGF, TGF- β and KIM-1 mRNA expression levels in kidney biopsies in the different histopathologic diagnostic groups.

Group	CTGF	TGF-β	KIM-1
ATN	4.29 (1.34-24.39)*	6.28 (2.51-30.52)*	5.90 (0-23.51)*
AR	4.17 (0.87-21.43) ^a	5.46 (2.07-16.01) ^b	4.79 (0.92-34.07) ^c
CIN	2.63 (1.35-8.58) ^d	1.48 (0.37-2.50) ^e	0.09 (0-0.58) ^f
IF/TA	67.65 (6.24-375.40) ^g	51.27 (8.65-219.34) ^h	26.17 (3.38-294.53) ⁱ

ATN = acute tubular necrosis; AR = acute rejection; CIN = calcineurin inhibitor nephrotoxicity; IF/TA = interstitial fibrosis and tubular atrophy.

Kruskal Wallis analysis was used for the comparisons of medians between groups.

* None of the other comparisons presented statistically significant differences.

P<0.01: g > a; h > b; h > e; i > f

P<0.05: g > d; c > f

Table 3. Median and percentiles values (P25-P75) of CTGF, TGF- β and KIM-1 mRNA expression levels in kidney biopsies in three different grades of severity of IF/TA according the Banff classification.

Grade (P value)	CTGF (0.346)	TGF-β (0.058)	KIM-1 (0.410)
IF/TA I ^a	7.01 (0.45-1.555)	15.03 (1.41-31.89)	7.57 (0.33-184.94)
IF/TA II ^b	112.16 (61.0-356.59)	77.35 (51.18-310.98)	29.08 (11.33-930.83)
IF/TA III ^c	49.16 (5.75-896.19)	83.35 (5.40-861.70)	57.65 (3.70-279.78)

IF/TA = interstitial fibrosis and tubular atrophy

^a Mild interstitial fibrosis and tubular atrophy;

^b Moderate interstitial fibrosis and tubular atrophy;

^c Severe interstitial fibrosis and tubular atrophy/loss.

Figure 1

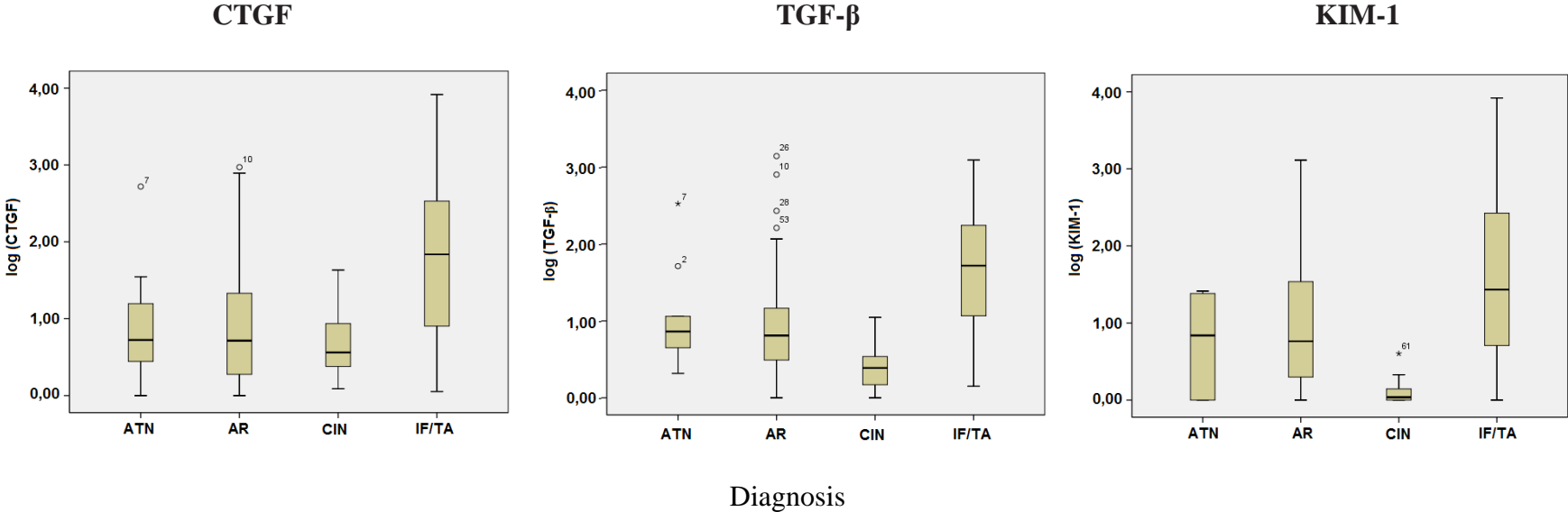


Figure 2

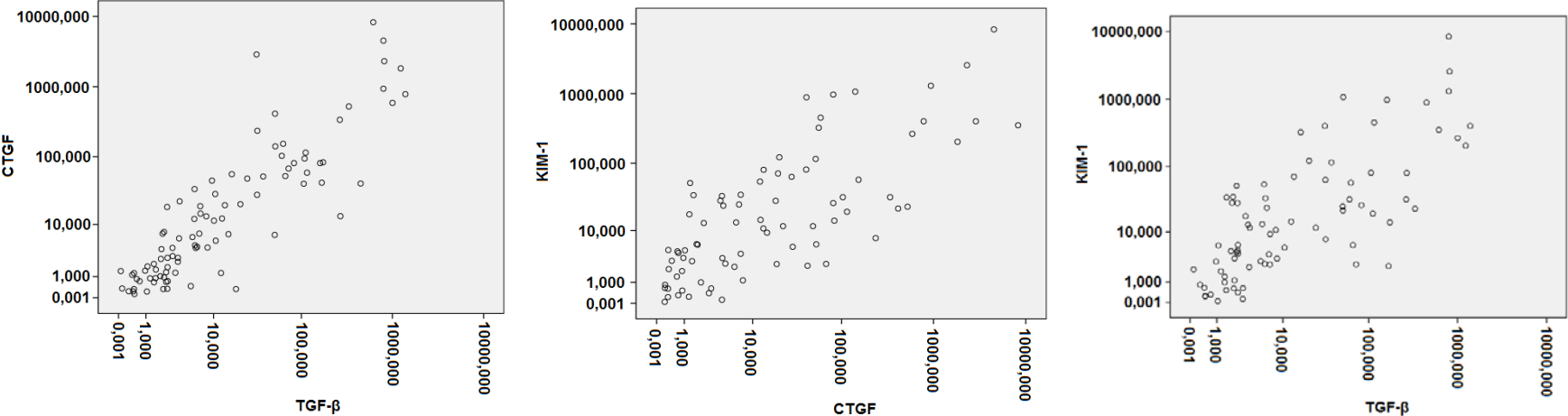
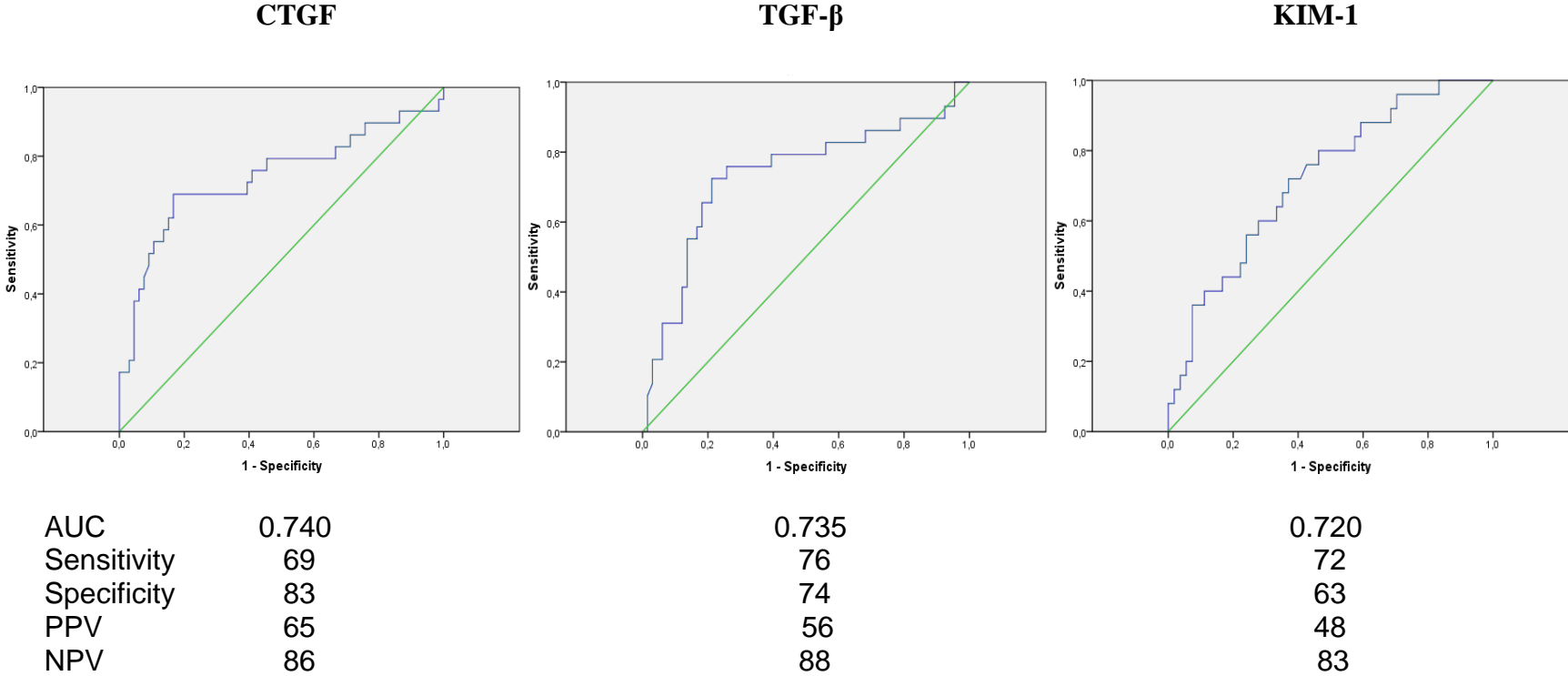


Figure 3



Legends to the figures.

Figure 1. The box-plot representation graphics showing the logarithmic transformed medians and P25–P75 values of the quantification levels of normalized mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$). CTGF, TGF- β , KIM-1 mRNA expression levels in kidney tissue in the diagnostic groups ATN, AR, CIN and IF/TA are presented. For the CTGF and TGF- β genes mRNA levels were significantly higher in IF/TA as compared with CIN and AR. For the KIM-1 gene levels in IF/TA group were higher than the CIN group. Statistical values are shown in Table 2. ATN = acute tubular necrosis; AR = acute rejection; CIN = calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity; IFTA = interstitial fibrosis and tubular atrophy.

Figure 2. Spearman's correlation between the mRNA levels of expression of CTGF, TGF-B and KIM-1 genes in kidney allograft biopsies. An elevated correlation between genes are observed. Correlation coefficients in the order they are presented in the figure are 0.871, 0.725 and 0.720. The significance levels are $P < 0.01$ for all correlations.

Figure 3. Receiver operating characteristic curves for gene expression to the diagnosis of IF/TA of kidney allograft biopsies. AUC = area under the curve; PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value. Values for the diagnostic parameters are shown in percentages.

**5.2 “Non invasive analyses of kidney injury molecule-1
messenger RNA in kidney transplant recipients with
graft dysfunction.”**

Formatado para submissão à revista *Transplantation Proceedings*

Non invasive analyses of kidney injury molecule-1 messenger RNA in kidney transplant recipients with graft dysfunction.

¹Aline L. Nogare (anogare@hcpa.ufrgs.br), ¹Tiago Dalpiaz (tdalpiaz@hcpa.ufrgs.br), ^{1,2}Francisco J.V. Veronese (fveronese@hcpa.ufrgs.br), ^{1,2}Luis F. Gonçalves (lfgoncalves@hcpa.ufrgs.br) and ^{1,2,3}Roberto C. Manfro*, rmanfro@hcpa.ufrgs.br

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*

Tables and figures: 1 black-and-white figure

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

Funding sources: This work was funded by the Brazilian Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Authors have no conflicts of interest to disclose.

Abstract

Non invasive analyses of kidney injury molecule-1 messenger RNA in kidney transplant recipients with graft dysfunction.

Background: Kidney graft fibrosis is a major factor related to chronic loss of kidney function. At present, the finding of fibrosis depends on the analysis of tissue in the renal biopsy which has important limitations. In this study we evaluated the mRNA transcription and gene expression of KIM-1 in kidney tissue and in urinary sediment cells of kidney transplant patients with graft dysfunction aiming at the development of techniques that may allow the noninvasive diagnosis of IF/TA.

Patients and methods: RNA extracted from cells in tissue and urine of 77 renal transplant patients whose biopsies were classified according to the Banff scheme-2007. Four diagnostic groups were established: (1) acute tubular necrosis (ATN; n=9); (2) acute rejection (AR, n = 49); (3) acute calcineurin inhibitors nephrotoxicity (CIN, n = 10); and (4) interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA, n= 29). Tissue and urine cell RNA was amplified and quantification were made by real-time PCR. Data from the quantification of gene expression are presented as median and percentiles 25 to 75.

Results: Messenger RNA levels of the KIM-1 gene were higher in the biopsies (26.17; 3.38-294.53) and urinary sediment cells (0.09; 0-5.81) of the patients classified as having IF/TA as compared with all others groups. A significant correlation between gene expression in samples of urine and tissue cells was found ($P < 0.01$).

Conclusion: These initial data suggests that KIM-1 gene mRNA quantification can be used as a noninvasive biomarker of IF/TA.

Introduction

Kidney fibrosis is a major factor related to chronic graft loss. Currently the diagnosis of interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA) depends on the analysis of graft biopsies (1). The development of non-invasive biomarkers would be important for better graft monitoring. Kidney injury molecule -1 (KIM-1) is a protein present in toxic and ischemic acute renal injury and in chronic kidney diseases (2-4). In this study we evaluated the mRNA transcription and gene expression of KIM-1. in kidney tissue and in urinary sediment cells (USC) of kidney transplant patients with graft dysfunction.

Patients and methods

Seventy-seven kidney transplant recipients who undertook an indication graft biopsy between January 2008 and December 2009 were included. At each biopsy one-third of a core was immediately frozen in liquid nitrogen for later molecular analyses. Urine samples were obtained immediately before biopsy, USC were isolated and frozen until RNA extraction. Pathologic analyzes were performed according to the Banff 2007 classification (1). The biopsies were classified in 4 diagnostic groups: (1) acute tubular necrosis (ATN, n = 9); (2) acute rejection (AR, n = 49); (3) acute calcineurin inhibitors nephrotoxicity (CIN, n = 10); and (4) interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA, n= 29). Tissue and USC RNA was extracted, reversed transcribed and amplified by real-time polymerase chain reaction polymerase (TaqMan, ABI-PRISM 7000 SDS, Applied Biosystems) using specific primers (HAVCR-1, Applied Biosystems) for the KIM-1 gene and 18s rRNA as an endogenous control. The analysis of the amplified products were performed by the relative quantification method $2^{-\Delta\Delta CT}$. Data are presented as means \pm standard deviations and medians and

percentiles (P25-75) values. Multiple comparisons were made by Tukey's test, and nonparametric data was analyzed by Kruskal-Wallis test. P levels lower than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Patients were predominantly males (79%), caucasians (87%) and 78% received grafts from deceased donors. A significantly higher serum creatinine, at the day of the biopsy, was observed in the ATN group (6.4 ± 1.9 mg/dL) as compared to the patients classified in the CIN (2.0 ± 0.71 mg/dL) and IF/TA groups (3.5 ± 1.6 mg/dL) ($P < 0.05$). The group with AR (4.5 ± 2.3 mg/dL) also presented higher serum creatinine as compared to the CIN group ($P < 0.05$). Cold ischemia time was significantly higher in the ATN group (23.6 ± 5.7 hours) as compared to the CIN group (13.3 ± 9.6 hours) ($P < 0.05$). Time interval between the transplant surgery and graft biopsy was higher in the IF/TA group (672; 242-1752 days) as compared to other groups ($P < 0.05$).

Figure 1 shows KIM-1 mRNA quantifications from tissue and UCS. KIM-1 mRNA levels were higher in the biopsies with IF/TA (26.17; 3.38-294.53) as compared with all other groups ($P < 0.01$). Also the AR (4.79; 0.92-34.07) had a higher expression than the CIN group (0.09; 0-0.58) ($P < 0.05$). Likewise KIM-1 mRNA levels were higher in the UCS of IF/TA biopsies (0.09; 0-5.81) as compared with ATN (0; 0-0.52), AR (0; 0-2.0) and CIN (0-0; $P < 0.05$). In addition, a significant correlation between gene expression USC and biopsies was found ($P < 0.01$).

Discussion

KIM-1 is a type I transmembrane glycoprotein with immunoglobulin and by mucin domains the extra-cellular portion. The cytoplasmic domain is

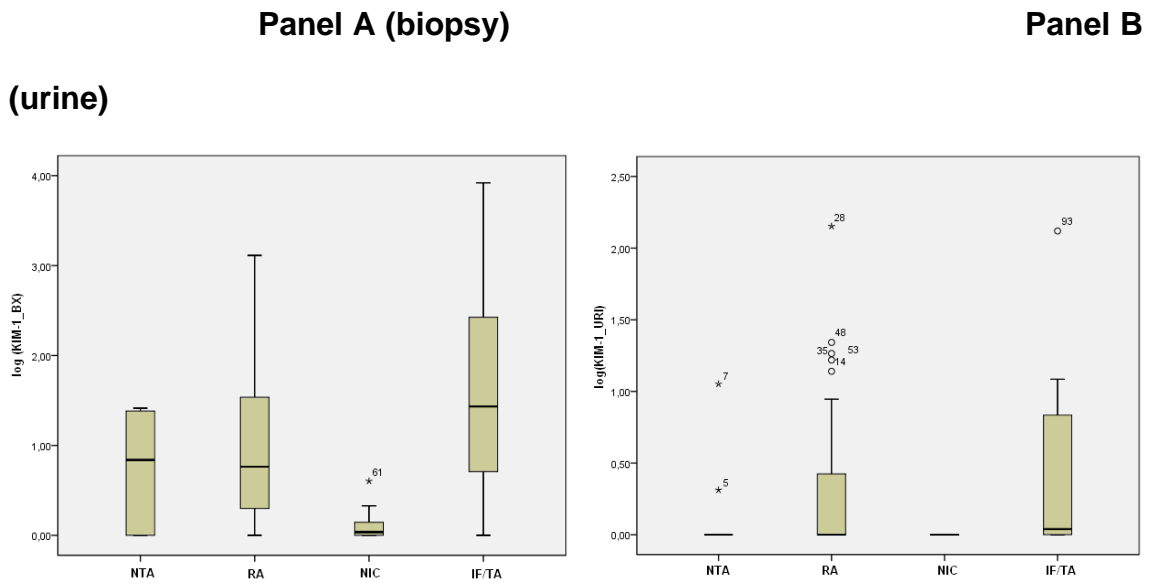
relatively short and has a potentially phosphorylated site, indicating that KIM-1 is perhaps involved in molecular signalling. The ectodomain is cleaved by a metalloproteinase and released in urine (5,6). KIM-1 expression in dedifferentiated tubular epithelium suggests that this protein is involved in the processes of tubular fibrosis and that may also play a role as a biomarker for proliferation in regenerative mechanisms (7). We have previously shown increased KIM-1 mRNA transcription in biopsies of kidney transplant recipients with IF/TA and chronic calcineurin inhibitor nephrotoxicity. In this study we confirmed our previous findings in another cohort and expanded by showing it is also significantly increased in UCS (8). These data suggests that USC KIM-1 mRNA quantification may be used as a non-invasive biomarker of fibrosis in kidney grafts with IF/TA.

References

1. Soleza K, Colvin RB, Racusen LC et al. Banff 07 Classification of Renal Allograft Pathology: Updates and Future Directions. *Am J Transplant* 2008; 8: 753–760.
2. 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; 273:4135-4.
3. 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: 517-29.
4. Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 3265-8.

5. 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: 237–244.
6. Bailly V, Zhang Z, Meier W et al. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem* 2002; 277:39739–48.
7. Humes HD, Liu S. Cellular and molecular basis of renal repair in acute renal failure. *J Lab Clin Med* 1994; 124: 749-754.
8. Nogare AL, Joelsons G, Pedroso JAR et al. Quantitative analyses of kidney injury molecule-1 messenger RNA in kidney transplant recipients with graft dysfunction. *Transplant Proc* 2010; 42:473-474.

Figure 1.



Legend to Figure 1.

The box-plot representation graphics showing the logarithmic transformed medians and P25–P75 values if the quantification levels of normalized mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$). KIM-1 mRNA expression levels in kidney tissue and in urinary sediment cells in the diagnostic groups ATN, AR, CIN and IF/TA are presented. KIM-1 gene mRNA levels were significantly higher in IF/TA as compared with CIN ($P < 0.01$; panel A) and ($P < 0.05$; panel B). ATN = acute tubular necrosis; AR = acute rejection; CIN = calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity; IFTA = interstitial fibrosis and tubular atrophy.

Capítulo 6. Considerações finais

Os achados do presente estudo permitem as seguintes considerações finais:

1. Os resultados revelam expressão aumentada do mRNA dos genes CTGF, TGF- β e KIM-1 nos processos de IF/TA quando comparada aos demais grupos de biópsias de pacientes com disfunção do enxerto renal. Esses achados apresentam plausibilidade biológica em relação aos mecanismos de ação das proteínas codificadas por estes genes nos processos de fibrose tecidual. Os dados do presente trabalho mostram elevada correlação entre na expressão dos três genes nas amostras de biópsias, indicando que essas moléculas são igualmente fortes candidatas a biomarcadores das lesões fibróticas de aloenxertos renais;

2. As evidências de que a avaliação da expressão do mRNA de CTGF, TGF- β e KIM-1, por RT-PCR, sejam marcadores acurados no diagnóstico da fibrose, foram obtidas pela análise das respectivas AUCs. Além disso, demonstramos que a expressão gênica se intensifica a medida em que o grau de fibrose observado na biópsia aumenta. Atribuímos à falta de significância estatística desse último achado à falta de poder estatístico da amostragem;

3. Na área da genômica funcional a introdução da reação em cadeia da polimerase (PCR) após a transcrição reversa do RNA por ação da enzima transcriptase reversa, permitiu o descobrimento de perfis transcriptômicos de várias doenças e vem ganhando espaço nos laboratórios clínicos e de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos. O uso dessa e de outras ferramentas da biologia molecular, associada aos critérios

morfológicos e clínico-laboratoriais convencionais, deverá permitir diagnósticos mais precisos e um entendimento mais aprofundado da fisiopatologia da doença renal crônica do enxerto renal.

4. A precocidade no diagnóstico, acompanhada de alta sensibilidade e especificidade, é certamente uma das maiores vantagens da utilização da reação em cadeia da polimerase em tempo real no diagnóstico da doença renal, pois ao prever a formação da proteína, pela expressão gênica, a qual irá manifestar e desencadear fibrose intersticial e atrofia tubular, poderemos intervir e direcionar um tratamento mais correto ao paciente, de modo que este não venha a manifestar esse processo patológico. Curvas ROC mostraram boa sensibilidade e especificidade em relação à quantificação da expressão dos genes estudados por RT-PCR .

5. Cabe ao patologista classificar, graduar e avaliar as alterações histopatológicas nas lesões de biópsias de transplantados renais, atualmente baseado na classificação Banff 2007, que é o padrão-ouro para o diagnóstico das afecções dos transplantes renais. No entanto, o uso de ferramentas moleculares pode revelar processos de agressão aos enxertos ainda não detectáveis pelos métodos histopatológicos. Desta forma tais ferramentas deverão se incorporar aos procedimentos diagnósticos na avaliação dos transplantes renais.

Anexos

Banco de Dados

Identificação:

Nome:
Amostra:
Prontuário:

Dados do receptor:

Idade:
Sexo:
Raça (branco/ não branco):
Doença básica: () Diabetes mellitus () Hipertensão arterial sistêmica
() Doença policística () Pielonefrite crônica () Uropatia obstrutiva
() Nefrite hereditária

Citomegalovírus receptor: IgG: _____ IgM: _____

Tipagem HLA:

A(____,____); B(____,____); DR(____,____)

Órgão recebido de doador:

Vivo: Idêntico (); 1 Haplo (); Distinto (); Não relacionado ()

Falecido: número de incompatibilidades: _____

Hepatite B () Hepatite C ()

Nº de gestações:

Nº de transfusões sanguíneas:

Nº de transplantes prévios:

Painel pico: Linfócitos T _____; Linfócitos B _____

Painel atual: Linfócitos T _____; Linfócitos B _____

Dados do doador:

Nome:

Idade:

Sexo:

Doador: () Vivo () Falecido

Causa da morte (se doador falecido): () AVC isquêmico () AVC hemorrágico
() Trauma () Tumor SNC () Outros

Co-morbidades:

() Hipertensão arterial sistêmica; () Diabetes mellitus; () Outra, qual:____

Creatinina do doador:

Basal:

Na retirada:

Tipagem HLA:

A(____;____); B(____;____); DR(____;____)

Citomegalovírus doador: IgG: _____ IgM: _____

Doador de critérios expandidos (sim/não):_____

Dados da cirurgia e do transplante:

Data do transplante:

Tempo de isquemia fria (horas:minutos):

Tempo de anastomose (minutos):

Imunossupressão:

() ATG; () Basiliximab; () Prednisona; () Micofenolato; () Tacrolimus
() Ciclosporina; () Sirolimus; () Everolimus; () Azatioprina

Dados da biópsia:

Data:

Tempo pós-transplante na biópsia:

Creatinina na biópsia:

Uréia na biópsia:

Nível sérico de IC na biópsia: ___ () Ciclosporina; ___ () Tacrolimus

Diagnóstico anatomopatológico (AP) na biópsia:

() Necrose tubular aguda; () Rejeição aguda; () Nefrotoxicidade aguda por inibidores de calcineurina; () Fibrose intersticial e atrofia tubular; () Normal

Biópsia em DGF (Sim/Não):

Diagnóstico pós revisão AP+clínica :

() Necrose tubular aguda; () Rejeição aguda; () Nefrotoxicidade aguda por inibidores de calcineurina; () Fibrose intersticial e atrofia tubular; () Normal

Dados das análises moleculares:

Índice 260/280 nM tecido renal:

Índice 260/280 nM urina:

Quantificação KIM-1 tecido renal:

Quantificação TGF- β tecido renal:

Quantificação CTGF tecido renal: