



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Estudo do perfil imunológico de transplantados renais – abordagem molecular a potenciais marcadores de disfunção crónica do enxerto

Dissertação apresentada à Universidade de  
Coimbra para cumprimento dos requisitos  
necessários à obtenção do grau de Mestre em  
Bioquímica, realizada sob a orientação científica  
do Professor Doutor Rui Manuel Baptista Alves  
(Universidade de Coimbra) e da Professora  
Doutora Paula Vasconcelos Morais (Universidade  
de Coimbra)

Diana Cristina Pais Carvalho

2012

“Ele tem os olhos da mãe, o sorriso do pai e . . . um rim transplantado”

## **Agradecimentos**

Agradeço à Dra. Maria Luísa Pais, directora do Centro de Histocompatibilidade do Centro (CHC), por ter consentido a realização do meu estágio, tornando possível a realização do trabalho laboratorial do qual resultou esta tese.

Agradeço ao Professor Doutor Rui Alves e ao Dr. António Martinho por me terem dado esta oportunidade e aceitarem fazer a orientação científica, pedagógica e análise crítica de todo o trabalho. O meu sincero agradecimento por todo o apoio, disponibilidade e compreensão.

Agradeço à Professora Doutora Paula Morais por ter aceitado ser minha orientadora interna e por toda a disponibilidade.

Agradeço a boa vontade de todos os doentes transplantados renais que simpaticamente aceitaram, com o devido consentimento informado, participar neste estudo. E a todos os funcionários da sala de colheitas dos antigos HUC e da Unidade de Transplantação Renal, que auxiliaram e possibilitaram a recolha das amostras de todos os participantes neste trabalho.

A todos os técnicos dos laboratórios de Genética Molecular, Genómica Funcional, Serologia e Citometria de fluxo do CHC, aqui fica o meu muito obrigado. Agradeço à Olívia Simões por todos os seus conselhos, pela sua disponibilidade, pelo seu apoio e sentido de humor. À Ana Sofia pela sua motivação, conselhos e apoio. Ao José Manuel, João, Rodrigo, Isabel Velada, Rosário Mateus obrigado pela ajuda.

Agradeço à Ana Cristina Henriques, à Joana Neves, à Letícia Costa, à Mariline Gameiro e à Sílvia Andrade por todos estes anos de faculdade que passámos juntas, nos quais partilhámos alegrias, tristezas, preocupações e muitas gargalhadas. Muito obrigado por tudo! E Ana Cristina Henriques, o “nosso gabinete” será um marco nas nossas vidas e obrigado por teres estado sempre ao meu lado!

Agradeço às minhas colegas de casa, Joana Ferreira e Sara Raposo, pois sem todos os bons momentos que partilhámos no nº 53, teria sido tudo muito mais complicado e a minha passagem pela cidade dos estudantes, Coimbra, não tinha sido a mesma coisa.

Agradeço aos meus avós e tios por todo apoio e compreensão.

Agora, chegou a hora de agradecer às pessoas mais importantes da minha vida, os meus pais e a minha irmã, sem menosprezar ninguém, é claro. Aos meus pais, agradeço por terem acreditado em mim, por me terem ajudado a realizar este sonho e por me incentivarem a nunca desistir. Muito obrigado por todo o apoio, carinho, ternura, compreensão e dedicação infindáveis, e é graças a vocês que tudo isto foi possível! À minha irmã, pois sem ti e sem a tua boa disposição, eu não tinha chegado, onde cheguei!

E, como nunca se torna demasiado agradecer, aqui fica, mais uma vez, o meu MUITO OBRIGADO, a todos!

## Índice geral

	<b>Página</b>
<b>Agradecimentos</b>	<b>ii</b>
<b>Índice geral</b>	<b>iv</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de Tabelas</b>	<b>viii</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>x</b>
<b>Resumo</b>	<b>xiv</b>
<b>Abstract</b>	<b>xv</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>
	<b>1</b>
1.1. Transplantação	2
1.1.1. Tipos de Transplante	3
1.2. Rejeição do enxerto	6
1.2.1. Papel das células T na rejeição	7
1.2.2. Rejeição hiperaguda	12
1.2.3. Rejeição aguda	12
1.2.3.1. Rejeição aguda celular (mediada por linfócitos)	12
1.2.3.2. Rejeição aguda humoral (mediada por anticorpos)	13
1.2.4. Rejeição/ Disfunção crónica	14
1.3. Tolerância	15
1.3.1. Delecção	15
1.3.2. Anergia	16
1.3.3. Regulação (Células T reguladoras)	16
1.3.4. Acomodação	19
1.3.5. Células B	19
1.4. Imunossupressão	20
1.4.1. Modelo dos 3 sinais da resposta aloimune	20
1.4.2. Classificação dos fármacos imunossupressores	21
1.4.2.1. “Small-molecule drugs”	22
1.4.2.1.1. Inibidores da via “target of rapamycin”: Sirolimus e Everolimus	22
1.4.2.1.2. Inibidores de calcineurina: Ciclosporina e Tacrolimus	23
1.4.3. Farmacogenética	24
1.4.3.1. Transporte e metabolismo de CsA, FK506, SRL, EVL	25

1.5. Expressão génica	26
1.5.1. Citocinas	27
1.5.1.1. Quimiocinas	27
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>OBJECTIVOS 31</b>
2.1. Objectivos	32
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS 33</b>
3.1. População em estudo	34
3.2. Processamento das amostras de sangue periférico	35
3.2.1. Extracção de DNA das amostras	35
3.2.2. Separação de células activadas por fluorescência (FACS)	35
3.2.3. Extracção de RNA das Fracções celulares	37
3.2.4. Processamento e isolamento de RNA total das amostras	38
3.2.5. Isolamento de soro das amostras	39
3.3. Processamento das amostras de urina	39
3.3.1. Sedimento urinário	39
3.3.2. Extracção de RNA das células do sedimento urinário	40
3.3.3. Extracção de DNA das células do sedimento urinário	40
3.4. Tipagem HLA por Luminex <sup>®</sup> (LABType <sup>®</sup> SSO Typing Tests)	40
3.4.1. Amplificação dos genes HLA	42
3.4.2. Desnaturalização/ Neutralização e Hibridização	42
3.5. Pesquisa de SNPs nos genes <i>CYP3A5</i> e <i>ABCB1</i>	43
3.5.1. Amplificação das regiões de interesse	44
3.5.2. Purificação dos produtos de PCR com ExoSAP-IT <sup>®</sup>	45
3.5.3. Reacção de sequenciação, purificação e sequenciação	46
3.6. Pesquisa de quimerismo no sedimento urinário	46
3.6.1. Reacção de amplificação	47
3.7. Pesquisa de anticorpos anti-HLA Classe I e Classe II (LABscreen <sup>®</sup> )	48
3.8. Quantificação relativa de transcritos (mRNA)	49
3.8.1. PCR de Transcrição Reversa (RT-PCR)	49
3.8.2. PCR em tempo real	50
3.8.3. Normalização	51
3.8.4. Reacções de PCR em tempo real	52
3.8.5. Análise estatística	54

<b>CAPÍTULO 4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>55</b>
4.1. Tipagem HLA		56
4.2. Pesquisa de anticorpos		56
4.3. Perfil farmacogenético		57
4.4. Expressão génica em células do sedimento urinário		59
4.4.1. Determinação do grau de mistura celular (quimerismo) no sedimento urinário		59
4.4.2. Expressão génica		59
4.5. Expressão génica no sangue total		61
4.6. Expressão génica em subpopulações celulares		65
<b>CAPÍTULO 5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>68</b>
5.1. Incompatibilidades HLA e presença de anticorpos		69
5.2. Perfil farmacogenético		70
5.3. Expressão génica em células do sedimento urinário		72
5.4. Expressão génica em células do sangue total		74
5.5. Expressão génica em subpopulações celulares		78
<b>CAPÍTULO 6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>81</b>
<b>CAPÍTULO 7</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>85</b>

## Índice de Figuras

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Localização do complexo MHC no cromossoma 6 nos humanos.	4
<b>Figura 2.</b> Diagrama esquemático das moléculas HLA de classe I e classe II representando os domínios extracelulares, os segmentos transmembranares e a cauda citoplasmática.	5
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática das funções das moléculas CD28, B7-1, B7-2 e CTLA-4.	8
<b>Figura 4.</b> Esquema representativo do reconhecimento de aloantígenos e activação de linfócitos.	9
<b>Figura 5.</b> Ilustração das vias de alo-reconhecimento.	10
<b>Figura 6.</b> Diferenciação dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> naïve em Th1 e Th2.	11
<b>Figura 7.</b> Reconhecimento dos aloantígenos pelas células Tregs e a sua acção imunomoduladora.	18
<b>Figura 8.</b> Activação das células T descrita por uma sequência de três sinais.	21
<b>Figura 9.</b> Representação da estrutura química de Sirolimus e Everolimus	22
<b>Figura 10.</b> Representação da estrutura química dos inibidores de calcineurina, Ciclosporina e Tacrolimus.	23
<b>Figura 11.</b> Esquema ilustrativo dos passos constituintes da técnica utilizada para tipagem HLA por Luminex <sup>®</sup> (LABType <sup>®</sup> SSO Typing Tests).	41
<b>Figura 12.</b> Esquema representativo da detecção dos produtos de PCR em tempo real recorrendo a SYBR <sup>®</sup> Green I.	51
<b>Figura 13.</b> Resultados de electroforese em gel de agarose.	57



## Índice de Tabelas

	<b>Página</b>
<b>Tabela I.</b> Alvos, efeitos e células secretoras das citocinas cuja análise da expressão génica será relevante para este trabalho.	28
<b>Tabela II.</b> Descrição de genes cuja análise de expressão génica será relevante no contexto deste trabalho.	29
<b>Tabela III.</b> Descrição de genes cuja análise de expressão génica será relevante no contexto deste trabalho (Cont.).	29
<b>Tabela IV.</b> Resumo dos dados dos doentes estudados.	34
<b>Tabela V.</b> Anticorpos monoclonais e respectivos fluorocromos usados na separação celular.	36
<b>Tabela VI.</b> Programa de PCR usado na amplificação dos genes HLA.	42
<b>Tabela VII.</b> Sequências dos primers usados na pesquisa de SNPs ( <i>CYP3A5</i> e <i>ABCB1</i> ).	44
<b>Tabela VIII.</b> Programa de PCR usado na amplificação das regiões contendo os SNPs dos genes <i>CYP3A5</i> e <i>ABCB1</i> .	45
<b>Tabela IX.</b> Programa de PCR usado na reacção de sequenciação.	46
<b>Tabela X.</b> Sequências dos primers usados na amplificação dos STRs.	47
<b>Tabela XI.</b> Programa de PCR usado na amplificação dos STRs.	48
<b>Tabela XII.</b> Programa de RT-PCR usado na síntese de cDNA com o kit <i>SuperScript<sup>®</sup> III</i> .	49
<b>Tabela XIII.</b> Programa de RT-PCR usado na síntese de cDNA com o kit <i>iScript<sup>™</sup> Reverse Transcription Supermix</i> .	50
<b>Tabela XIV.</b> Esquema-resumo dos genes de referência e de interesse usados para os diferentes tipos de amostras.	53
<b>Tabela XV.</b> Programa de PCR em tempo real usado para análise da expressão génica.	54
<b>Tabela XVI.</b> Média e desvio-padrão do número de incompatibilidades nas moléculas HLA classe I e classe II entre o par dador-receptor.	56

<b>Tabela XVII.</b> Percentagem de doentes, dos dois grupos de transplantados, obtida na pesquisa de anticorpos HLA Classe I e Classe II.	57
<b>Tabela XVIII.</b> Percentagem dos SNPs para o grupo dos transplantados com função renal estável há mais de dez anos.	58
<b>Tabela XIX.</b> Percentagem dos SNPs para o grupo dos transplantados com função disfunção crónica.	58
<b>Tabela XX.</b> Média da percentagem da origem das células do sedimento urinário, dador e receptor.	59
<b>Tabela XXI.</b> Valores médios da expressão génica normalizada dos vários genes estudados nas células do sedimento urinário dos dois grupos de transplantados.	60
<b>Tabela XXII.</b> Valores médios da expressão génica normalizada (NGE) e de desvio-padrão, dos vários genes estudados no sangue periférico total dos dois grupos de transplantados.	64
<b>Tabela XXIII.</b> Valores médios da expressão génica normalizada (NGE) e de desvio-padrão, dos vários genes estudados nas fracções celulares separadas a partir de sangue periférico dos dois grupos de transplantados.	67

## **Abreviaturas**

*ABCB1* – gene que codifica “Adenosine Triphosphate binding cassette B1”

*ACTB* – gene que codifica a beta actina

*ATP5B* – gene que codifica a ATP sintase

APC – “allophycocyanin”

APCs – células apresentadoras de antígenos

*B2M* - Gene que codifica a microglobulina-2-β

BCR – receptor de células B

°C – graus Celsius

Ca<sup>2+</sup> - iões de cálcio

CaN – calcineurina

CAN – nefropatia crónica do aloenxerto

CCL2 – quimiocina CCL2 (quimiocina (motivo C-C) ligando 2)

CCL3 – quimiocina CCL3 (quimiocina (motivo C-C) ligando 3)

CCL4 – quimiocina CCL4 (quimiocina (motivo C-C) ligando 4)

CCL5 – quimiocina CCL5 (quimiocina (motivo C-C) ligando 5)

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

CD80 – “cluster” de diferenciação 80

CD86 – “cluster” de diferenciação 86

CD3 – “cluster” de diferenciação 3

*CD79B* – gene que codifica a proteína de membrana CD79b

Células Tc – células T citotóxicas

Células Th – células T auxiliaadoras

CHUC – Centro Hospitalar Universitário de Coimbra

CTL – linfócitos T citotóxicos

CsA – ciclosporina

Ct – “cycle threshold”

*CYP3A5* – gene que codifica a enzima metabólica do citocromo P450 do subgrupo 3A, isoforma 5

*CTLA4* - gene que codifica “cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4”

*CXCL10* - Gene que codifica a quimiocina CXCL10 (Quimiocina (motivo C-X-C) ligando 10, também designada por IP-10)

CXCL10 - Quimiocina CXCL10

*CXCL9* - Gene que codifica a quimiocina CXCL9 (Quimiocina (motivo C-X-C) ligando 9, também designada por IP-9)

CXCL9 - Quimiocina CXCL9

$\Delta Ct$  – quantidade de mRNA relativa

*CYCl* – gene que codifica o citocromo c-1

dp – desvio-padrão

dNTP – nucleótido

ddNTP – dideoxinucleótido

DC – células dendríticas

DNA – ácido desoxirribonucleico

*EIF4A2* – gene que codifica o factor eucariótico de iniciação da translacção 4-a, isoforma 2

FACS – “Fluorescence-Activated Cell Sorter”

FasL – ligando do Fas

FKBP12 – proteína ligante de FK506

FK506 – tacrolimus

*FoxP3* – gene que codifica o factor de transcrição “forkhead box P3”

FoxP3 – factor de transcrição “forkhead box P3”

FITC – “fluorescein isothiocyanate”

*GAPDH* – gene que codifica a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

*GATA3* – gene que codifica o factor de transcrição GATA3

*GZMB* – gene que codifica Granzima B

GZMB – granzima B

HLA – antigénios leucocitários humanos

iTregs – células T reguladoras induzidas

IFN- $\gamma$  – interferão-gama

IL 2 – interleucina 2

*IL 2* – gene que codifica a interleucina 2

IL 4 – interleucina 4  
*IL 4* – gene que codifica a interleucina 4  
IL 6 – interleucina 6  
*IL 6* – gene que codifica a interleucina 6  
IL 10 – interleucina 10  
*IL 10* – gene que codifica a interleucina 10  
*KIM-1* – gene que codifica a “kidney injury molecule 1”  
mAb – anticorpos monoclonais  
*MAN* – gene que codifica a  $\alpha$ -1,2-manosidase  
mRNA – ácido ribonucleico mensageiro  
MHC – complexo “major” de histocompatibilidade  
*MDR1* – gene “multidrug resistance”  
*MS4A1* – gene que codifica “membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1”  
nTregs – células T reguladoras naturais  
NFAT – factor nuclear de células T activadas  
NGE – expressão génica normalizada  
PAMPs – padrões moleculares associados a patogénios  
PB – “pacific blue”  
PBS – tampão fosfato salino  
PC7 – “phycoerythrin-Cyanine 7”  
PCR – reacção de polimerização em cadeia  
PE – “phycoerythrin”  
P-gp – glicoproteína P  
*PRF1* – gene que codifica Perforina  
PRF1 – Perforina  
*SH2D1B* – gene que codifica “SH2 domain-containing 1B”  
SNP – “single nucleotide polymorphism”  
RNA – ácido ribonucleico  
rpm - rotações por minuto, unidade de velocidade de centrifugação

RT-PCR – PCR de transcrição reversa

*SDHA* – gene que codifica o complexo da succinato desidrogenase, subunidade A

*SF3A1* - gene que codifica o factor de “splicing” 3a, subunidade 1

*SLC8A1* – gene que codifica “Solute carrier family 8 (sodium/ calcium exchanger), member 1”

TCR – receptor das células T

*TCL1A* – gene que codifica “T cell leukemia/lymphoma 1A”

TDM – “Therapeutic Drug Monitoring”

TGF- $\beta$ 1 – factor de crescimento tumoral beta 1

*TGF- $\beta$ 1* – gene que codifica o factor de crescimento tumoral beta 1

TNF – factor de necrose tumoral

*TOP1* – gene que codifica a DNA Topoisomerase I

*UBC* – gene que codifica a Ubiquitina C

Tregs – células T reguladoras

YAG – “Yttrium-Argon-Germanium”

*YWHAZ* – gene que codifica a fosfolipase A2

*18S rRNA* – gene que codifica a subunidade ribossomal 18S

## **Resumo**

A transplantação é a terapia de eleição para doentes com insuficiência renal crónica terminal. Desde o nascimento da área da transplantação de órgãos, o progresso das técnicas cirúrgicas e a introdução de novos agentes imunossupressores têm conduzido ao aumento da sobrevivência do enxerto a curto prazo.

Contudo, este aumento dos resultados das taxas de sobrevivência do enxerto a curto prazo não tem sido acompanhado com o aumento dos resultados a longo prazo. E a acompanhar a perda tardia do enxerto estão as complicações associadas a uma terapia imunossupressora contínua.

Hoje em dia, a monitorização funcional dos enxertos renais é feita pela determinação da creatinina sanguínea, cujas variações não serão específicas da rejeição, e pela análise da biópsia renal, sendo este um procedimento invasivo.

Portanto, o desenvolvimento de ensaios não invasivos, que detectem biomarcadores moleculares de rejeição, pode revolucionar a monitorização dos receptores de transplantes, pela identificação de um perfil de pré-rejeição que permita a intervenção atempada antes da disfunção do enxerto estar instalada.

O objectivo deste trabalho foi fazer uma avaliação genética, genómica, celular e humoral de doentes transplantados com função renal estável há mais de dez anos e transplantados aos quais foi diagnosticada rejeição/ disfunção crónica do enxerto. De forma, a encontrar algum aspecto diferencial entre os grupos, que pudesse constituir um potencial alvo de estudo, com o intuito de monitorizar a evolução do transplante sem recorrer a técnicas invasivas e, acima de tudo, avaliar o impacto dessas características na longevidade do enxerto.

Ao nível de incompatibilidades HLA os grupos de estudo não apresentaram diferenças, assim como, no perfil farmacogenético.

Foram observadas diferenças entre os grupos, nomeadamente, na presença de anticorpos anti-HLA, na análise da expressão génica em células do sedimento urinário, em células do sangue periférico e em subpopulações celulares.

As diferenças encontradas tendem a ser indiciadoras de algum grau de tolerância nos transplantados com função renal estável há mais de dez anos, tendo em atenção que estes doentes continuam a realizar uma terapêutica imunossupressora.

Palavras – chave: transplantação renal; rejeição crónica; tolerância; biomarcadores.

## **Abstract**

Transplantation is the therapy of choice for patients with end-stage renal failure. Since the birth of the field of organ transplantation, progresses in surgical techniques and introduction of new immunosuppressive agents have resulted in sustained improvements in the short-term outcomes of organ transplantation.

However, this improved of outcomes in short-term graft survival rates have not been accompanied with increased long-term outcomes. And to accompany the late loss of graft complications are associated with a continuous immunosuppressive therapy.

Today, the monitoring function of renal grafts is done by determining the blood creatinine, whose variations are not specific for rejection, and the analysis of renal biopsy, which is an invasive procedure.

Therefore, the development of noninvasive tests which detect molecular biomarkers of rejection, may lead an overturn in the monitoring of transplant recipients, by the identification of a pre-rejection profile allowing early intervention before the graft dysfunction is installed.

The aim of this study was to evaluate genetic, genomic, cellular and humoral patients with stable renal function for over ten years and who have been diagnosed transplant rejection/chronic graft dysfunction. In order to find some difference between the groups, which could be a potential target of study, in order to monitor the progress of the transplant without resorting to invasive techniques and, above all, evaluate the impact of these characteristics on graft survival.

At the level of HLA mismatches study groups showed no differences, as well as the pharmacogenetic profile.

Differences were observed between the groups, in particular in the presence of anti-HLA antibodies, the analysis of gene expression in cells of urinary sediment, in peripheral blood cells and lymphocyte subsets.

The differences founded tend to be indicative of some degree of tolerance in patients with stable renal function for more than ten years, it is important refers that these patients continue to perform an immunosuppressive therapy.

**Keywords:** renal transplantation; chronic rejection; tolerance; biomarkers.



**Capítulo 1.**

**Introdução**

## 1.1. Transplantação

Transplantação, como termo usado em imunologia, refere-se ao acto de transferir células, tecidos ou órgãos de um local para outro. O objectivo inerente à realização de transplantes é implantar um órgão saudável, tecido ou células – o enxerto – de um indivíduo (o dador) para um outro indivíduo que necessita de um transplante (o receptor) (Kuby *et al.*, 2003).

A transplantação renal é o tratamento de eleição para a maioria dos doentes com doença renal crónica em estado terminal, os quais estão permanentemente dependentes de diálise possibilitando-lhes, assim, maior sobrevida e melhor qualidade de vida (Lee *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2005).

O primeiro transplante renal experimental realizado com sucesso teve lugar em 1902 e o progresso rápido neste campo esteve, principalmente, relacionado com o desenvolvimento de técnicas de cirurgia vascular. No entanto, em 1914, numa palestra marcante que tinha como tema os aspectos cirúrgicos da transplantação, Alexis Carrell referiu que os esforços futuros nesta área deviam ser “...direccionados para os métodos biológicos, os quais vão prevenir a reacção do organismo contra o tecido estranho...” (Somasundaran e Quiroga, 2011).

O primeiro transplante renal realizado com sucesso em humanos foi, em Boston, em 1954, entre gémeos idênticos.

Para além de existir uma desproporção entre os indivíduos que necessitam de transplantes e os órgãos para transplantação, existe uma barreira enorme a ser transposta no tratamento médico de rotina da transplantação, barreira essa denominada sistema imune.

O sistema imune está envolvido em mecanismos elaborados e efectivos para proteger o organismo do ataque de agentes estranhos, e esses mecanismos causam a rejeição dos enxertos em indivíduos que não são geneticamente idênticos (Kuby *et al.*, 2003).

Actualmente, a monitorização funcional dos enxertos renais é feita pela determinação da creatinina sanguínea, cujas variações não serão específicas da rejeição, e pela análise da biópsia renal, sendo este um procedimento invasivo com potencial de morbilidade, caro e sujeito a erro de amostragem, uma vez que, os processos inflamatórios podem ser focais e na biópsia examina-se, apenas, um fragmento de tecido renal. Assim, a identificação de moléculas por métodos não invasivos, sensíveis e úteis

na prática clínica – os biomarcadores – têm sido alvo de extensos estudos (Dias *et al.*, 2005).

A expansão dos conhecimentos e o aparecimento de novas técnicas em biologia celular e molecular têm vindo a proporcionar o conhecimento da fisiopatogenia de diversas condições associadas com disfunção dos enxertos, possibilitando diagnósticos mais precisos e precoces. Estas técnicas, aplicadas no estudo da rejeição subclínica, rejeição aguda e crónica, têm contribuído na elucidação dos mecanismos imunológicos envolvidos (Dias *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de ensaios não invasivos, que detectem biomarcadores moleculares de rejeição pode revolucionar a monitorização dos receptores de transplantes, pela identificação de um perfil de pré-rejeição que permita a intervenção atempada antes da disfunção do enxerto estar instalada; pelo aumento da sensibilidade e especificidade do diagnóstico da rejeição; pelo desenvolvimento de novos sistemas de classificação da rejeição que melhorem o prognóstico; e pelo fornecimento de informação para se estabelecerem regimes individualizados de imunossupressão que, simultaneamente, possam prevenir a rejeição com o mínimo de toxicidade (Baxter-Lowe e Busch, 2006).

### **1.1.1. Tipos de transplante**

O grau da resposta imune ao enxerto difere de acordo com o tipo de transplante.

Os diferentes tipos de transplante podem ser denotados com os seguintes termos: *autotransplante*, quando um autotecido é transferido de um local do corpo para um outro local, do mesmo indivíduo; *isotransplante* refere-se a tecido transferido entre indivíduos geneticamente idênticos; *alotransplante* ocorre quando o tecido é transferido entre membros geneticamente diferentes da mesma espécie; e, por fim, o *xenotransplante* tem lugar quando o tecido é transferido entre espécies diferentes (Kuby *et al.*, 2003).

Quando o enxerto é singénico (geneticamente idêntico ao receptor, nos casos de transplantação entre gémeos idênticos) ou autólogo (enxerto do próprio indivíduo), há uma identidade geneticamente perfeita e a resposta imune torna-se quase inexistente.

No caso de um alotransplante, a presença de células de um outro indivíduo com características genéticas diferentes, vai fazer com que haja o desencadear de uma resposta imune contra essas células (Kuby *et al.*, 2003).

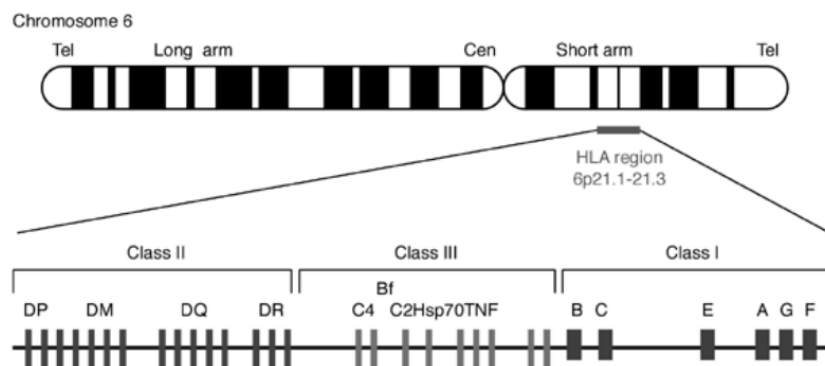
Os vários antígenos que determinam a compatibilidade de células e tecidos são codificados por mais de 40 *loci* diferentes, mas os *loci* responsáveis pelas reações mais vigorosas de rejeição do aloenxerto estão localizados no designado “Major histocompatibility complex” (MHC), que desempenha um papel central no desenvolvimento da resposta imune.

O MHC é um conjunto de genes dispostos no braço curto do cromossoma 6 (6p21) nos humanos, sendo referido como o sistema HLA (Figura 1). Os genes HLA estão organizados em regiões que codificam três classes de moléculas, moléculas HLA classe I, II e III (Kuby *et al.*, 2003).

Os genes HLA classe I codificam glicoproteínas expressas à superfície de quase todas as células nucleadas; a principal função dos produtos dos genes de classe I é a apresentação de péptidos antigénicos às células T citotóxicas (Tc).

Os genes HLA classe II, por sua vez, codificam glicoproteínas expressas, principalmente, nas células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas e células B), as quais apresentam péptidos antigénicos processados às células T auxiliaadoras (Th).

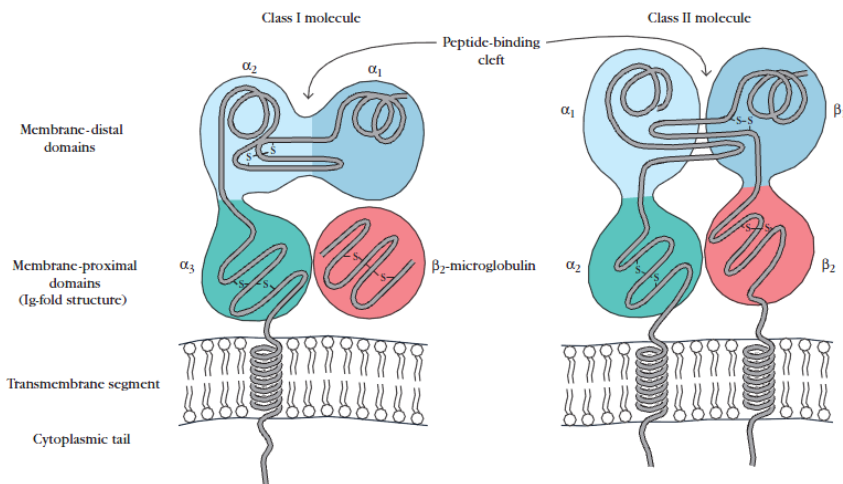
Por fim, os genes HLA classe III codificam, adicionalmente com outros produtos, várias proteínas que possuem funções imunológicas, incluindo componentes do sistema complemento e moléculas envolvidas na inflamação (Kuby *et al.*, 2003).



**Figura 1.** Localização do complexo MHC no cromossoma 6 nos humanos. O sistema HLA está localizado no braço pequeno do cromossoma 6 (6p21) e representa os genes mais polimórficos do genoma humano. Os genes HLA envolvidos na resposta imunitária estão divididos em genes HLA classe I e classe II, com base na estrutura, expressão e função das moléculas que codificam. (Fonte: Billen, Evy V.A.; *HLA antibodies detection and clinical relevance*. Universitaire Pers Maastricht; 2011)

As moléculas HLA classe I codificadas pelos *loci* A, B e C foram as primeiras a serem descobertas e são expressas numa gama variada de tipos de células. As duas cadeias das moléculas HLA classe II são codificadas pelas regiões DP, DQ e DR, em humanos.

As moléculas HLA classe I e classe II possuem características estruturais comuns e ambas desempenham funções no processamento de antígenos. São glicoproteínas ligadas à membrana, cuja função especializada é servirem como moléculas apresentadoras de antígenos, pois formam complexos estáveis com os péptidos antigénicos, mantendo-os à superfície das células para reconhecimento pelas células T (Figura 2).



**Figura 2.** Diagrama esquemático das moléculas HLA de classe I e classe II representando os domínios extracelulares, os segmentos transmembranares e a cauda citoplasmática. A fenda de ligação dos péptidos é formada pelos domínios mais distantes da membrana, em ambas as moléculas. (Fonte: Kuby, J., Kindt T.J., Goldsby R.A., Osborne B.A (2003). Immunology. 5<sup>th</sup> edition. W.H. Freeman and Company. New York)

Uma das principais características dos genes HLA é o seu vasto polimorfismo. Actualmente, são conhecidas mais de 1000 proteínas HLA diferentes codificadas pelos genes HLA classe I e II clássicos.

Os genes HLA são altamente polimórficos, existindo várias formas alternativas dos genes ou alelos de cada *locus* entre indivíduos. Cada grupo de alelos é referido como um haplótipo. Um indivíduo herda um haplótipo da mãe e um haplótipo do pai.

Embora, a taxa de recombinação através de “crossover” seja baixa nos genes do sistema HLA, contribuiu significativamente para a diversidade do *locus* na população humana. A recombinação genética gera novas combinações alélicas e o elevado número

de gerações desde o aparecimento da espécie humana permitiu inúmeras recombinações, o que torna raro a possibilidade de dois indivíduos, sem qualquer relação parental, terem grupos de genes HLA idênticos (Kuby *et al.*, 2003).

Em suma, o sistema HLA e o seu polimorfismo evoluíram de forma a assegurar a identidade imunológica individual, pois, só assim, o sistema imune pode discriminar entre “self” e “non-self”. Portanto, as moléculas HLA constituem a base da imunologia da transplantação.

As diferenças entre dador e receptor ao nível do sistema HLA, isto é, o grau de incompatibilidade, podem ser expressas em termos de “mismatches”.

HLA “mismatch” refere-se à falta de correspondência entre dador e receptor ao nível de HLA-A, HLA-B e HLA-DR, dado estes serem os *loci* mais polimórficos e antigénicos e, conseqüentemente, serem os mais relevantes na transplantação.

Um elevado número de “mismatches” entre estes antígenos HLA está associado a um pior resultado a nível de transplantação renal (Somasundaran e Quiroga, 2011; Feucht e Opelz, 1996).

## 1.2. Rejeição do enxerto

O dano do enxerto pode ocorrer a diferentes momentos depois da transplantação, podendo ser: após minutos ou horas, na designada **rejeição hiperaguda**; após dias ou semanas, no caso de **rejeição aguda**; e, por fim, passados meses a anos, estando perante a **rejeição crónica**.

Estes termos estão relacionados com o tempo clínico de apresentação de sintomas da rejeição mas, também, podem tender a reflectir quais os diferentes mecanismos que estão a contribuir para o processo, ou seja, a contribuição pelas células e anticorpos (Rose e Hutchinson, 2006), tendo em conta que a resposta imune contra o órgão transplantado consiste em ambos os mecanismos celular (mediada por linfócitos) e humoral (mediada por anticorpos) (Malhotra, 2011).

A resposta imune pode ser dividida em duas partes distintas: a resposta inata (não específica, independente de antígeno) e a resposta adaptativa (adquirida, específica, dependente de antígeno). Existe uma estreita cooperação entre as duas respostas e cada uma consiste em duas fases, a de reconhecimento e a efectora. Os diferentes componentes da resposta podem, também, ser divididos em celular e humoral (Somasundaran e Quiroga, 2011).

O sistema imune inato (monócitos, células NK, neutrófilos) compreende células que não possuem mecanismos de reconhecimento específicos de antígenos, mas reconhecem um largo espectro de antígenos, que consistem em motivos conservados nos patógenos. Estes motivos são designados “Pathogen-associated molecular patterns” (PAMPs). O reconhecimento de patógenos pelos monócitos não requer expansão clonal.

Existem evidências fortes que os componentes do sistema imune inato são responsáveis por danos no enxerto nos estádios iniciais do transplante. Os enxertos são infiltrados com monócitos e neutrófilos muito cedo após a implantação, resultando na expressão de uma gama variada de novas moléculas, incluindo moléculas de adesão, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, as quais promovem a infiltração do enxerto por linfócitos. O complemento, embora esteja associado com a activação de anticorpos, também pode ser activado na ausência. A activação do complemento ocorre durante o dano da reperfusão isquémica e causa danos nos tecidos e amplifica a resposta imune.

A resposta imune adquirida é a resposta mediada por linfócitos específicos para os antígenos. A característica da resposta imune adquirida é a sua capacidade de responder rapidamente a antígenos que já estiveram presentes previamente, e a resposta obtida deve-se à selecção clonal e expansão de linfócitos específicos contra os antígenos.

Os clones individuais de linfócitos que apresentam especificidade para distintos motivos antigénicos com uma larga diversidade de receptores são gerados através de rearranjos somáticos dos genes que os codificam. A larga diversidade de receptores das células T e das células B significa que os clones de linfócitos com especificidade para um dado antígeno estão sempre presentes (Rose e Hutchinson, 2006).

As células T são as principais directrizes do sistema imune adquirido, na fase de reconhecimento e na fase efectora. A apresentação de antígenos aos linfócitos T resulta na activação e proliferação das células T (Somasundaran e Quiroga, 2011).

### **1.2.1. Papel das células T na rejeição**

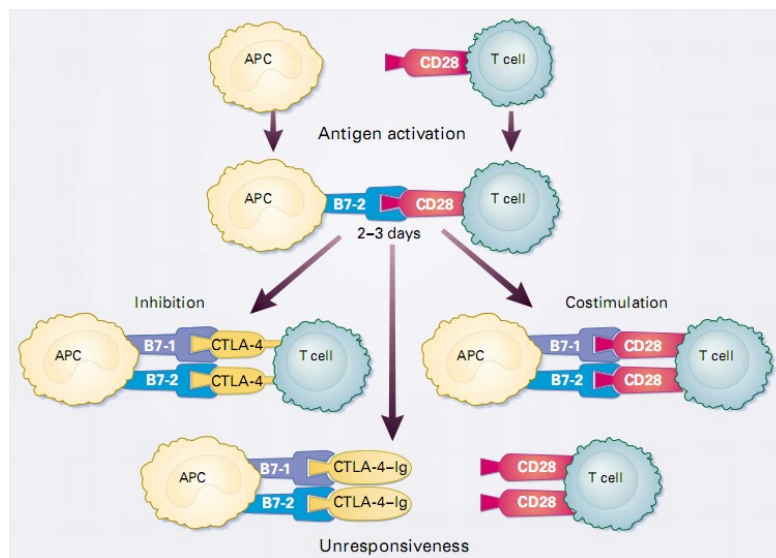
Até ao momento, as células T são consideradas as células centrais na rejeição dos enxertos. A reacção de rejeição consiste na fase de sensibilização e na fase efectora (Malhotra, 2011).

Como já foi referido, anteriormente, a função das moléculas HLA expressas à superfície das APCs, é ligar fragmentos de péptidos antigénicos e apresentá-los às

células T, as quais os reconhecem através dos seus receptores (TCR). Este passo de reconhecimento inicia a resposta imune mediada por células T, iniciando-se, portanto, a fase de sensibilização.

Mas a completa activação das células T requer dois sinais distintos mas sinérgicos. O primeiro sinal, entregue através do receptor de antígenos das células T, é proveniente do próprio antígeno e é responsável pela especificidade da resposta imune. O segundo, ou co-estimulatório, é um sinal não específico do antígeno. Várias moléculas das células T podem servir como receptores para sinais co-estimulatórios, a molécula CD28 é uma dessas moléculas. A molécula CD28 tem dois ligandos conhecidos, B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), os quais são expressos principalmente em APCs activadas (Figura 3).

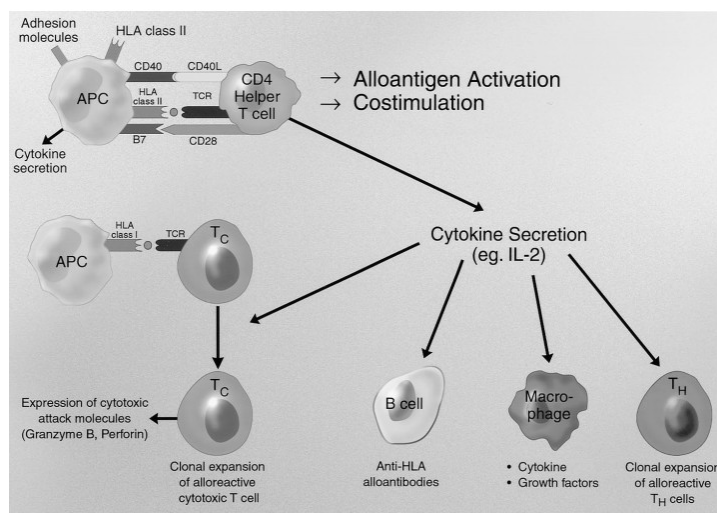
As células T, também, expressam CTLA4, uma molécula estrutural semelhante a CD28, a qual pode, igualmente, ligar-se a B7-1 e B7-2. No entanto, ao contrário de CD28, CTLA-4 transmite um sinal inibitório que faz com que a resposta imune termine (Figura 3) (Sayegh e Turka, 1998).



**Figura 3.** Representação esquemática das funções das moléculas CD28, B7-1, B7-2 e CTLA-4. As células T não-activadas expressam CD28, mas as APCs não-activadas não expressam moléculas B7. Após activação as APCs, inicialmente, expressam B7-2, sendo possível a sua ligação à molécula CD28, transmitindo o sinal co-estimulatório à célula T. Mais tarde, as APCs passam a expressar também B7-1 e as células T expressam o receptor inibitório, CTLA-4. Ambas as moléculas B7-1 e B7-2 podem ligar quer CD28 ou CTLA4, levando a cabo uma co-estimulação continuada ou a um novo sinal inibitório, respectivamente. (Fonte: Sayegh, Mohamed H. and Turka, Laurence A.; *The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection*. Mechanisms of disease 338, 35 (1998)).



A estimulação das células T pelas moléculas CD80 e CD86 e reconhecimento do antígeno induz a expressão de uma molécula de superfície denominada Ligando CD40 (CD40L), o qual se liga ao CD40 presente nas células B, células dendríticas, macrófagos activados e células endoteliais. Esta interacção ligando-receptor desempenha um papel fundamental na resposta imunológica e, perante o seu bloqueio, a activação de células B e T não ocorre (Figura 4) (Kamoun, 2001).



**Figura 4.** Esquema representativo do reconhecimento de aloantígenos e activação de linfócitos. As células T usam os seus receptores específicos para antígenos (TCR) para reconhecer os aloantígenos. Os TCR reconhecem apenas os fragmentos antigénicos que são apresentados pelas moléculas HLA. As células T CD4<sup>+</sup> reconhecem antígenos apresentados pelas moléculas HLA classe II e as células T CD8<sup>+</sup> reconhecem os antígenos apresentados pelas moléculas HLA classe I. O reconhecimento pelos TCR é necessário mas não suficiente para activar as células T alo-reativas. A interacção B7-CD28 gera o sinal co-estimulatório que promove a completa activação das células T. A interacção B7-CTLA-4 inibe a activação das células T. A interacção do receptor CD40 com o CD40L afecta as APCs, levando a uma sobre-regulação da expressão de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão e B7. As APCs activadas, assim, através do seu receptor CD40 funcionam como mais um estimulador para as células T. (Fonte: Kamoun, Malek; *Cellular and molecular parameters in human renal allograft rejection*. Clinical biochemistry 34, 29-34 (2001))

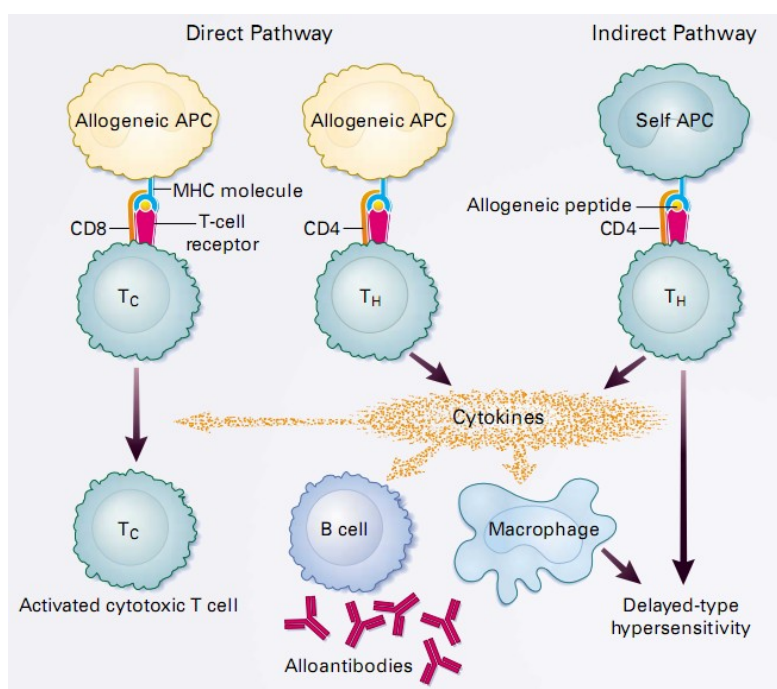
O alo-reconhecimento refere-se ao fenómeno pelo qual o sistema imune do receptor reage com os antígenos do dador, que são considerados “non-self” (Bharat e Mohanakumar, 2007). Existem, no mínimo, duas vias de alo-reconhecimento, vias essas designadas por via directa e via indirecta.

Na via directa, as células T do receptor reconhecem as moléculas HLA alogénicas intactas expressas nas células do dador. Os órgãos transplantados transportam um número variável de APCs passageiras, na forma de células dendríticas intersticiais. Estas APCs possuem uma elevada densidade de moléculas aloantigénicas e

são capazes de estimular directamente células T do receptor (Figura 5) (Malhotra, 2011).

Na via indirecta, os péptidos derivados do catabolismo das moléculas HLA do dador são apresentados pelas próprias APCs do receptor (Figura 5) (Sayegh e Turka, 1998).

A via directa parece ser responsável pela resposta imune vigorosa na rejeição aguda, e, por outro lado, a via indirecta parece ser dominante na disfunção crónica (Sayegh e Turka, 1998).

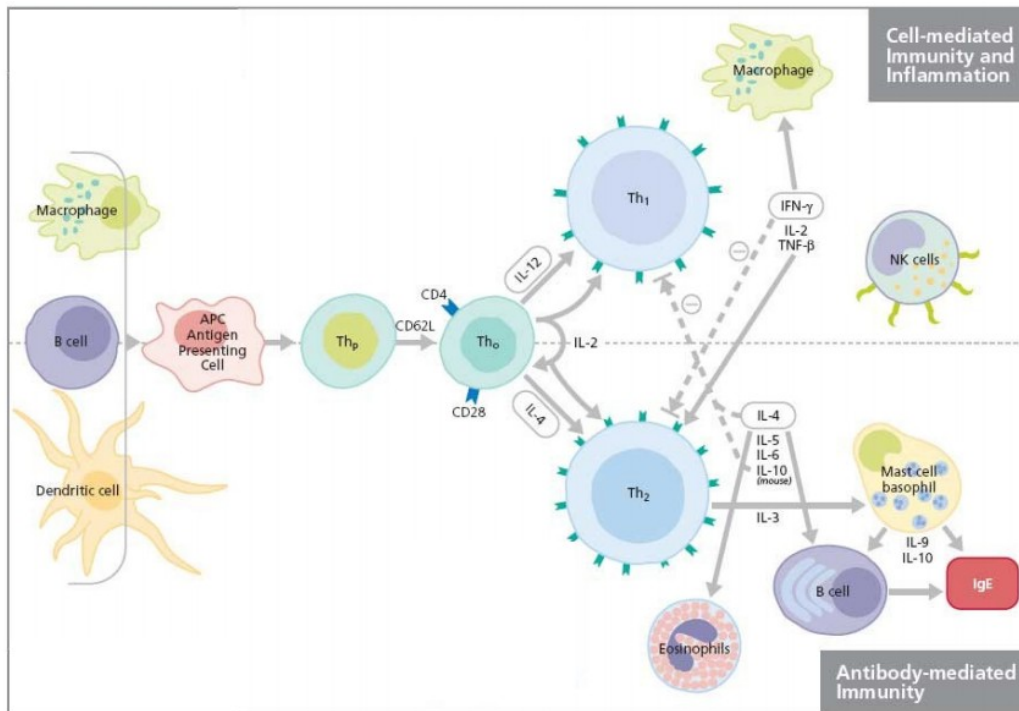


**Figura 5.** Ilustração das vias de alo-reconhecimento. Na via directa de alo-reconhecimento, moléculas MHC de células alo-génicas, funcionam como APCs alo-génicas, ligando-se às células T. Na via indirecta, as moléculas MHC do dador são processadas em péptidos que são apresentados às células T. (Fonte: Sayegh, Mohamed H. and Turka, Laurence A.; *The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection*. Mechanisms of disease 338, 35 (1998))

As células T CD4<sup>+</sup>, aparentemente, são as mais importantes na iniciação da rejeição do enxerto. São responsáveis pela produção da maioria das citocinas necessárias à estimulação da resposta imune.

Após a apresentação do antígeno pelas APCs, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> naïve são activados, proliferam e sofrem diferenciação. E sob diferentes condições de activação, estes linfócitos, estimulados pelo antígeno, podem sofrer um processo de diferenciação

Th1 ou Th2. De forma geral, as células Th1 conduzem à resposta imune celular e as células Th2 produzem a resposta imune humoral (Figura 6).



**Figura 6.** Diferenciação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>naïve em Th1 e Th2. Após a apresentação do antígeno pelas APCs, os linfócitos T CD4<sup>+</sup>naïve são activados, proliferam e sofrem diferenciação em subtipos com perfis característicos de produção de citocinas, nomeadamente, células Th1 e células Th2. As células Th1 conduzem à resposta imune celular e as células Th2 produzem a resposta imune humoral (Adaptado de *www.biolab.cn*).

Embora, as células T CD8<sup>+</sup> possam produzir pequenas quantidades de citocinas, a sua contribuição para a rejeição do enxerto está relacionada com a lise directa das células do dador.

Macrófagos activados e células T CD4<sup>+</sup> por si só contribuem para o processo de rejeição pela resposta de hipersensibilidade tardia envolvendo a produção de mediadores solúveis como o TNF e intermediários reactivos de oxigénio. Esta resposta é suficiente para causar a perda do enxerto, mesmo na ausência de células T CD8<sup>+</sup> (Sayegh e Turka, 1998).

As células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas (CTLs) desencadeiam as reacções de citotoxicidade mediada por células induzindo apoptose. Depois da activação das CTLs, ocorre a formação de grânulos que contêm Perforina e Granzima. E, ao mesmo tempo, com a célula-alvo identificada e mobilizada, esses grânulos fundem com a membrana da célula efectora e libertam o seu conteúdo na sinapse imunológica. Assim, as granzimas

são inseridas dentro do citoplasma da célula-alvo, onde a Granzima B pode desencadear apoptose através de vários mecanismos, incluindo a clivagem directa da procaspase-3 e a activação indirecta da procaspase-9.

Em alternativa, as CTLs podem, também, usar a via dependente de Fas para induzir citólise e apoptose. A via Fas é, igualmente, importante na limitação da proliferação das células T na resposta à estimulação antigénica.

A citotoxicidade mediada por células aparenta ter um papel importante na rejeição aguda do aloenxerto, mas não na rejeição crónica (Sayegh e Turka, 1998).

### **1.2.2. Rejeição hiperaguda**

A rejeição hiperaguda acontece quando o dano do enxerto ocorre minutos ou horas após o transplante, porque a vascularização é destruída. Este tipo de rejeição é causada pela presença de anticorpos pré-formados dirigidos contra os antígenos do enxerto. E existem três possíveis hipóteses para explicar a presença desses anticorpos: as transfusões sanguíneas, a realização prévia de outros transplantes ou a gravidez.

As células endoteliais dos vasos sanguíneos do “novo” órgão são os principais alvos, dado os anticorpos ao se ligarem às células levarem a consequências catastróficas para o enxerto, causando a lise celular dependente do complemento ou à activação das células endoteliais, conduzindo a trombose intravascular e coagulação. O bloqueio do fornecimento de sangue ao enxerto torna-se crítico (Rose e Hutchinson, 2006).

### **1.2.3. Rejeição aguda**

#### **1.2.3.1. Rejeição aguda celular (mediada por linfócitos)**

A rejeição aguda celular é mediada por linfócitos que foram activados contra antígenos do dador, principalmente, nos tecidos linfóides do receptor. As células dendríticas do dador, também designadas por leucócitos passageiros, entram em circulação e funcionam como APCs (Malhotra, 2011).

Transplantados com rejeição celular aguda desenvolvem um aumento abrupto de creatinina, retenção de fluídos e, algumas vezes, febre (Cornell *et al*, 2008).

Patologicamente, a rejeição aguda celular manifesta-se pela acumulação de células mononucleares no interstício. As células mononucleares permeiam o espaço

intersticial que rodeia os túbulos e são constituídas, maioritariamente, por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Cornell *et al.*, 2008).

Os subgrupos das células T auxiliaadoras CD 4<sup>+</sup> (Th) possuem padrões distintos de citocinas e permanece o conceito de que as células Th1 medeiam a rejeição enquanto as células Th2 promovem tolerância. Embora as células T CD4<sup>+</sup> produzam citocinas inflamatórias (IFN- $\gamma$  e IL 2, as quais conduzem a resposta celular, e IL 4, IL 5 e IL 13 produzem a resposta humoral) e as células T CD8<sup>+</sup> medeiam a citotoxicidade, as suas funções efectoras sobrepõem-se (Nankivell e Alexander, 2010).

A tubulite, invasão do epitélio tubular pela infiltração de células T e macrófagos, é uma característica da rejeição aguda celular, como já foi referido, anteriormente. Em casos extremos, a membrana basal tubular sofre ruptura, causando a libertação de proteínas tubulares no interstício, o que se pode correlacionar com a disfunção do enxerto e progressiva perda do enxerto (Cornell *et al.*, 2008).

Portanto, as células T medeiam o dano do aloenxerto através do contacto directo com as células epiteliais tubulares e através dos efeitos da libertação local de citocinas (Nankivell e Alexander, 2010).

Durante a rejeição aguda, uma variedade de quimiocinas são produzidas no enxerto, incluindo CXCL10, CCL2 e CCL3. Os túbulos são, também, fonte de quimiocinas como CCL4, CCL5 e CXCL8 e citocinas como TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL 6. O padrão de expressão sugere uma predominância de células Th1 sobre células Th2.

IFN- $\gamma$ , a citocina prototípica das células Th1, está fortemente associada com a rejeição e a infiltração de células no enxerto (Cornell *et al.*, 2008).

### **1.2.3.2. Rejeição aguda humoral (mediada por anticorpos)**

A rejeição aguda mediada por anticorpos ou rejeição aguda humoral é devido 25%, aproximadamente, a anticorpos para antígenos HLA do dador. Os factores de risco incluem a pré-sensibilização e a diminuição da imunossupressão. Este tipo de rejeição ocorre com todos os regimes de imunossupressão, mesmo com as terapias que inibem profundamente as células T. A rejeição aguda humoral pode ocorrer com ou sem a componente da rejeição mediada pelas células T (Cornell *et al.*, 2008).

A proteinúria está associada com a detecção de anticorpos específicos contra o dador e aparenta ser um factor importante que determina o declínio rápido da taxa de

filtração glomerular e a falha precoce do enxerto em pacientes que desenvolvem anticorpos anti-HLA *de novo* (Malhotra, 2011).

#### **1.2.4. Rejeição/ Disfunção crónica**

A rejeição crónica desenvolve-se meses ou anos depois de episódios de rejeição aguda terem ocorrido.

A rejeição crónica ou disfunção crónica do enxerto pode ser causada por um variado número de processos, particularmente, inflamações repetidas e danos provenientes de causas mediadas imunologicamente ou não. Chang e Platt recorreram ao termo rejeição crónica para se referirem à disfunção crónica do enxerto causada por reacções imunológicas e ao termo disfunção crónica do aloenxerto para mencionar a disfunção causada por isquémia, toxicidade de fármacos, envelhecimento e outros processos não-imunológicos (Chang e Platt, 2009).

A rejeição ou disfunção crónica resulta em vasculopatia obliterativa, infiltração de leucócitos, oclusão luminal e resposta fibrótica, o que conduz à deterioração estrutural e perda de função.

Supõe-se que mais de 60% da rejeição crónica dos órgãos transplantados seja causada pela presença de anticorpos anti-dador (Chang e Platt, 2009).

Desde 1970, através das observações clínicas efectuadas que se sugere, então, uma ligação entre a presença de anticorpos específicos para o dador e a rejeição crónica, à qual Thaunat designa por “Teoria Humoral” da rejeição crónica (Thaunat, 2012).

Em estudos recentes, a presença de anticorpos anti-HLA II no soro foi considerada a melhor característica predictiva para danos na microcirculação, o que sugere que este tipo de anticorpos poderá ter uma maior capacidade para desencadear a falha do enxerto do que os anticorpos anti-HLA I. Contudo, é de salientar que os anticorpos detectados no sangue podem não representar os anticorpos que estão a actuar no enxerto (Thaunat, 2012).

Existem vários factores que aumentam o risco de rejeição/disfunção crónica, os quais podem ser: anteriores episódios de rejeição aguda; imunossupressão inadequada; função inicial do enxerto tardia; factores relacionados com o dador (*e.g.*; idade do dador, hipertensão); danos de reperfusão do órgão; tempo de isquémia fria prolongado; factores relacionados com o receptor (*e.g.*; diabetes, hipertensão, hiperlipidémia); infecção pós-transplante (*e.g.*; citomegalovirus) (Malhotra, 2011).

### **1.3. Tolerância**

A tolerância imunológica é um fenómeno complexo que ocorre naturalmente em todo o ser vivo (Manfro *et al.*, 1999).

Como já foi referido anteriormente, os xenos e os aloenxertos são tecidos altamente imunogénicos, levando, portanto, ao desenrolar de uma forte resposta imune que se não for controlada, leva à destruição dos mesmos no processo de rejeição.

Em contraste, quando um órgão ou tecido transplantado entre seres geneticamente distintos não é rejeitado, na ausência de imunossupressão inespecífica é denominado de tolerância imunológica ao transplante.

Os mecanismos responsáveis pela indução de não resposta aos aloantígenos, assim como os potenciais mecanismos da manutenção da tolerância permanecem sob intenso estudo (Manfro *et al.*, 1999).

Logo, um objectivo central para os imunologistas na área da transplantação é explorar os mecanismos da “self-tolerance” com o intuito de induzir tolerância específica aos tecidos alogénicos durante a transplantação.

Existem características da tolerância ao transplante que são sinónimo de “self-tolerance”, ambos os processos requerem uma aquisição de tolerância a um largo número de antígenos e podem ocorrer através de um mecanismo central ou periférico (Priyadharshini *et al.*, 2011).

A tolerância central é induzida através da injeção de medula óssea do dador em hospedeiros condicionados de forma a estabelecer quimerismo hematopoiético alogénico. Este quimerismo vai resultar, portanto, na deleção clonal de células B e T alo-reativas durante o seu desenvolvimento.

A tolerância periférica requer a deleção de células B e T alo-reativas maduras, que residem na periferia, através de mecanismos como a deleção, anergia e regulação (Priyadharshini *et al.*, 2011).

#### **1.3.1. Deleção**

A barreira central para a indução de tolerância aos tecidos alogénicos é a elevada frequência de precursores de células T alo-reativas. Assim, um aspecto fundamental para o estabelecimento de tolerância é a deleção de células T alo-reativas através de vias, quer passiva, quer activa de morte. A deleção de células T periféricas por morte

celular induzida por activação é um exemplo de um mecanismo activo. Este caso envolve a morte de células T activadas reestimuladas pelo acoplamento do TCR e que tenham recebido sinais através dos receptores de morte celular como o Fas (CD95) e os receptores TNF.

A morte celular passiva é desencadeada por stress extracelular, fármacos citotóxicos ou irradiação, e é regulada por membros da família Bcl-2 (Priyadharshini *et al.*, 2011).

### **1.3.2. Anergia**

A anergia caracteriza-se pela inactivação funcional da resposta das células T à estimulação *de novo* pelo aloantígenios (Wood e Sakaguchi, 2003).

Embora, uma quantidade significativa de células T alo-reactivas seja deletada durante a indução de tolerância ao transplante através do bloqueio dos sinais de co-estimulação das células T, é detectado na periferia um nível baixo dessas células T específicas para o antígeno. Estas células T que escapam à deleção durante o processo de indução de tolerância designam-se anérgicas ou não-respondedoras.

As células T anérgicas falham a sua activação depois do acoplamento do TCR devido a uma redução da sua capacidade de mediar processos de sinalização a jusante do TCR. Além disso, as células T anérgicas estão funcionalmente não-respondedoras à sinalização por IL 2, produzem níveis reduzidos desta interleucina e a sua proliferação está comprometida (Priyadharshini *et al.*, 2011).

### **1.3.3. Regulação (Células T reguladoras)**

Um dos mecanismos mais importante para a indução de tolerância ao transplante é a existência das células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Tregs) (Priyadharshini *et al.*, 2011).

As células Tregs podem ser definidas como células CD4<sup>+</sup> que expressam o factor de transcrição “Forkhead box P3” (FoxP3), o qual é fundamental para o normal desenvolvimento e função destas células (Huehn, 2009). Para além disso, este tipo particular de células expressa à superfície CD25, a subunidade  $\alpha$  do receptor da IL 2, o que permite a sua separação celular.



Este tipo de células T é essencial para manter a homeostase do sistema imune e para prevenir o desenvolvimento de reactividade autoimune de células T “self-reactive” que tenham escapado à selecção negativa no timo.

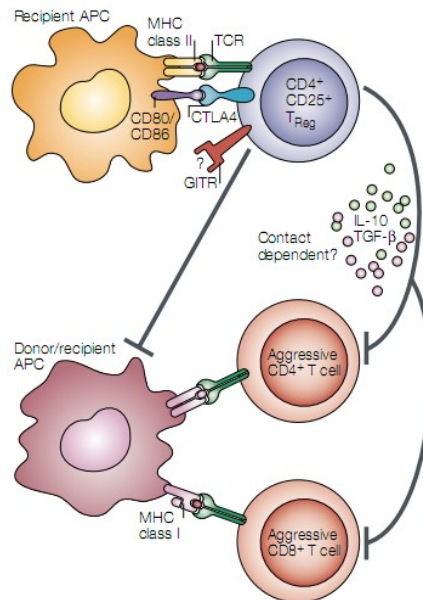
As células Tregs podem diferenciar-se durante o desenvolvimento de células T no timo até ao estadio de timócitos CD4 “single-positive”. Estas células Tregs derivadas timicamente ou naturais retêm um fenótipo estável durante a sua exportação para a periferia. Uma vez na periferia, elas podem ser activadas por antigénios específicos e adquirem algumas propriedades fenotípicas de células T efectoras de memória, tais como, a sua capacidade de migrarem para tecidos periféricos inflamados, mantendo a expressão de FoxP3 e a sua função supressora (Huehn, 2009).

Para além das células Tregs naturais, existem evidências que indicam que as células Tregs, também, podem surgir da conversão de células T CD4<sup>+</sup> convencionais na periferia, seguida do reconhecimento do antigénio sob condições tolerogénicas. Presume-se que esta criação *de novo* de células Tregs possui um papel importante na tolerância adquirida (Huehn, 2009). A população de células Tregs induzida inclui células T reguladoras 1 (Tr1), as quais produzem IL 10; células T helper 3 (Th3), secretoras de TGF- $\beta$ ; e células Tregs Foxp3<sup>+</sup> convertidas (Adalid-Peralta *et al.*, 2011).

A IL 10 está envolvida no aumento e manutenção das células Tregs. O papel desta interleucina na indução regulatória das células T, provavelmente, está envolvido em vários eventos: nas APC, a IL 10 reduz a apresentação de antigénios através do impedimento da ligação péptido-MHC II; reduz a expressão de moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86; e destabiliza o mRNA de citocinas.

Em relação ao TGF-  $\beta$ 1, a sua presença parece ser necessária na indução das Tregs acompanhada por um aumento na expressão de FoxP3 (Adalid-Peralta *et al.*, 2011).

Este tipo celular, nos receptores de transplantes, pode ser encontrado, portanto, no tecido linfóide do receptor, mas também no local do enxerto. As células Tregs reconhecem as moléculas HLA do dador através da via indirecta de alo-reconhecimento (Figura 7). Depois da transplantação, a presença continuada de aloantigénios provenientes do enxerto, pode promover, portanto, a geração de células Tregs, o que torna o enxerto por si só crucial para a manutenção da tolerância (Wood e Sakaguchi, 2003).



**Figura 7.** Reconhecimento dos aloantígenos pelas células Tregs e a sua acção imunomoduladora. As células Tregs manifestam o seu potencial regulador, quando células T específicas para aloantígenos respondem através da via directa ou indirecta de alo-reconhecimento. A actividade funcional das células Tregs parece estar dependente de moléculas associadas a células como CTLA4, assim como, a mediadores solúveis como a IL 10 e o TGF-β. (Fonte: Wood, Kathryn and Sakaguchi, Shimon. *Regulatory T cells in transplantation tolerance*. Nature reviews Immunology 3, 199 – 210 (2003))

Konieczny *et al* demonstraram que a IL 2 e o IFN-γ são necessários para a sobrevivência do aloenxerto a longo prazo, o que indica que estas citocinas possam ser, igualmente, requeridas para o desenvolvimento de células Tregs específicas para os aloantígenos a nível periférico (Konieczny *et al.*, 1998).

Os inibidores de calcineurina, como iremos ver mais à frente, tais como, Ciclosporina e Tacrolimus, fazem parte de um cocktail de fármacos imunossuppressores, que bloqueiam a transcrição do gene que codifica a IL 2, de forma a prevenir a rejeição do enxerto. Contudo, ao inibir a secreção de IL 2, a sobrevivência do aloenxerto a longo prazo estará comprometida, uma vez que, a sinalização pela IL 2 é exigida para a função das células Tregs (Wood e Sakaguchi, 2003).

CTLA4, como já foi referido, é um importante regulador negativo da função das células T, mas está, também, implicado no mecanismo de acção das Células Tregs, quer para a população dita natural quer para a população induzida.

Em resumo, as células Tregs exercem a sua acção supressora na proliferação e activação de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> via contacto célula-célula, e secreção de citocinas como TGF-β e IL 10 (Wood e Sakaguchi, 2003).

### **1.3.4 Acomodação**

Acomodação refere-se à condição, na qual o transplante apresenta pequenos ou nenhuns danos e a sua função normal, apesar da presença de anticorpos anti-dador na circulação do receptor. No fundo, a acomodação refere-se à resistência adquirida do enxerto ao dano humoral (Chang e Platt, 2009; Thaunat, 2012).

Os mecanismos que dão origem à acomodação ainda permanecem desconhecidos, mas a expressão de genes protectores do endotélio, incluindo A20, Bcl-2, Bcl-xL, assim como, da Hemo-oxigenase (HO-1) é importante para o desenvolvimento e manutenção da acomodação.

Este processo de acomodação foi descrito pela primeira vez, a partir de observações resultantes de um transplante renal onde existia incompatibilidade ABO. Não existindo dúvidas, actualmente, que a acomodação ocorre em transplantes incompatíveis no sistema ABO, em relação aos anticorpos anti-HLA ainda existe alguma controvérsia.

Por fim, também, se sugere que da acomodação podem incorrer desvantagens biológicas na forma de alterações no metabolismo celular ou perda da função. Portanto, as vias e produtos associados à acomodação podem proteger contra danos humorais agudos mas podem contribuir para a rejeição crónica (Thaunat, 2012).

### **1.3.5 Células B**

Os mecanismos associados ao papel regulador exercido pelas células B estarão associados à IL 10, através da supressão directa da diferenciação de células T, promovendo o desenvolvimento de células Tregs e restringindo as funções das células dendríticas.

Apesar da importância da regulação das células B na transplantação de órgãos sólidos, ainda permanece por esclarecer de forma mais concreta o seu envolvimento. Foi demonstrado que receptores de transplante renal operacionalmente tolerantes, isto é, pacientes com função do enxerto renal estável, na ausência de imunossupressão por mais de um ano, são caracterizados por um aumento da expressão de genes envolvidos na diferenciação das células B, uma sobre-regulação de CD20 nas células do sedimento

urinário e um elevado número de células B naïve e transicionais no sangue periférico (Sagoo *et al.*, 2010; Newell *et al.*, 2010).

#### **1.4. Imunossupressão**

O actual sucesso da transplantação de órgãos está, em grande parte, associado aos avanços da terapia imunossupressora e muito poucos aloenxertos são perdidos devido a rejeições agudas (Taylor *et al.*, 2005).

A estimulação imunológica é um processo complexo com vários passos e, por isso, a prevenção da activação da resposta imune contra células estranhas pode ser conseguida através de métodos não-específicos (redução do número total de linfócitos) ou métodos específicos (bloqueio específico de vias da resposta linfocitária). No entanto, a terapêutica imunossupressora deve ser contrabalançada com as consequências indesejadas de imunodeficiência, como a infecção e cancro.

Adicionalmente, todos os fármacos imunossupressores possuem uma toxicidade não imune relacionada com o tipo e mecanismo de acção. O objectivo no acompanhamento a longo prazo das pessoas transplantadas é maximizar a sobrevivência do enxerto e minimizar a sobre-imunossupressão e a toxicidade dos fármacos (Wallace e Kingsmore, 2006).

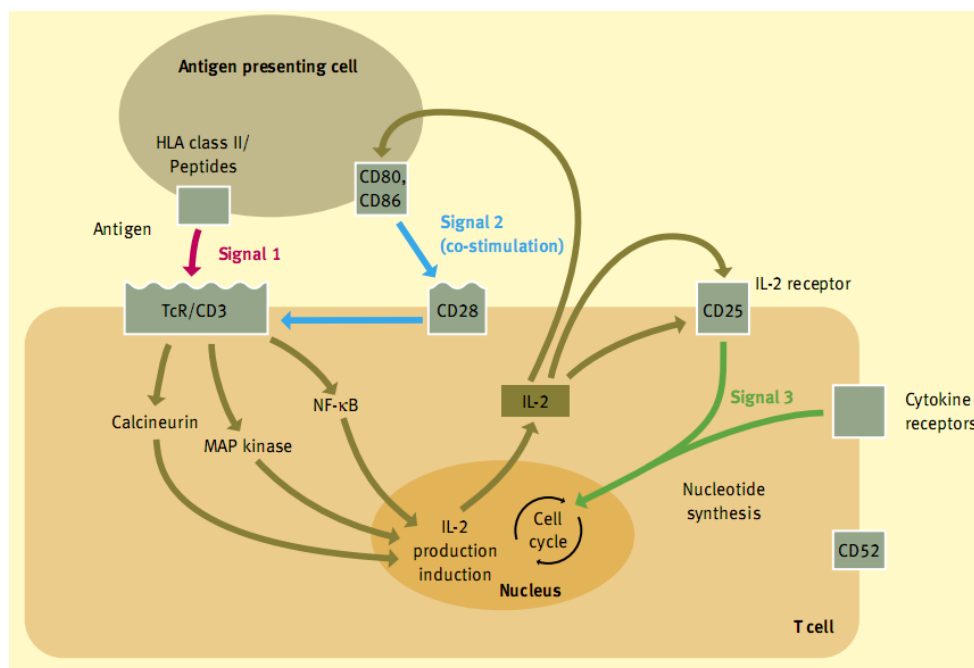
##### **1.4.1. Modelo dos 3 sinais da resposta aloimune**

Para uma melhor compreensão dos mecanismos de acção dos agentes imunossupressores, segue-se uma breve revisão da sequência de sinais para a activação e proliferação das células T.

A interacção do antigénio à superfície das APCs (células dendríticas) com o complexo TCR/ CD3 constitui o *senal 1*. Esta interacção é altamente específica, mas de baixa afinidade e, portanto, necessita de co-estimulação, como já foi referido anteriormente. O *senal 2* é constituído pela conexão dos ligandos CD80 e CD86 da APC com o receptor CD28 da célula T (Figura 8).

Os *senais 1 e 2* activam 3 vias de condução de sinais: a via cálcio-calcineurina; a via “ras mitogen-activated protein (MAP) Kinase” e a via do “nuclear factor-kappa B” (NF-κB). Estas três vias activam factores de transcrição, desencadeando a expressão de várias moléculas, incluindo a IL 2, IL 15 e CD25 (Figura 8).

Um *terceiro sinal* será a activação de uma segunda via, a via “target of rapamycin” pela IL 2 e outras citocinas, a qual conduzirá à proliferação celular (Figura 8) (Wallace e Kingsmore, 2006).



**Figura 8.** Activação das células T descrita por uma sequência de três sinais. A interacção do antígeno à superfície das APCs com o complexo TCR/ CD3 constitui o *signal 1*. Esta interacção é altamente específica, mas de baixa afinidade e, portanto, necessita de co-estimulação. O *signal 2* é constituído pela conexão dos ligandos CD80 e CD86 das APCs com o receptor CD28 da célula T. Os *signals 1* e *2* activam 3 vias de condução de sinais: a via cálcio-calcineurina; a via “ras mitogen-activated protein (MAP) Kinase” e a via do “nuclear factor-kappa B” (NF-κB). Estas três vias activam factores de transcrição, desencadeando a expressão de várias moléculas, incluindo a IL-2, IL-15 e CD25. O *terceiro sinal* será a activação de uma segunda via, a via “target of rapamycin” pela IL-2 e outras citocinas, a qual conduzirá à proliferação celular (Fonte: Wallace, Catherine J. and Kingsmore, David B. *Transplantation and immunosuppressive therapy*. Anaesthesia and Intensive Care Medicine 7:6, 196 – 199 (2006)).

### 1.4.2. Classificação dos fármacos imunossupressores

Os agentes imunossupressores usados podem ser divididos em três grupos: Corticosteróides (*e.g.*; Prednisolona); “Small-molecule drugs” (*e.g.*; inibidores de calcineurina; inibidores da via “target of rapamycin”; anti-metabolitos); e “Protein drugs” (*e.g.*; anticorpos) (Wallace e Kingsmore, 2006).

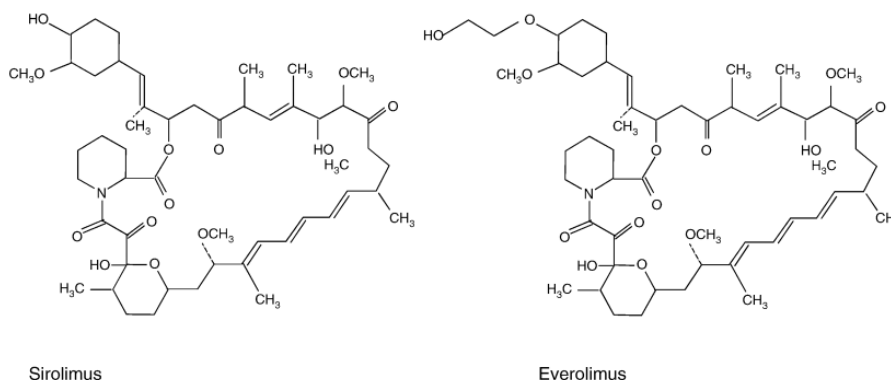
Apesar do uso destes três grupos de fármacos imunossupressores estar associado a uma terapêutica imunossupressora após transplante, irei descrever, apenas, o

mecanismo de acção dos imunossuppressores mais utilizados e, também, no fundo, os de maior relevância na realização deste trabalho.

#### 1.4.2.1. “Small-molecule drugs”

##### 1.4.2.1.1. Inibidores da via “target of rapamycin”: Sirolimus e Everolimus

Sirolimus (SRL) e Everolimus (EVL) pertencem ao grupo dos agentes imunossuppressores denominados inibidores de “mammalian target of rapamycin” (mTOR). Ambos são lactonas macrocíclicas, onde Sirolimus aparece naturalmente como produto da fermentação por *Streptomyces hygroscopicus*, enquanto Everolimus representa uma modificação química de Sirolimus de modo a aumentar a absorção (Figura 12) (Taylor *et al.*, 2005; Halloran, 2004).



**Figura 9.** Representação da estrutura química de Sirolimus e Everolimus (Fonte: Taylor, Anna L., Watson, Christopher J. E. and Bradley, J. Andrew. *Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: mechanisms of action and therapeutic efficacy*. Critical reviews in Oncology/Hematology 56, 23 – 46 (2005)).

Sirolimus e Everolimus ligam-se a uma imunofilina intracelular de 12 kDa, a FKBP12 (FK506 binding protein), mas não inibem a actividade da calcineurina. Os complexos SRL/ FKBP12 e EVL/FKBP12 são inibidores altamente específicos do mTOR; mTOR é uma serina/treonina cinase envolvida na via de sinalização da Fosfatidilinositol 3-cinase (P12K)/AKT (Taylor *et al.*, 2005).

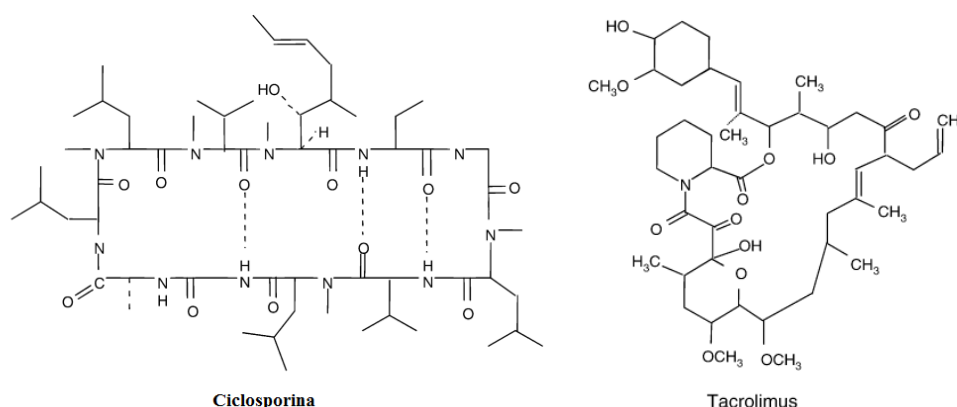
A inibição do mTOR tem um efeito profundo na via de sinalização celular requerida para a progressão do ciclo celular e proliferação celular. É bloqueada a activação das células T, através da travagem na progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S.

Os efeitos secundários associados ao uso destes fármacos estão distribuídos por várias categorias: metabólicos, hematológicos, dermatológicos e efeitos relacionados com a inibição do factor de crescimento (Taylor *et al.*, 2005).

#### 1.4.2.1.2. Inibidores de Calcineurina: Ciclosporina e Tacrolimus

A Ciclosporina (CsA) e o Tacrolimus (FK506) são inibidores de calcineurina, sendo os principais fármacos imunossuppressores usados em receptores de órgãos transplantados (Masuda e Inui, 2006).

A CsA apresenta uma estrutura cíclica hidrofóbica composta por 11 aminoácidos naturalmente sintetizada por *Tolypocladium inflatum*. O FK506 é uma macromolécula resultante da fermentação por *Streptomyces tsukubaensis* (Figura 13) (Halloran, 2004).



**Figura 10.** Representação da estrutura química dos inibidores de calcineurina, Ciclosporina e Tacrolimus (Fonte: Taylor, Anna L., Watson, Christopher J. E. and Bradley, J. Andrew. *Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: mechanisms of action and therapeutic efficacy*. Critical reviews in Oncology/Hematology 56, 23 – 46 (2005)).

A interação entre o TCR com o MHC/ péptido do dador normalmente desencadeia uma via de sinalização intracelular dependente de cálcio que resulta na activação da calcineurina, a qual é uma fosfatase dependente de cálcio/ calmodulina. A activação da calcineurina é crucial para a activação e proliferação das células T (Taylor *et al.*, 2005).

Em consequência da activação da calcineurina, a sua actividade de fosfatase vai permitir a desfosforilação do NFAT (“Nuclear factor activated T-cells”) conduzindo à sua translocação para o interior do núcleo, onde aumenta a ligação de factores de transcrição de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias como IL 2, IL 3, IL 4, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .

Os inibidores de calcineurina (CNIs) depois de entrarem para o citoplasma, formam complexos com as imunofilinas aí presentes. A CsA liga-se a ciclofilinas e o FK506 liga-se à FKBP12. Os complexos CNI-imunofilina inibem a actividade da calcineurina, bloqueando a translocação nuclear do NFAT e a transcrição de genes que codificam citocinas.

Em suma, a presença dos CNIs bloqueia a produção de citocinas como a IL 2 e inibe a activação e proliferação das células T (Taylor *et al.*, 2005).

Em relação a efeitos secundários, ambos os fármacos estão associados a nefrotoxicidade, sendo este um dos efeitos secundários mais relevantes, particularmente, depois de um transplante de rim. Isto acontece devido à vasoconstrição da arteríola aferente, com conseqüente redução do fluxo sanguíneo renal e taxa de filtração glomerular. Estas alterações são reversíveis com a descontinuação da administração de CNIs.

Em estudos recentes, sugere-se que o efeito nefrotóxico seja menos acentuado no caso do FK506.

Também, a neurotoxicidade é um efeito secundário associado ao uso de CNIs, sendo mais comum com FK506 do que CsA, assim como a diabetes e hiperlipidémia (Taylor *et al.*, 2005).

### **1.4.3. Farmacogenética**

Todos os dias, o uso clínico de imunossuppressores é dificultado pelo facto da maioria dos fármacos possuírem uma farmacocinética variável entre pacientes. Mas, acima de tudo, e como já foi referido, anteriormente, os fármacos imunossuppressores apresentam uma elevada toxicidade, provocando, na maioria dos pacientes, efeitos secundários.

E, como tal, o principal objectivo dos clínicos é individualizar a terapia imunossupressora de modo a otimizar o balanço entre a eficácia e a toxicidade associada ao fármaco.

Como já foi dito, a resposta individual dos receptores de órgãos transplantados a imunossuppressores difere e essas diferenças podem dever-se a vários factores como a função hepática, os níveis hormonais, a farmacocinética de interacções fármaco-fármaco, dieta e variações genéticas.



Durante as últimas décadas, o desenvolvimento da farmacogenética aplicada à transplantação tem-se focado em enzimas metabolizadoras de fármacos e transportadores.

A principal contribuição da farmacogenética estará no facto de se fazer uma previsão da dose inicial do fármaco a tomar, aumentando as possibilidades de uma exposição adequada, logo na fase inicial da terapia (Masuda e Inui, 2006; Shuker *et al.*, 2011; Felipe *et al.*, 2009).

#### **1.4.3.1. Transporte e metabolismo de CsA, FK506, SRL, EVL**

Ciclosporina, Tacrolimus, Sirolimus e Everolimus são substratos do transportador de permeabilidade glicoproteína-P (P-gp) e das enzimas metabólicas do citocromo P450 do subgrupo 3A (CYP3A). Os polimorfismos genéticos da P-gp e CYP3A podem explicar, em parte, a variabilidade das concentrações dos fármacos (Felipe *et al.*, 2009).

A P-gp possui um papel central na absorção e distribuição destes fármacos no organismo, actua como uma bomba de efluxo transmembranar envolvida na exportação dependente de energia de xenobióticos de dentro para fora da membrana plasmática.

A P-gp é constitutivamente expressa e ancorada na bicamada lipídica das membranas celulares de várias células. Fisiologicamente, a P-gp é expressa no fígado, no pâncreas, na superfície apical de enterócitos maduros do intestino delgado e, também, em linfócitos (Shuker *et al.*, 2011; Dean *et al.*, 2001).

A P-gp é um produto do gene “Multidrug resistance” (*MDR1*), o qual, actualmente, é designado por “Adenosine Triphosphate binding cassette B1” (*ABCB1*). Nos últimos 10 anos, mais de 50 “Single-nucleotide polymorphisms” (SNPs) foram identificados no gene *ABCB1*. Os SNPs nas posições 1236 (exão 12), 2677 (exão 21) e 3435 (exão 26) são os que têm merecido maior atenção por parte dos investigadores. Os SNPs nas posições 1236 e 3435 não se traduzem em alterações na sequência de aminoácidos (Hoffmeyer *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005; Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007).

As isoenzimas do citocromo P450 (CYPs) pertencem a uma superfamília de enzimas hemoproteicas que se encontram na membrana do retículo endoplasmático. Estas enzimas catalisam o metabolismo de moléculas, estruturalmente diversas, exógenas e endógenas, e as várias reacções por elas catabolizadas têm como fim tornar as moléculas mais hidrofílicas, prontas para serem excretadas (Kalra, 2007).

Os genes que codificam as diferentes isoformas de CYP3A estão localizados no cromossoma 7 (7q21). Nos adultos, as principais isoformas são CYP3A4 (fígado, colon e pâncreas) e CYP3A5 (intestino delgado e estômago) (Felipe *et al.*, 2009).

Vários SNPs já foram identificados para o gene *CYP3A5*. O polimorfismo mais frequente e funcional consiste na transição de Adenina para uma Guanina na posição 6986, no intrão 3 (*CYP3A5\*3*), resultante num mRNA aberrante e numa proteína CYP3A5 truncada (Kuehl *et al.*, 2001).

## **1.5. Expressão génica**

Embora, os bons resultados de transplantes renais a curto prazo tenham aumentado, uma parte substancial desses transplantados desenvolvem uma progressiva disfunção do enxerto (Joosten *et al.*, 2005).

Actualmente, os métodos de diagnóstico de dano do enxerto implicam a realização de biópsias, as quais são um método invasivo, e detectam as alterações patológicas num estado avançado e, frequentemente, irreversível. Assim, o uso de metodologias mais sensíveis e específicas baseadas no perfil transcripcional e proteómico podem constituir um dos pontos-chave para detectar e diferenciar, de um modo não-invasivo, estados precoces de danos no enxerto (Roedder *et al.*, 2011).

No caso de transplantados renais, o acesso fácil e, acima de tudo, de uma forma não-invasiva, à urina, a qual constitui um bom indicador do que se passa no rim, tem concentrado as atenções de inúmeros investigadores, nomeadamente, em análises de expressão génica. Também, o recurso à expressão génica em leucócitos do sangue periférico pode ser considerado um método não-invasivo.

Relativamente, à expressão génica em sangue periférico pode ser feita tendo em conta duas perspectivas, a expressão ao nível das células em sangue total e em células separadas através de “Cell Sorting”.

### **1.5.1. Citocinas**

As citocinas são proteínas solúveis, de baixo peso molecular, produzidas geralmente, em resposta a estímulos antigénicos, e que funcionam como mensageiro químico para a regulação do sistema imune adaptativo e inato. As citocinas ligam-se a

receptores específicos na membrana das células-alvo, desencadeando vias de transdução do sinal que alteram a expressão de genes nas células-alvo.

Algumas citocinas são designadas por interleucinas (IL), pois são produzidas por leucócitos e actuam noutros leucócitos (Pereira *et al.*, 2009).

Na tabela I estão representadas as citocinas, cuja análise da expressão génica terá relevância no contexto deste trabalho, e respectivas funções, assim como, as principais células que as segregam.

### **1.5.1.1. Quimiocinas**

Outro subgrupo das citocinas que tem ganho alguma proeminência é o das quimiocinas, que apresentam um papel fulcral na fisiologia leucocitária, controlando o tráfego basal e inflamatório. A designação quimiocina provém da capacidade de exercer quimiotaxia para leucócitos e outras células inflamatórias (Kuby *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2009).

As quimiocinas possuem na sua constituição 4 resíduos conservados de cisteína e com base na posição de dois desses resíduos, as quimiocinas são classificadas em dois subgrupos, o subgrupo C-C, no qual as cisteínas são contíguas; e o subgrupo C-X-C, no qual as cisteínas são separadas por um outro aminoácido (Kuby *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2009).

As quimiocinas CXC exibem propriedades quimiotácticas direccionadas para neutrófilos e linfócitos (Romagnani e Crescioli, 2012).

Neste trabalho, as quimiocinas CXCL10 e CXCL9 são de grande interesse. CXCL10 exerce a sua função quimiotáctica para várias células do sistema imunitário, como células Th1 activadas, células NK, células dendríticas e macrófagos. Esta quimiocina é segregada por variados tipos celulares quer do sistema imune (leucócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos) e quer por células não-imunes (epitelial, endotelial e queratinócitos) (Romagnani e Crescioli, 2012).

A quimiocina CXCL10 partilha a propriedade de ser induzida por IFN- $\gamma$  com as quimiocinas CXCL9 e CXCL11. Estas quimiocinas exercem a sua acção biológica através da ligação ao receptor CXCR3 (Romagnani e Crescioli, 2012).

Em suma, as funções destas quimiocinas estão associadas a processos fisiológicos de maturação e tráfego das células imunes. Regulam, também, processos inflamatórios através da indução, manutenção e amplificação de reacções inflamatórias.

**Tabela I.** Alvos, efeitos e células secretoras das citocinas cuja análise da expressão génica será relevante para este trabalho.

<b>Citocinas</b>	<b>Secreção</b>	<b>Alvos e efeitos</b>
<b>IL 2</b>	Células T	Proliferação das células T. <sup>1</sup> Activação e proliferação das células NK. <sup>1</sup> Proliferação das células B. <sup>1</sup>
<b>IL 12</b>	Macrófagos, células dendríticas	Influenciar a imunidade adaptativa (promove as células Th1). <sup>1</sup> As células NK constituem um dos seus alvos. <sup>1</sup>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Células Th1, células CD8 <sup>+</sup> , células NK	Activação de macrófagos. <sup>1</sup> Aumento da expressão de moléculas MHC classe I e classe II. <sup>1</sup> Aumento da apresentação de antígenos. <sup>1</sup>
<b>IL 4</b>	Células Th2, células B, células estromais	Citocina que induz a diferenciação das células T helper naíve em células Th2. <sup>1</sup> Sub-regulação da produção de IL12 derivada de macrófagos e inibição da diferenciação de células Th1. <sup>2</sup> Efeito inibitório na expressão e libertação de citocinas pró-inflamatórias. <sup>2</sup>
<b>IL 6</b>	Células T, células B, macrófagos	Possui propriedades pró e anti-inflamatórias. <sup>2</sup> Inibição da produção de TNF e IL1 pelos macrófagos. <sup>2</sup> Proliferação e secreção de anticorpos. <sup>1</sup>
<b>IL 10</b>	Monócitos/Macrófagos, células Th2; células B	Inibição da produção de citocinas por monócitos/macrófagos e neutrófilos. <sup>2</sup> Inibição das respostas do tipo Th1. <sup>2</sup>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Células T, macrófagos e outros tipos celulares	Inibição da proliferação e das funções efectoras das células T. <sup>1</sup> Inibição da proliferação de células B. <sup>1</sup> Inibição dos macrófagos. <sup>1</sup>

**Legenda:** 1 – Fonte: Kuby *et al.*, 2003; 2 – Fonte: Opal e DePalo, 2000.

Nas tabelas II e III são feitas as descrições dos restantes genes, cujo estudo da expressão génica terá relevância no contexto deste trabalho.

**Tabela II.** Descrição de genes cuja análise de expressão génica será relevante no contexto deste trabalho.

	<b>Descrição</b>
<b>CD79b</b>	Proteína de membrana que forma um heterodímero com a molécula CD79a. Juntos com a imunoglobulina membranar de superfície formam o complexo receptor de antígenos das células B (BCR). <sup>3</sup>
<b>TCL1A</b>	Proteína envolvida na fosforilação e activação de proteínas AKT, que promovem a translocação nuclear do AKT1. Aumenta a proliferação celular, estabiliza o potencial membranar mitocondrial e promove a sobrevivência celular. A expressão deste gene é mais elevada nas células B naïve do que nas células B de memória. A sobreexpressão de TCL1A prolonga a sobrevivência das células B naïve. <sup>3</sup>
<b>SH2D1B</b>	Domínio adaptador SH2 singular que se liga a resíduos específicos de tirosina da cauda citoplasmática da molécula de sinalização de activação linfocítica (SLAM) e receptores relacionados. Sinaliza a jusante do CD84, que é regulado positivamente na maioria das células B de memória, induzindo a adesão homotípica de linfócitos B. As células B estimuladas sofrem eventos apoptóticos precoces na presença de SH2D1B. <sup>3</sup>
<b>MS4A1</b>	Específica dos linfócitos B, é uma molécula da superfície celular envolvida na activação das células B e diferenciação. <sup>3</sup>
<b>HLA-DRB1</b>	Molécula HLA classe II presente na superfície das APCs.

**Legenda:** 3 – Fonte: Sago *et al.*, 2010.

**Tabela III.** Descrição de genes cuja análise de expressão génica será relevante no contexto deste trabalho (Cont.).

	<b>Descrição</b>
<b><math>\alpha</math>-1,2-manosidase</b>	Enzima envolvida na glicosilação de proteínas. A <i>N</i> -glicosilação de proteínas da superfície de células T pode ser importante para a regulação negativa da activação de células T. Além disso, a expressão elevada de $\alpha$ -1,2-manosidase no infiltrado de células T no enxerto, em enxertos com sobrevida a longo prazo, pode ser um importante mecanismo para a atenuação da resposta de células T alo-reactivas. <sup>4</sup>

(Continua na página seguinte)

<b>FoxP3</b>	<p>FoxP3 (Forkhead box P3) é um factor de transcrição, que é expresso pelas células Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no timo e na periferia.</p> <p>A expressão de FoxP3 não pode ser induzida em células T naïve, sendo um marcador específico para as células Tregs.<sup>5</sup></p>
<b>Perforina e Granzima B</b>	<p>As células T CD8<sup>+</sup> segregam grânulos contendo Perforina e Granzima B.</p> <p>A Perforina é uma proteína lítica, que sofre polimerização na presença de Ca<sup>2+</sup> e promove a formação de poros na membrana da célula-alvo. Assim, permite a entrada de Granzima B na célula e os poros induzem, também, alterações no gradiente osmótico celular, o qual permite a lise da célula-alvo.</p> <p>A Granzima B pertence à família das proteases serínicas; quando está presente no citoplasma da célula-alvo, promove uma cascata de reacções activadas por nucleases que causam a fragmentação do DNA. A células-alvo sofre apoptose.<sup>6</sup></p>
<b>FAS-L</b>	<p>FAS é uma glicoproteína transmembranar e é expressa na membrana da célula-alvo.</p> <p>FAS-L é uma proteína transmembranar do tipo II e é expressa nos linfócitos T activados. Esta proteína interage com FAS, activando uma cascata de reacções ao nível da maquinaria enzimática da célula-alvo, que culmina com a fragmentação do DNA e morte celular por apoptose.<sup>6</sup></p>
<b>CTLA4</b>	<p>Parece estar funcionalmente associado com as células Tregs, mas a sua expressão não é específica desta população celular.<sup>5</sup></p>
<b>GATA3</b>	<p>Factor de transcrição da linhagem de células Th2.<sup>7</sup></p>

**Legenda:** 4 – Fonte: Jiang, 2008; 5 – Fonte: Wood e Sakaguchi, 2003; 6 – Fonte: Leitão *et al.*, 2006; 7 – Fonte: Moraes-Vieira *et al.*, 2012.

**Capítulo 2.**

**Objetivos**

## 2.1. Objectivos

O objectivo geral do trabalho consistiu em efectuar uma avaliação genética, genómica, celular e humoral de transplantados renais com função do enxerto estável há mais de dez anos e transplantados com rejeição/ disfunção crónica do enxerto.

A elaboração dessa caracterização foi dividida por vários pontos:

- Avaliação da influência das incompatibilidades HLA;
- Pesquisa de anticorpos;
- Perfil farmacogenético (metabolização e transporte de fármacos imunossupressores);
- Avaliação da existência de quimerismo nas células do sedimento urinário e da sua expressão génica;
- Avaliação da expressão génica em células do sangue total;
- Avaliação da expressão génica em populações celulares separadas a partir de sangue periférico.

Assim, através da realização desta caracterização pretendia-se encontrar algum aspecto diferencial entre os grupos, que pudesse constituir um potencial alvo de estudo, de forma a permitir a monitorização da evolução do transplante sem recorrer a técnicas invasivas e, acima de tudo, avaliar o impacto dessas características na longevidade do enxerto.



## **Capítulo 3.**

## **Materiais e métodos**

### 3.1. População em estudo

Para a realização deste trabalho foram recolhidas, amostras de urina e sangue, de dois grupos de transplantados renais constituídos por doentes com função renal estável há mais de dez anos (Grupo 1) e transplantados aos quais foi diagnosticada rejeição/disfunção crónica do enxerto (Grupo 2) (Tabela IV). Ambos os grupos são avaliados em consulta periódica pela Unidade de Transplantação Renal do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra (CHUC) e a sua distribuição pelos dois grupos foi feita com base na quantificação de creatinina no soro.

Foram colhidas entre Dezembro de 2011 e Abril de 2012, 48 amostras de sangue e urina dos transplantados renais com função do enxerto estável, e 24 amostras de sangue e urina dos transplantados com disfunção crónica. A colheita das amostras foi conseguida através da colaboração com a Unidade de Transplantação Renal – CHUC.

**Tabela IV.** Resumo dos dados dos doentes estudados.

<b>Dados</b>	<b>Valores - Grupo 1</b>	<b>Valores - Grupo 2</b>
<b>Idade</b> (anos; média ± dp)	59,27 ± 10,97	52,96 ± 11,97
<b>Género</b> (M/F)	29/19	19/5
<b>Tempo de transplante</b> (anos; média ± dp)	18 ± 4	8 ± 6
<b>Idade do dador</b> (anos; média ± dp)	23,27 ± 8,76	46,92 ± 16,47
<b>Imunossupressão inicial</b> CsA/ FK506 (mg/Kg)	CsA - 0,15 FK506 - 8	CsA - 0,15 FK506 - 8
<b>Tempo de isquémia fria</b> (horas; média)	19	20
<b>Creatinina</b> (mg/ dL; média ± dp)	0,93 ± 0,13	2,52 ± 0,68

**Legenda:** dp – desvio-padrão; mg – miligramas; kg – quilogramas; dL – decilitros; M – masculino; F – feminino.

Foram utilizados dois grupos controlo, um para avaliar a expressão génica no sangue total e um segundo grupo para a expressão génica nas fracções celulares. Os

grupos controlo são constituídos por pessoas saudáveis que não realizaram qualquer tipo de transplante.

Do primeiro grupo fazem parte 14 pessoas, 7 do género feminino e 7 do masculino com uma média de idades de 51,57 anos e desvio-padrão de 8,17. O segundo grupo tem na sua constituição 10 pessoas, 5 do género feminino e 5 do género masculino, cuja média de idades é 49,7 anos com um desvio-padrão de 7,17.

## **3.2. Processamento das amostras de sangue periférico**

### **3.2.1. Extracção de DNA das amostras**

O sangue foi colhido para Tubos *VACUETTE*<sup>®</sup> *K<sub>3</sub>EDTA* (Greiner Bio-One), pois com a quelatação dos iões de  $\text{Ca}^{2+}$ , a cascata de coagulação é bloqueada.

Retiraram-se 200  $\mu\text{L}$  da amostra de sangue para proceder à extracção de DNA a partir dos leucócitos presentes, recorrendo-se à utilização do *MagAttract*<sup>®</sup> *DNA Blood Midi M48 kit* (Qiagen<sup>®</sup>).

A base do procedimento de extracção deste kit está na ligação do DNA a partículas magnéticas revestidas com sílica, na presença de um sal caotrópico. Os passos constituintes deste processo de extracção são: a lise das células através do Tampão ML, seguida da adição, às amostras, da suspensão *MagAttract B* (contém as partículas magnéticas), com conseqüente ligação do DNA às partículas magnéticas. Na presença de um magnete decorre, portanto, a separação magnética, sendo efectuados passos de lavagem e, por fim, a eluição do DNA foi feita em 300  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-EDTA (TE).

Os tubos contendo o DNA das amostras, com uma quantidade entre os 3,9 e 6,2  $\mu\text{g}$  foram guardados a 4 °C.

### **3.2.2. Separação de células activadas por fluorescência (FACS)**

O restante sangue colhido para Tubos *Vacurette*<sup>®</sup> *K<sub>3</sub>EDTA* (Greiner Bio-One), foi utilizado para a separação celular de 9 fracções celulares: células B de memória ( $\text{CD}19^+\text{CD}27^+$ ) e células B naïve ( $\text{CD}19^+\text{CD}27^-$ ), células Tregs ( $\text{CD}4^+\text{CD}25^+$ ), células T  $\text{CD}4^+$  naïve ( $\text{CD}3^+\text{CD}4^+\text{CD}45\text{RA}^+$ ) e memória ( $\text{CD}3^+\text{CD}4^+\text{CD}45\text{RA}^-$ ), células T  $\text{CD}8^+$  naïve ( $\text{CD}3^+\text{CD}8^+\text{CD}45\text{RA}^+$ ), memória ( $\text{CD}3^+\text{CD}8^+\text{CD}45\text{RA}^-$ ) e efectoras, e células NK ( $\text{CD}3^-$ ).

Para a separação celular recorreu-se à técnica de citometria de fluxo, mais concretamente, à separação de células activadas por fluorescência (FACS). Esta técnica mede propriedades físicas (complexidade e tamanho) das células usando a dispersão da luz que ocorre quando sobre elas incide um feixe laser e pela emissão de luz de sondas fluorescentes.

A mistura de células foi colocada na presença de anticorpos monoclonais (mABs) específicos contra proteínas de superfície, sendo que estes anticorpos estavam marcados com fluorocromos diferentes.

Cerca de 3 mL da amostra foram colocados nos tubos, aos quais se adicionaram 10 mL de NH<sub>4</sub>Cl, agitou-se manualmente e foi feita uma incubação de 20 minutos à temperatura ambiente na horizontal. Centrifugou-se durante 5 minutos a 1500 rpm e decantou-se o sobrenadante.

De seguida, adicionaram-se aos tubos os anticorpos monoclonais correspondentes, agitaram-se os tubos no vórtex e incubaram-se 20 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Os mABs usados e respectivos fluorocromos encontram-se listados na tabela V.

Finda a incubação, adicionaram-se 2 mL de PBS 1x a cada um dos tubos, agitaram-se no vórtex e centrifugaram-se durante 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi decantado e o pellet foi ressuspensão em 500 µL de PBS 1x.

A separação celular das populações pretendidas foi feita no citómetro de fluxo/cell sorter FACSaria II (Becton Dickinson, Biosciences), usando o software de aquisição BD FACSDiva v6.1.3.

**Tabela V.** Anticorpos monoclonais e respectivos fluorocromos usados na separação celular.

<b>mABs</b>	<b>Fluorocromos</b>
CD3	PB ( <i>Pacific Blue</i> )
CD8	V500-PO ( <i>Pacific Orange</i> )
CD45RA	FITC ( <i>Fluorescein isothiocyanate</i> )
CD127	PE ( <i>Phycoerythrin</i> )
CD27	PC5 ( <i>Phycoerythrin Cyanine 5</i> )
CD25	PC7 ( <i>Phycoerythrin Cyanine 7</i> )
CD4	APC ( <i>Allophycocyanin</i> )
CD19	H7 ( <i>APC- Cyanine</i> )

Dado o intuito ser a extracção de RNA das fracções celulares, após a sua separação, os tubos foram centrifugados a 5000 rpm durante 5 minutos numa centrífuga de bancada (Eppendorf, Centrífuga 5415R), desprezando-se o sobrenadante e procedendo-se à ressuspensão do pellet em 350  $\mu$ L de *RNeasy Lysis Buffer* (Tampão RLT; Qiagen), ao qual se adiciona, previamente,  $\beta$ -Mercaptoetanol. Após a realização de vórtex com alguma intensidade, os tubos foram guardados a  $-20$  °C.

Quando se trata de RNA, é necessário ter em conta a degradação pelas RNases, as quais são extremamente estáveis e activas. Daí, se ter adicionado ao tampão RLT, o  $\beta$ -Mercaptoetanol, o qual por ser um agente redutor conduz à desnaturação irreversível das RNases, pela quebra das ligações dissulfito destruindo, assim, a conformação nativa da enzima, que é essencial à sua actividade.

### **3.2.3. Extracção de RNA das fracções celulares**

Os tubos contendo as amostras em RLT foram descongelados a 4 °C e sujeitos a vórtex vigoroso, antes da sua centrifugação à velocidade máxima durante 3 minutos numa centrífuga de bancada (Eppendorf, Centrífuga 5415R). Sendo, este passo de centrifugação, o primeiro passo constituinte do protocolo de extracção do *RNeasy*<sup>®</sup> *Micro kit* (Qiagen<sup>®</sup>), recorrendo-se, de seguida, ao protocolo de extracção automatizado no *QIACube* (Qiagen<sup>®</sup>).

Após a centrifugação, transferiu-se o sobrenadante (350  $\mu$ L) para *Eppendorfs* de 2 mL, os quais foram colocados no *QIACube*.

O protocolo de extracção no *QIACube* inicia-se com a adição de etanol a 70% ao lisado e a sua transferência para a coluna *RNeasy MinElute*, onde o RNA ficará imobilizado, seguida de uma breve centrifugação. A adição primeiramente de RW1, com sequente adição de RPE e, por último, de etanol a 80%, constituem os passos de lavagem da membrana da coluna. Finalmente, a eluição do RNA fez-se com 14  $\mu$ L de água livre de RNases para os tubos de 1,5 mL, os quais foram guardados a  $-80$  °C.

### 3.2.4. Processamento e isolamento de RNA total das amostras

O sangue foi colhido para tubos *PAXgene<sup>TM</sup> Blood RNA System* (PreAnalytix, Hombrechtikon, Alemanha), procedendo-se à sua incubação de, pelo menos, duas horas à temperatura ambiente. De seguida, a extracção do RNA total do sangue foi feita recorrendo ao *PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA kit* (PreAnalytix, Hombrechtikon, Alemanha).

Retiraram-se 3 mL do conteúdo dos tubos *PAXgene<sup>TM</sup> Blood RNA System*, após vigoroso vórtex, para tubos *Falcon* de 15 mL e centrifugaram-se durante 10 minutos a 5000g, descartando-se o sobrenadante. Adicionaram-se 4 mL de água livre de Rnases, procedendo-se a uma nova centrifugação nas mesmas condições atrás referidas, num passo de lavagem do sedimento. Os sobrenadantes foram, novamente, decantados e os sedimentos foram ressuspensos em 350 µL de tampão BR1, este volume foi transferido para tubos *Eppendorf* de 2 mL.

Os tubos de 2 mL foram colocados no shaker do equipamento *QIACube* (Qiagen<sup>®</sup>), no qual se executa o protocolo de extracção *PAXgene Blood RNA Part A*. Para a realização deste protocolo, é necessária a preparação prévia de 3 tubos de processamento contendo Proteinase K, uma mistura de incubação de DNase I (DNase I e RDD) e tampão de eluição (BR5), os quais são designados, respectivamente, por A, B e C. O volume final de cada um destes componentes depende do número de amostras que se pretende extrair. De igual modo, são preparados, previamente, os “rotors adapters”, nos quais se coloca na posição 1, a coluna de rotação de RNA (cor-de-rosa), na posição 2, a coluna de rotação do homogeneizador (lilás) e na posição 3, os tubos *Eppendorf* de 1,5 mL devidamente identificados.

Os passos que constituem este protocolo são a adição de proteinase K e tampão de ligação (BR2) com sequente incubação; transferência do material para a coluna de rotação do homogeneizador e adição de etanol 96-100%; de seguida, o produto é colocado na coluna de rotação de RNA, onde ocorre a ligação do RNA total; após lavagem com o tampão de lavagem 1 (BR3), tem lugar a digestão do DNA através da mistura C, seguindo-se uma nova lavagem agora com o tampão de lavagem 2 (BR4). Terminados os passos de lavagem, as colunas de rotação de RNA são transferidas para os tubos *Eppendorf* de 1,5 mL, onde fica o RNA total das amostras, após adição de 80 µL de tampão de eluição (BR5).

Os *Eppendorf* de 1,5 mL, contendo o RNA eluído e que se encontravam nos “rotor adapters”, foram transferidos para o shaker, com a tampa fechada.

Seleccionando-se o protocolo *PAXgene Blood RNA Part B*, que consiste na incubação a 65 °C durante 5 minutos, o RNA extraído é desnaturado, ficando pronto para posteriores aplicações, nomeadamente, síntese de cDNA. Os *Eppendorfs* contendo o RNA foram guardados a – 80 °C.

### **3.2.5. Isolamento de soro das amostras**

O sangue foi colhido para Tubos de Bioquímica – sem preparação (Vacuette<sup>®</sup>, Greiner Bio-One) com gel.

Esses tubos foram submetidos a uma centrifugação de 3000rpm durante 10 minutos (Kubota 5900), permitindo a separação do soro, dos restantes componentes sanguíneos, com o auxílio do gel. O soro foi colocado em tubos *Eppendorf* de 1,5 mL e armazenado a – 80 °C.

### **3.3. Processamento das amostras de urina**

#### **3.3.1. Sedimento urinário**

Pipetaram-se 30 mL de urina colhida para frascos colectores, para tubos de centrífuga e centrifugaram-se a 11.820 rpm durante 15 minutos a 4 °C (Beckman J2-21M/E). Finda a centrifugação, o sobrenadante foi decantado e foi-lhe adicionado 1 mL de PBS, transferindo-se para tubos *Eppendorf* de 2 mL. De seguida, procedeu-se a uma nova centrifugação, desta vez a 9000 rpm durante 7 minutos a 4 °C (Eppendorf, Centrífuga 5415R), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensão em 1 mL de PBS.

Após uma boa homogeneização do sedimento, procedeu-se a uma distribuição do sedimento urinário para dois objectivos distintos, 500 µL de sedimento para extracção de DNA e os restantes 500 µL para extracção de RNA. Assim, os 500 µL de sedimento para extracção de DNA foram colocados em tubos *Eppendorf* de 1,5 mL e guardados a – 20 °C; e os tubos contendo os 500 µL para extracção de RNA foram centrifugados à velocidade máxima durante 1 minuto (Eppendorf, Centrífuga 5415R), desprezou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspensão em 350 µL de tampão RLT com adição de β-Mercaptoetanol e armazenado a – 80 °C.

### **3.3.2. Extração de RNA das células do sedimento urinário**

As amostras foram descongeladas a 4 °C, homogeneizadas e submetidas a centrifugação à velocidade máxima durante 3 minutos (Eppendorf, Centrífuga 5415R). O sobrenadante (350 µL) foi transferido para tubos *Eppendorf* de 2 mL, sendo estes colocados no shaker do equipamento *QIACube* (Qiagen®), para se proceder ao protocolo de extração de RNA através do *RNeasy Mini kit* (Qiagen®), tal como se procedeu para a extração de RNA de células separadas por cell sorter.

Prepararam-se os “rotors adapters”, ficando na posição 1 a coluna *RNeasy spin* e na posição 3, o *Eppendorf* de 1,5 mL.

A eluição do RNA foi feita em 50 µL de água livre de RNases e os tubos foram guardados a – 80 °C.

### **3.3.3. Extração de DNA das células do sedimento urinário**

As amostras foram descongeladas e pipetaram-se 200 µL do sedimento urinário para novos tubos, de modo a proceder à extração de DNA através do *MagAttract® DNA Blood Midi M48 kit* (Qiagen®). Os princípios da extração de DNA deste kit encontram-se expostos no tópico 2.2.1.

É de referir, apenas, que neste caso, o volume de eluição do DNA foi de 75 µL de TE.

## **3.4. Tipagem HLA por Luminex® (LABType® SSO Typing Tests)**

Para se proceder à tipagem HLA de todos os participantes neste estudo, começou-se por amplificar as regiões codificantes dos alelos HLA-A, HLA-B, HLA-C e HLA-DR, usando a reacção de polimerização em cadeia (PCR). Posteriormente, a identificação alélica foi feita recorrendo à hibridização com sondas oligonucleotídicas específicas da sequência (SSO) imobilizadas em microesferas.

As microesferas são partículas de poliestireno, altamente uniformes e são internamente marcadas com quantidades variáveis de fluorocromos vermelho e infravermelho. Cada intensidade de fluorescência única define uma população de

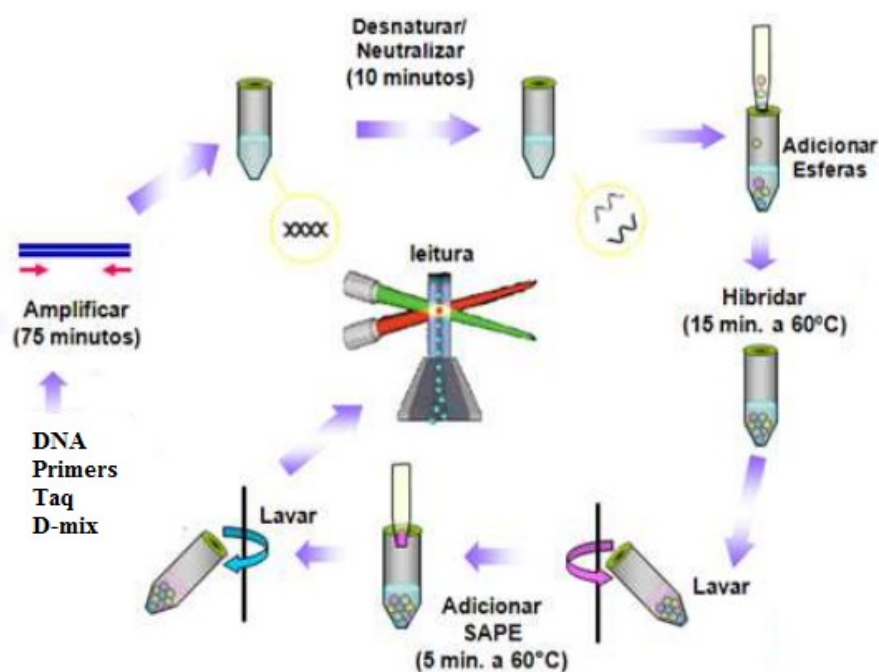


microesferas. A cor fluorescente de cada microesfera é a base para a sua identificação pelo sistema de análise e a sua precisa correlação com a sua respectiva população.

Como as microesferas estão revestidas com sondas oligonucleotídicas, é necessário um repórter, isto é, uma molécula específica de detecção desses analitos, que neste caso, é a r-Ficoeritrina (PE).

Para a leitura das fluorescências recorreu-se ao equipamento LABScan™ 100, o qual está equipado com um processador de sinal digital e dois lasers. O laser *Yttrium-Argon-Germanium* (YAG) de 532 nm que excita a molécula repórter, permitindo a quantificação de analito ligado à microesfera, sendo que após excitação ocorre emissão de luz a 578 nm. E o laser Diodo Vermelho de 635 nm que excita os dois marcadores presentes nas microesferas e estes após excitação emitem luz a 658 e 712 nm.

Na Figura 11 encontram-se esquematizados todos os passos da técnica utilizada para a tipagem HLA por Luminex® (LABType® SSO Typing Tests).



**Figura 11.** Esquema ilustrativo dos passos constituintes da técnica utilizada para tipagem HLA por Luminex® (LABType® SSO Typing Tests).

### 3.4.1. Amplificação dos genes HLA

Para a amplificação dos genes HLA usaram-se os *kits* de amplificação da *One Lambda*<sup>®</sup>, nomeadamente, os primers de amplificação e a D-mix (LABType<sup>®</sup> Primer Sets and D-mix) e a TaqPolimerase (5U/ $\mu$ L) da *ABgene*.

Uma vez feita a Master Mix, esta foi distribuída pelos poços de uma placa de 96 poços e seguiu-se a adição de 1  $\mu$ L de DNA aos 9  $\mu$ L da Master Mix, já selada com uma película, a placa foi colocada no termociclador C1000<sup>™</sup> Thermal Cycler ou Biometra Professional Thermocycler com o programa de amplificação descrito na tabela VI.

**Tabela VI.** Programa de PCR usado na amplificação dos genes HLA.

Passos	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
1	96 °C	03:00	1
2	96 °C	00:20	5
	60 °C	00:20	
	72 °C	00:20	
3	96 °C	00:10	30
	60 °C	00:15	
	72 °C	00:20	
4	72 °C	10:00	1
5	4 °C	$\infty$	1

### 3.4.2. Desnaturação/ Neutralização e Hibridização

Após amplificação, os produtos de PCR biotinizados foram desnaturados e neutralizados, seguindo-se a sua hibridização com uma mistura de esferas (LABType<sup>®</sup> SSO Bead Mixtures) durante 15 minutos a 60 °C. Estas microesferas estão revestidas com sondas oligonucleotídicas específicas de sequências alélicas HLA, existindo, uma mistura de esferas para cada um dos *locus*: *locus* A – RSSOH1A; *locus* B – RSSOH1B; *locus* C – RSSOH1C; *locus* DR – RSSOH2B1.

Uma vez que os produtos de PCR são biotinizados, a sua detecção pode ser feita utilizando Streptavidina estando esta conjugada com r-Ficoeritrina (SAPE).

Passados os 15 minutos, seguiram-se dois passos de lavagem com tampão de lavagem, antes da adição da Solução SAPE 1x (Stock SAPE e Tampão SAPE). Em sequência da adição da solução SAPE 1x foi feita uma nova incubação a 60 °C durante 5 minutos.

Finalizada a incubação, seguiram-se os passos de lavagem e, por fim, adicionaram-se 60 µL de tampão de lavagem a cada poço e transferiram-se para uma placa de ELISA de fundo cônico, estando pronta para ser feita a leitura no equipamento LABScan™ 100.

As leituras de fluorescência foram interpretadas no programa *LabTools* da *OneLambda*®.

### **3.5. Pesquisa de SNPs nos genes *CYP3A5* e *ABCB1***

Com o intuito de avaliar o perfil farmacogenético, procedeu-se à amplificação das sequências de DNA, contendo os SNPs alvo pretendidos, onde os primers usados permitiram flanquear as regiões de interesse, que após terem sido amplificadas, foram submetidas a sequenciação.

A sequenciação tem por base o uso de dideoxinucleótidos (ddNTPs). Os ddNTPs são análogos dos nucleótidos, mas aos quais falta o grupo hidroxilo na posição 3', que é essencial para a formação da ligação fosfodiéster. Portanto, durante a reacção de sequenciação são originados fragmentos truncados no ponto em que os ddNTPs são incorporados.

Assim, com o uso de ddNTPs marcados com fluorescências distintas é possível a identificação do ddNTP presente no terminal 3' de cada produto de sequenciação.

Com recurso à electroforese capilar ocorre a separação das sequências truncadas através do seu peso molecular e como os fragmentos de DNA estão marcados com fluorocromos a sua passagem por um feixe de laser, faz com que os marcadores presentes nos fragmentos emitam fluorescência. Dado que cada ddNTP tem um marcador que emite fluorescência a diferentes comprimentos de onda, quando excitados pelo laser, as quatro bases são passíveis de detecção e distinção.

### 3.5.1. Amplificação das regiões de interesse

Na reacção de amplificação da sequência de interesse, onde se encontrava o SNP que se pretendia estudar no gene *CYP3A5*, mais concretamente a troca de Adenina por Guanina (rs776746), foram usados como *Primer Forward*: 5'- CTT AAC GAA TGC TCT ACT GTC - 3' e como *Primer Reverse*: 5'- ACA CCC AGG AAG CCA GAC T - 3' (Mendes *et al*, 2009) (Tabela VII).

No caso do SNP do gene *ABCB1*, a região contendo a troca da Citosina por Timina (rs1045642), foi flanqueada pelo *Primer Forward*: 5'- TGC TGG TCC TGA AGT TGA AGT TGA TCT GTG AAC-3' e pelo *Primer Reverse*: 5'- ACA TTA GGC AGT GAC TCG ATG AAG GCA-3' (Turolo *et al*, 2010) (Tabela VII).

Os primers (SigmaAldrich®) foram reconstituídos com um determinado volume de água, ficando a uma concentração de 100 µM, procedendo-se a uma electroforese em gel de agarose 2%, de modo a encontrar a concentração adequada para o equilíbrio dos primers.

**Tabela VII.** Sequências dos primers usados na pesquisa de SNPs (*CYP3A5* e *ABCB1*).

Primers	SNPs	Sequências dos primers
<b>CYP3A5 - Forward</b>	6986 A>G	5'- CTT AAC GAA TGC TCT ACT GTC - 3'
<b>CYP3A5 - Reverse</b>	6986 A>G	5'- ACA CCC AGG AAG CCA GAC T - 3'
<b>ABCB1 - Forward</b>	3435 C>T	5'- TGC TGG TCC TGA AGT TGA AGT TGA TCT GTG AAC-3'
<b>ABCB1 - Reverse</b>	3435 C>T	5'- ACA TTA GGC AGT GAC TCG ATG AAG GCA - 3'

Para um volume final de 25 µL na reacção de PCR usou-se: Tampão da GoTaq® Flexi DNA Polymerase 1x (Promega®), cada dNTP a uma concentração final de 1 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM (Promega®), os primers a 0,4 µM e a 0,8 µM para os genes *ABCB1* e *CYP3A5*, respectivamente, 0,04 µg de DNA e 0,875 U da GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega®).

Uma vez preparada a mistura para a reacção de PCR, as tiras de plástico foram colocadas no termociclador GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems) com o programa de PCR descrito na tabela VIII.

**Tabela VIII.** Programa de PCR usado na amplificação das regiões contendo os SNPs dos genes *CYP3A5* e *ABCB1*.

<b>Passos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Nº de ciclos</b>
<b>1</b>	96 °C	05:00	1
<b>2</b>	96 °C	00:30	10
	65 °C	01:00	
<b>3</b>	96 °C	00:30	10
	60 °C	01:00	
<b>4</b>	96 °C	00:30	15
	55 °C	00:30	
	72 °C	01:00	
<b>5</b>	72 °C	07:00	1
<b>6</b>	4 °C	∞	1

### **3.5.2. Purificação dos produtos de PCR com ExoSAP-IT<sup>®</sup>**

Terminada a amplificação, obteve-se o produto de PCR pretendido, mas permanecem na mistura dNTPs e primers que não foram consumidos no decorrer da reacção, que podem interferir na sequenciação. ExoSAP-IT<sup>®</sup> remove esses contaminantes.

ExoSAP-IT<sup>®</sup> tira partido da acção de duas enzimas hidrolíticas, a Exonuclease I e a Fosfatase Alcalina. A Exonuclease I degrada os primers em excesso e as cadeias simples de DNA inespecíficas e a Fosfatase Alcalina remove os dNTPs excedentes na mistura de PCR.

A adição de ExoSAP-IT<sup>®</sup> (3 µL) foi feita directamente ao produto de PCR (20 µL), sendo efectuada a sua incubação a 37 °C durante 15 minutos, passo no qual as enzimas exercem as suas funções, seguindo-se a sua inactivação através da incubação a 80 °C durante 15 minutos.

### 3.5.3. Reacção de sequenciação, purificação e sequenciação

Com a purificação do produto de PCR com ExoSAP-IT<sup>®</sup> finalizada e encontrada a diluição adequada do produto de PCR a usar na reacção de sequenciação, foi preparada a mistura para esta reacção.

Na reacção de sequenciação usaram-se os BigDye<sup>®</sup> Terminator V.1.1. (Applied Biosystems) misturados com a diluição do produto de PCR e os respectivos primers *Forward* e *Reverse* para cada uma das sequências. O programa de PCR, ao qual a mistura foi submetida está descrito na tabela IX.

**Tabela IX.** Programa de PCR usado na reacção de sequenciação.

Passos	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
1	96 °C	00:20	26
	60 °C	02:00	
	4 °C	∞	1

Após a reacção de sequenciação, o produto de PCR foi submetido a um passo de purificação por filtração em gel com a resina Sephadex G50 (GE Healthcare<sup>®</sup>), onde o excesso de terminadores foi removido, pois estes ficaram retidos na resina e só o produto de PCR conseguiu atravessar. Após este passo de purificação, as sequências estavam prontas a ser colocados no Sequenciador 3130 Genetic Analyzer (ABI Prism).

Como programas de análise das sequências foram usados o Sequencing Analysis<sup>®</sup> e o SeqScape<sup>®</sup>.

### 3.6. Pesquisa de quimerismo no sedimento urinário

Os microssatélites, também conhecidos como “Short tandem repeats” (STRs), são *loci* polimórficos de DNA, que contêm sequências repetidas de 2 a 7 nucleótidos. O número de repetições de um determinado *locus* varia, resultando em alelos com comprimentos (bp) que os permitem diferenciar.

Logo, os STRs são marcadores de individualidade, onde cada indivíduo possui alelos específicos.

### 3.6.1. Reacção de amplificação

De modo a proceder à discriminação alélica, ou seja, na tentativa de saber qual a providência das células presentes no sedimento urinário, isto é, qual a percentagem de células do dador e qual a percentagem de células do receptor, recorreu-se à amplificação dos STRs através de 3 sistemas: FES, TH01 e F13 (Tabela X).

**Tabela X.** Sequências dos primers usados na amplificação dos STRs.

<b>Primers</b>	<b>Sequências</b>
FES marcado (D4)	5' - [6FAM]GGG ATT TCC CTA TGG ATT GG - 3'
FES não marcado	5' - GCG AAA GAA TGA GAC TAC AT - 3'
TH01 marcado (D4)	5' - [6FAM]GTG GGC TGA AAA GCT CCC GAT TAT - 3'
TH01 não marcado	5' - GTG ATT CCC ATT GGC CTG TTC CTC - 3'
F13 marcado (D3)	5' - [HEX]ATG CCA TGC AGA TTA GAA A - 3'
F13 não marcado	5' - GAG GTT GCA CTC CAG CCT TT - 3'

Na reacção de amplificação para um volume final de 50  $\mu$ L foi usado: Tampão da GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase 1x (Promega<sup>®</sup>), cada dNTP a uma concentração final de 1 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM (Promega<sup>®</sup>), os primers não marcados a 0,2  $\mu$ M e os primers marcados a 0,01  $\mu$ M (FES), 0,012  $\mu$ M (TH01) e 0,15  $\mu$ M (F13), 0,104  $\mu$ g de DNA e 2,05 U da GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase (Promega<sup>®</sup>). Para a realização das reacções de PCR foi utilizado o termociclador AlfaGene II (Biometra<sup>®</sup>) com o programa de PCR apresentado na tabela XI.

**Tabela XI.** Programa de PCR usado na amplificação dos STRs.

Passos	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
1	96 °C	02:00	1
2	96 °C	01:00	35
	60 °C	01:00	
	72 °C	01:00	
3	4 °C	∞	1

Terminada a amplificação, seguiu-se a preparação da placa de leitura de 96 poços, onde se colocou 20,5 µL de uma mistura contendo 20 µL de formamida e 0,5 µL de standart 400 (Beckman Coulter®) por amostra. Juntou-se, posteriormente, 1 µL do produto de amplificação e cobriu-se com uma gota de óleo mineral cada um dos poços. Paralelamente, preparou-se uma placa com tampão de separação nas filas correspondentes às filas da placa de leitura.

Prontas as duas placas, a de leitura e a do tampão de separação, estas foram colocadas no sequenciador Beckman Coulter CEQ™ 8000 Genetic Analysis System.

Os resultados foram analisados recorrendo ao programa CEQ800, onde foram apresentados na forma de electroforectogramas com indicação, em cada pico, do respectivo peso molecular.

### **3.7. Pesquisa de anticorpos anti-HLA Classe I e Classe II (LABscreen®)**

A detecção de anticorpos anti-HLA no soro foi feita recorrendo ao uso de esferas revestidas com antigénios HLA Classe I e Classe II purificados, onde as esferas possuem características passíveis de aquisição de dados e análise pelo LABScan™ 100.

As amostras de soro foram descongeladas e centrifugadas à velocidade máxima durante 10 minutos (Eppendorf, Centrífuga 5415R). Numa placa ELISA de 96 poços incubou-se o soro (diluído 1:2) com as esferas LABScreen® Mixed (2,5 µL) durante 30 minutos, no escuro e com agitação moderada. Permitindo, assim, a ligação dos possíveis anticorpos presentes no soro aos antigénios das esferas.

Finda a incubação, seguiram-se passos de lavagem com tampão de lavagem 1X. Depois, procedeu-se à adição de R-Ficoeritrina (PE) conjugada com anti-IgG, cujo objectivo era a sua ligação aos anticorpos da amostra de soro que, por sua vez, se



tinham ligado a antígenos presentes na superfície das esferas. À adição do conjugado seguiu-se uma nova incubação no escuro, durante 30 minutos, com agitação moderada, e seguintes passos de lavagem.

Após a última lavagem, foi feita a adição de PBS 1X (80 µL) à temperatura ambiente e a placa foi colocada no LABScan™ 100 para aquisição de dados de fluorescência.

### 3.8. Quantificação relativa de transcritos (mRNA)

#### 3.8.1. PCR de Transcrição Reversa (RT-PCR)

Anteriormente, à análise dos níveis de expressão génica, o RNA necessita de ser transcrito em DNA complementar (cDNA), usando-se para tal, uma transcriptase reversa.

No caso, da transcrição reversa do RNA total (extraído a partir do sangue periférico colhido para os tubos PAXgene®) e do RNA extraído a partir das células do sedimento urinário, foi usado o kit *SuperScript® III* (Invitrogen™).

Assim, para se proceder à síntese de cDNA, adicionou-se ao RNA extraído (< 1 µg) *2X RT Reaction Mix* (10-15µL) e *RT Enzyme Mix* (2 µL). As reacções de síntese realizaram-se no termociclador DNA Engine® Thermal Cycler (Bio-Rad) com o programa de PCR apresentado na tabela XII.

**Tabela XII.** Programa de RT-PCR usado na síntese de cDNA com o kit *SuperScript® III*.

Passos	Temperatura	Tempo
1	25 °C	10:00
2	50 °C	30:00
3	85 °C	05:00
4	4 °C	∞

Terminada a reacção de RT-PCR, adicionou-se à mistura de cDNA recém-sintetizado 1 µL de *E.coli* RNase H e incubou-se a 37 °C durante 20 minutos. Após incubação, as amostras de cDNA foram guardadas a - 20 °C.

Relativamente, à síntese de cDNA a partir do RNA extraído de fracções celulares foi feita com recurso ao kit *iScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription Supermix*. Neste caso, ao RNA extraído (< 1 µg) adicionou-se *5X iScript Reverse Transcription Supermix* (4 µL) e água livre de nucleases (2 µL). A reacção de síntese realizou-se no termociclador DNA Engine<sup>®</sup> Thermal Cycler (Bio-Rad) com o programa de PCR apresentado na tabela XIII.

**Tabela XIII.** Programa de RT-PCR usado na síntese de cDNA com o kit *iScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription Supermix*.

<b>Passos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
<b>1</b>	25 °C	05:00
<b>2</b>	42 °C	30:00
<b>3</b>	85 °C	05:00
<b>4</b>	4 °C	∞

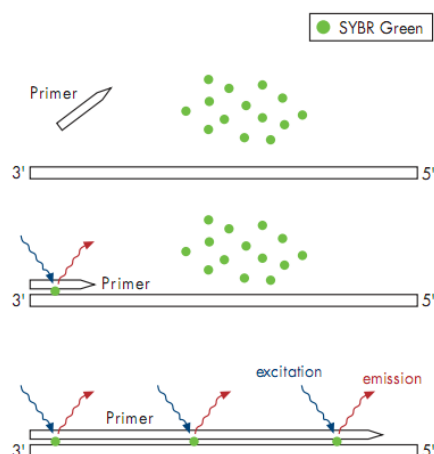
### **3.8.2. PCR em tempo real**

PCR em tempo real é idêntico a um simples PCR, excepto no facto da reacção ser monitorizada por um detector em tempo real, ou seja, detecta a acumulação da sequência amplificada durante a reacção, sendo essa informação obtida na fase exponencial.

Existem numerosas técnicas que são usadas de modo a permitir que o progresso da PCR seja monitorizado. Cada técnica recorre a um determinado tipo de marcador fluorescente, o qual se vai ligar ao cDNA. Uma vez que, o número de cópias dos genes aumenta durante a reacção, a fluorescência também vai aumentar, o que se torna uma vantagem, pois a eficiência e a taxa de reacção podem ser seguidas.

O marcador fluorescente usado foi SYBR<sup>®</sup> Green I, o qual se liga de forma homogénea a moléculas de DNA de cadeia dupla, emitindo um sinal fluorescente de comprimento de onda definido. A detecção do sinal é feita, portanto, durante o passo de extensão da reacção de PCR em tempo real. A intensidade do sinal aumenta com o aumento do número de ciclos devido à acumulação do produto de PCR (Figura 12).

Na reacção de PCR em tempo real, a amplificação do cDNA ocorre na presença de uma DNA polimerase, de primers específicos para o gene que se pretende estudar e de SYBR<sup>®</sup> Green I.



**Figura 12.** Esquema representativo da detecção dos produtos de PCR em tempo real recorrendo a SYBR<sup>®</sup> Green I. (Fonte: Integrated solutions – Real-Time PCR Applications, Critical factors for successful Real-time PCR; QIAGEN)

Contudo, o uso de marcadores fluorescentes apresenta desvantagens, relativamente ao facto do SYBR<sup>®</sup> Green se ligar a qualquer cadeia dupla de DNA, dentro dos quais, produtos de PCR não específicos e dímeros de primers.

### 3.8.3. Normalização

Para efectuar a análise dos resultados obtidos por PCR em tempo real foi necessário encontrar dois genes de referência, para se proceder à normalização dos valores obtidos. Sendo que, um gene de referência é definido como um gene cuja expressão não deve diferir entre amostras.

Para escolher os dois genes de referência a usar, utilizaram-se amostras aleatórias nas reacções com cada um dos 12 genes que poderia ser usado como gene de referência: *ACTB* (codifica a Beta Actina), *GAPDH* (codifica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *UBC* (codifica Ubiquitina C), *B2M* (codifica  $\beta$ -2-Microglobulina), *YWHAZ* (codifica Fosfolipase A2), *SF3A1* (codifica subunidade 1 do factor de splicing 3a), *18S rRNA* (codifica subunidade ribossomal 18S), *CYCI* (codifica Citocromo C-1), *EIF4A2* (codifica isoforma 2 do factor eucariótico de iniciação de tradução 4a), *SDHA* (codifica complexo succinato desidrogenase), *TOP1* (codifica Topoisomerase I (DNA)) e

*ATP5B* (codifica ATP sintase) e procedeu-se à realização das reacções de PCR em tempo real de acordo com o que está descrito no tópico 3.8.4.

Uma vez terminadas as reacções, os resultados obtidos foram analisados recorrendo ao programa *geNorm* (PrimerDesign), o qual fez a escolha dos dois melhores genes que se adequavam ao tipo de amostras usadas no estudo.

Conhecidos os dois genes de referência para cada uma das situações (amostras de sangue total; amostras de sedimento urinário; amostras de fracções celulares), realizaram-se as reacções de PCR em tempo real para os três tipos de amostras com os respectivos genes de referência. De seguida, foi necessário proceder ao cálculo do Factor de Normalização para cada uma das amostras recorrendo, novamente, ao programa *geNorm* (PrimerDesign). Este valor foi, posteriormente, usado para o cálculo do valor de expressão génica normalizado (do inglês, Normalized Gene Expression, NGE).

#### **3.8.4. Reacções de PCR em tempo real**

A quantificação relativa da expressão génica das amostras foi feita por PCR em tempo real recorrendo ao equipamento Light Cycler<sup>®</sup> 480 (Roche). Estudaram-se diferentes genes de acordo com o tipo de amostra usada, na tabela XIV encontram-se atribuídos os genes estudados em cada uma das situações.

Para a realização das reacções de PCR preparou-se uma mistura contendo 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (QIAGEN), os primers 10x QuantiTect Primer assay (QIAGEN) específicos para cada um dos genes de interesse e água livre de RNases. Os primers encontravam-se liofilizados e foram reconstituídos com 1,1 mL de água livre de RNases.

**Tabela XIV.** Esquema-resumo dos genes de referência e de interesse usados para os diferentes tipos de amostras.

Genes de referência			Genes de interesse				
RNA Total	SF3A1 (QT00061257)	TOP1 (QT00068915)	<b>IL2</b> (QT00015435)	<b>IL4</b> (QT00012565)	<b>IL 6</b> (QT00083720)	<b>IL10</b> (QT00041685)	<b>IL12</b> (QT00000364)
			<b>FoxP3</b> (QT00048286)	<b>TGF-β1</b> (QT00000728)	<b>IFN-γ</b> (QT00000525)	<b>IP9</b> (QT00013461)	<b>IP10</b> (QT01003065)
			<b>Prfl</b> (QT01869602)	<b>GzmB</b> (QT01001875)	<b>FasL</b> (QT00001281)	<b>SLC8A1</b> (QT00075376)	<b>MAN</b> (QT00017388)
			<b>MS4A1</b> (QT00061670)	<b>CD79B</b> (QT00203651)	<b>TCL1A</b> (QT00001561)	<b>SH2D1B</b> (QT00056175)	-
RNA de células sedimento urinário	SF3A1 (QT00061257)	UBC (QT00234430)	<b>FoxP3</b> (QT00048286)	<b>TGF-β1</b> (QT00000728)	<b>IP9</b> (QT00013461)	<b>IP10</b> (QT01003065)	
			<b>Prfl</b> (QT01869602)	<b>GzmB</b> (QT01001875)	<b>MAN</b> (QT00017388)	<b>KIM-1</b> (QT00022372)	
RNA de células Tregs	SF3A1 (QT00061257)	UBC (QT00234430)	<b>FoxP3</b> (QT00048286)	<b>TGF-β1</b> (QT00000728)	<b>IL10</b> (QT00041685)	<b>GATA3</b> (QT00095501)	<b>CTLA4</b> (QT01670550)
RNA de células B27 <sup>+</sup> e B27 <sup>-</sup>	SF3A1 (QT00061257)	TOP1 (QT00068915)	<b>IL10</b> (QT00041685)	<b>TGF-β1</b> (QT00000728)	<b>HLA-DRB1</b> (QT00090993)	<b>CD79b</b> (QT00203651)	

Foram utilizadas Light Cycler® 480 Multiwell Plate 96 para a realização das reacções de PCR, onde cada reacção tinha um volume final de 10 µL com 1x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 1x QuantiTect Primer assay, cDNA e água livre de RNases (nos casos em que era necessário perfazer os 10 µL de volume final da reacção). A placa foi colocada no aparelho Light Cycler® 480 para se efectuarem as reacções de amplificação do cDNA, com o programa de amplificação representado na tabela XV.

**Tabela XV.** Programa de PCR em tempo real usado para análise da expressão génica.

<b>Passos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Nº de ciclos</b>
1 – Activação da enzima	95 °C	15:00	1
2	94 °C	00:15	50
	55 °C	00:30	
	72 °C	00:30	
3 – Curva de melting	65 °C – 95 °C	-	1

No fim da amplificação do cDNA, procedeu-se à análise dos resultados através do software do Light Cycler<sup>®</sup> 480. O primeiro aspecto a analisar foi a curva de melting dos produtos de PCR, para que se conseguisse aferir se os produtos da amplificação eram ou não específicos, isto é, se haviam desvios na temperatura de melting ( $T_m$ ).

Obtidos os valores de  $C_p$  (Crossing points), procedeu-se ao cálculo da quantidade relativa ( $QR = 2^{-\Delta C_p}$ ) e os valores normalizados da expressão génica (NGE) foram obtidos através do quociente entre o valor de QR para o gene de interesse e o factor de normalização.

### **3.8.5 Análise estatística**

A apresentação dos resultados é feita com recurso à média  $\pm$  desvio-padrão para cada um dos grupos. A nível estatístico, os resultados foram submetidos ao teste U de *Mann-Whitney* e considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

O software usado foi o IBM SPSS<sup>®</sup> Statistics 19.

**Capítulo 4.**

**Resultados**

#### 4.1. Tipagem HLA

A partir da tipagem HLA feita para o par dador – receptor, foi feita a avaliação da qualidade do “matching” HLA, sendo esta expressa em termos de incompatibilidades para os *loci* A e B (HLA classe I) e o *locus* DR (HLA classe II) (Tabela XVI).

**Tabela XVI.** Média e desvio-padrão do número de incompatibilidades nas moléculas HLA classe I e classe II entre o par dador-receptor.

Classe HLA		Incompatibilidades (média ± dp)		
		HLA classe I		HLA classe II
		A	B	DR
Grupo 1	1,33 ± 0,53	1,45 ± 0,59	0,93 ± 0,71	
Grupo 2	1,30 ± 0,57	1,50 ± 0,51	1,00 ± 0,65	

**Legenda:** Grupo 1 - transplantados renais com função renal estável há mais de dez anos; Grupo 2 - transplantados com disfunção crónica do enxerto; dp – desvio-padrão.

Verifica-se que os valores médios de incompatibilidades para os dois grupos de transplantados são semelhantes.

#### 4.2. Pesquisa de anticorpos

Na pesquisa de anticorpos no soro de transplantados com função renal estável há mais de dez anos (Grupo 1) obteve-se uma baixa percentagem de presença de anticorpos anti-HLA classe I e classe II (Tabela XIV).

No caso dos transplantados com disfunção crónica do enxerto (Grupo 2), verificou-se um aumento na percentagem de doentes com anticorpos anti-HLA classe I em relação ao grupo 1. Relativamente, à presença de anticorpos anti-HLA classe II, mais de 50% de transplantados do grupo 2 apresentaram positividade para esta classe de anticorpos (Tabela XVII).



**Tabela XVII.** Percentagem de doentes, dos dois grupos de transplantados, obtida na pesquisa de anticorpos HLA Classe I e Classe II.

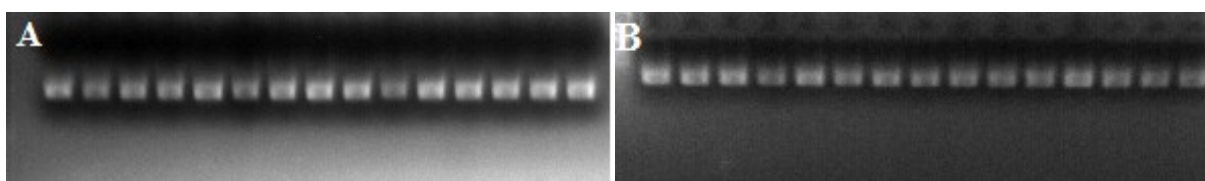
	Anticorpos HLA Classe I		Anticorpos HLA Classe II	
	Positivos (%)	Negativos (%)	Positivos (%)	Negativos (%)
Grupo 1	10,42	89,58	22,92	77,08
Grupo2	20,83	79,17	54,17	45,83

**Legenda:** % - percentagem

### 4.3. Perfil farmacogenético

A reacção de amplificação é crucial para o processo de sequenciação, pois pretende-se obter um produto de PCR específico, o qual se pode visualizar na realização de electroforese em gel de agarose de 2%. Assim, os produtos de PCR foram submetidos a electroforese para se observar se ocorreu amplificação, se não houve formação de produtos inespecíficos e determinar qual seria a melhor diluição do produto a usar na reacção de sequenciação.

Na Figura 13A, pode-se visualizar a intensidade e a especificidade dos produtos de amplificação da sequência de interesse do gene *ABCB1*, o mesmo acontece na Figura 13B no caso do gene *CYP3A5*.



**Figura 13.** Resultados de electroforese em gel de agarose. **A** – Visualização dos produtos de amplificação referentes ao gene *ABCB1*. **B** – Visualização dos produtos de amplificação referentes ao gene *CYP3A5*.

A partir dos resultados obtidos pela análise das sequências no SeqScape<sup>®</sup>, efectuaram-se os cálculos das percentagens dos SNPs nos transplantados dos dois grupos (Tabelas XVIII e XIX).

**Tabela XVIII.** Percentagem dos SNPs para o grupo dos transplantados com função renal estável há mais de dez anos.

SNP	Gene	Sequência nucleótidos		Genótipo		
		Wild-type (Wt)	Mutante (Mt)	Wt/Wt	Wt/Mt	Mt/Mt
3435 C>T	<i>ABCB1</i>	agagatCgtgagg	agagatTgtgagg	23,4 %	40,4 %	36,2 %
6986 A>G	<i>CYP3A5</i>	ctttcaAtatctc	ctttcaGtatctc	2,4 %	10,6 %	87,0 %

**Tabela XIX.** Percentagem dos SNPs para o grupo dos transplantados com função disfunção crônica.

SNP	Gene	Sequência nucleótidos		Genótipo		
		Wild-type (Wt)	Mutante (Mt)	Wt/Wt	Wt/Mt	Mt/Mt
3435 C>T	<i>ABCB1</i>	agagatCgtgagg	agagatTgtgagg	28,0 %	40,0 %	28,0 %
6986 A>G	<i>CYP3A5</i>	ctttcaAtatctc	ctttcaGtatctc	0,0 %	20,0 %	80,0 %

No grupo dos transplantados com função renal estável há mais de dez anos observou-se uma ocorrência do SNP do gene *ABCB1* em 36,2 % dos transplantados e, em relação, ao SNP do gene *CYP3A5* obteve-se uma percentagem de 87,0%.

A percentagem de 28,0 % foi obtida para a ocorrência do SNP do gene *ABCB1* no grupo dos transplantados com disfunção crônica do enxerto. E a percentagem de 80% foi o que se obteve no caso do gene *CYP3A5*.

Todos os doentes foram, inicialmente, sujeitos a uma terapêutica imunossupressora base com a administração de 0,15 mg de CsA por cada quilograma de peso. A dose foi, posteriormente, ajustada de acordo com os resultados do doseamento dos níveis séricos do fármaco.

#### 4.4. Expressão génica em células do sedimento urinário

##### 4.4.1. Determinação do grau de mistura celular (quimerismo) no sedimento urinário

Na tabela XX observa-se que em termos de mistura celular no sedimento urinário, os grupos 1 e 2 possuem uma percentagem semelhante de células do dador e células do próprio.

**Tabela XX.** Média da percentagem da origem das células do sedimento urinário, dador e receptor.

	Quimerismo (% Células)	
	Dador (média ± dp)	Receptor (média ± dp)
Grupo 1	45,91 ± 28,10	54,20 ± 28,13
Grupo 2	56,29 ± 22,45	43,71 ± 22,45

**Legenda:** dp – desvio-padrão; % - percentagem

##### 4.4.2. Expressão génica

Os níveis de expressão génica normalizada dos genes que codificam quimiocinas, *CXCL10* e *CXCL9*, apresentaram-se aumentados no grupo 2 comparativamente ao grupo 1, com diferenças significativas com valor de  $p = 0,002$  e  $p = 0,001$ , respectivamente (Tabela XXI).

No caso dos genes que codificam a *Perforina 1*, a *Granzima B* e o *KIM-1*, não se obtiveram diferenças significativas. O mesmo aconteceu em relação ao gene que codifica o *FoxP3*. Já, no caso do gene codificante da  *$\alpha$ -1,2-Manosidase*, obtiveram-se diferenças significativas com  $p = 0,014$  (Tabela XXI).

E, por último, relativamente ao gene que codifica o *TGF- $\beta$ 1*, os níveis de NGE encontram-se aumentados no grupo 2, obtendo-se diferenças estatisticamente significativas com valor de  $p = 0,0001$  (Tabela XXI).

**Tabela XXI.** Valores médios da expressão gênica normalizada dos vários genes estudados nas células do sedimento urinário dos dois grupos de transplantados.

	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Valor de p</b>
<b>FoxP3</b>			0,420
N	22	18	
Média (NGE)	0,018	0,022	
Desvio-padrão	0,015	0,018	
<b><math>\alpha</math> -1,2-Manosidase</b>			0,014*
N	33	11	
Média (NGE)	0,0001	0,0002	
Desvio-padrão	0,00008	0,00018	
<b>CXCL10</b>			0,002*
N	22	17	
Média (NGE)	0,507	1,363	
Desvio-padrão	0,427	0,941	
<b>CXCL9</b>			0,001*
N	25	17	
Média (NGE)	0,031	0,079	
Desvio-padrão	0,026	0,049	
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>			0,0001*
N	34	22	
Média (NGE)	3,325	7,317	
Desvio-padrão	1,905	4,209	
<b>Perforina 1</b>			0,193
N	39	19	
Média (NGE)	13,499	9,306	
Desvio-padrão	10,215	6,671	

<b>Granzima B</b>		0,582
N	35	21
Média (NGE)	2,370	4,229
Desvio-padrão	2,422	5,189
<b>KIM-1</b>		0,832
N	36	19
Média (NGE)	0,966	0,866
Desvio-padrão	0,730	0,576

**Legenda:** NGE – valor da expressão génica normalizada

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de  $p < 0,05$ . Teste U de *Mann-Whitney*, \*Grupo 1 vs Grupo 2.

#### 4.5. Expressão génica no sangue total

No caso dos genes que codificam citocinas do tipo Th1 observou-se uma homogeneidade na expressão do gene *IL 2* entre o grupo 2 e o grupo controlo, sendo que no grupo 1 a expressão apresentou-se um pouco mais baixa, mas sem significado estatístico. Relativamente, ao gene que codifica a *IL 12* obtiveram-se diferenças significativas entre o grupo 1 e 2 ( $p = 0,004$ ), o grupo 1 e o grupo controlo ( $p = 0,0001$ ), e o grupo 2 e o grupo controlo ( $p = 0,001$ ), tendo em conta que, os grupos 1 e 2 apresentaram uma expressão mais elevada em relação ao grupo controlo. Por fim, a expressão do gene que codifica o  $IFN-\gamma$  foi semelhante entre o grupo 1 e 2, apresentando significado estatístico apenas a comparação entre o grupo 1 e o grupo controlo ( $p = 0,005$ ).

Nos genes que codificam citocinas do tipo Th2 obtiveram-se valores homogéneos para expressão do gene que codifica a *IL 4* entre o grupo 2 e o grupo controlo e, embora a expressão no grupo 1 tenha sido mais elevada, não se obtiveram diferenças significativas estatisticamente. Relativamente ao gene que codifica a *IL 6*, a sua expressão apresentou-se diminuída nos grupos 1 e 2 em comparação com o grupo controlo com significado estatístico ( $p = 0,0001$  em ambos os casos). No caso do gene que codifica a *IL 10*, os grupos 1 e 2 têm níveis mais baixos do que o grupo controlo, apresentando diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,0001$  para ambos os

casos), já entre o grupo 1 e o grupo 2 o significado estatístico deve-se a um valor de  $p=0,037$ . Por último, em relação ao gene *TGF- $\beta$ 1*, a sua expressão foi homogénea entre os três grupos, não havendo diferenças estatisticamente significativas.

Verificou-se que a expressão do gene que codifica o FoxP3 está diminuída nos grupos 1 e 2 em relação ao grupo controlo com diferenças significativas ( $p=0,003$  para grupo1 vs grupo controlo;  $p=0,0001$  para grupo 2 vs grupo controlo). O grupo 1 apresentou uma expressão mais elevada deste gene, comparativamente, com o grupo 2 com significado estatístico ( $p=0,0001$ ). Por sua vez, os três grupos exibiram uma expressão homogénea para o gene da  *$\alpha$ -1,2-manosidase*, não havendo diferenças estatisticamente significativas.

Em relação à expressão de genes que codificam moléculas envolvidas na actividade citotóxica, Perforina 1, Granzima B e FasL, os grupos 1 e 2 não apresentaram diferenças significativas entre eles, nos três genes. No caso dos genes que codificam a Perforina 1 e o FasL, os grupos 1 e 2 evidenciaram uma expressão diminuída em comparação com o grupo controlo, obtendo-se significado estatístico (Perforina:  $p=0,001$  para grupo1 vs grupo controlo;  $p=0,0001$  para grupo 2 vs grupo controlo; FasL:  $p=0,0001$  para ambos os casos). A expressão do gene *Granzima B* foi semelhante entre o grupo 2 e o grupo controlo, enquanto no grupo 1 observou-se uma expressão mais baixa e quando comparado com o grupo 2 obtém-se um valor de  $p=0,002$ .

Na expressão do gene que codifica a quimiocina CXCL9 não se obtiveram diferenças significativas entre o grupo 1 e o grupo 2, nem entre o grupo 2 e o grupo controlo. Apresentando, apenas, significado estatístico a comparação da expressão entre o grupo 1 e o grupo controlo com valor de  $p=0,027$ , onde o grupo 1 manifestou um nível de expressão mais baixo.

No caso da CXCL10, a expressão do gene que codifica esta quimiocina apresenta-se diminuída nos grupos 1 e 2 em relação ao grupo controlo com significado estatístico para ambos os casos e  $p=0,0001$ . O grupo 1 manifestou uma expressão mais baixa em comparação com o grupo 2, com valor estatisticamente significativo ( $p=0,0001$ ).

Analisando a expressão do gene que codifica a molécula CD79b, verificou-se que os valores são homogéneos entre o grupo 2 e o grupo controlo, não havendo diferenças significativas. Já em relação ao grupo 1, este apresenta uma expressão aumentada para o gene, quer em comparação com grupo 2 quer com o grupo controlo, em ambos os casos com significado estatístico com valor de  $p=0,0001$ .

A expressão do gene que codifica SH2D1B encontra-se diminuída nos grupos 1 e 2 em comparação com o grupo controlo, com diferenças significativas e valor de  $p=0,001$  em ambos os casos. Entre o grupo 1 e o grupo 2 não se obteve significado estatístico.

No caso do gene que codifica a expressão de MS4A1, os três grupos apresentaram valores homogéneos, não havendo diferenças estatísticas significativas.

Relativamente, à expressão do gene que codifica TCL1A, os grupos 1 e 2 não demonstram diferenças entre si, tendo ambos uma expressão reduzida deste gene quando comparados com o grupo controlo. A comparação entre o grupo 1 e o grupo controlo, e o grupo 2 e o grupo controlo apresentam diferenças significativas com valor de  $p=0,0001$ .

A expressão do gene que codifica SLC8A1 apresenta-se diminuída nos grupos 1 e 2 comparativamente com o grupo controlo, obtendo-se significado estatístico com valores de  $p=0,014$  e  $p=0,0001$ , respectivamente. Entre si, os grupos 1 e 2, também, apresentam diferenças estatisticamente significativas com um valor de  $p=0,04$ , sendo que o grupo 2 é o que demonstra uma expressão mais reduzida.

Na tabela XXII encontram-se os valores médios e desvio-padrão da expressão génica normalizada para cada um dos genes supracitados. São apresentados, também, os valores de  $p$  com significado estatístico.

**Tabela XXII.** Valores médios da expressão génica normalizada (NGE) e de desvio-padrão, dos vários genes estudados no sangue periférico total dos dois grupos de transplantados.

	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo Controlo</b>	<b>Valor de p&lt;0,05</b>
<b>IL 2</b>	0,678 ± 0,527	0,847 ± 0,674	0,866 ± 0,612	-
				-
				-
<b>IL 12</b>	1,588 ± 0,599	1,161 ± 0,541	0,617 ± 0,264	0,004*
				0,0001 <sup>#</sup>
				0,001 <sup>Δ</sup>
<b>IFN-γ</b>	0,484 ± 0,300	0,564 ± 0,383	0,811 ± 0,367	-
				0,005 <sup>#</sup>
				-
<b>IL 4</b>	0,428 ± 0,312	0,281 ± 0,191	0,241 ± 0,161	-
				-
				-
<b>IL 6</b>	0,261 ± 0,260	0,129 ± 0,093	0,950 ± 0,488	-
				0,0001 <sup>#</sup>
				0,0001 <sup>Δ</sup>
<b>IL 10</b>	0,223 ± 0,109	0,290 ± 0,101	0,847 ± 0,392	0,037*
				0,0001 <sup>#</sup>
				0,0001 <sup>Δ</sup>
<b>TGF-β</b>	1,148 ± 0,372	1,103 ± 0,316	1,218 ± 0,104	-
				-
				-
<b>FoxP3</b>	0,865 ± 0,419	0,446 ± 0,221	1,304 ± 0,395	0,0001*
				0,003 <sup>#</sup>
				0,0001 <sup>Δ</sup>
<b>α-1,2-Manosidase</b>	0,745 ± 0,329	0,810 ± 0,326	0,802 ± 0,390	-
				-
				-
<b>Perforina 1</b>	0,593 ± 0,326	0,440 ± 0,263	0,943 ± 0,210	-
				0,001 <sup>#</sup>
				0,0001 <sup>Δ</sup>
<b>Granzima B</b>	0,575 ± 0,216	0,787 ± 0,496	0,875 ± 0,315	-
				0,002 <sup>#</sup>
				-
<b>Fas L</b>	0,484 ± 0,164	0,413 ± 0,184	1,307 ± 0,310	-
				0,0001 <sup>#</sup>
				0,0001 <sup>Δ</sup>

(Continua na página seguinte)



<b>CXCL 9</b>	0,300 ± 0,194	0,385 ± 0,218	0,464 ± 0,244	-
				0,027 <sup>#</sup>
				-
<b>CXCL 10</b>	0,012 ± 0,008	0,037 ± 0,024	0,102 ± 0,038	0,0001 <sup>*</sup>
				0,0001 <sup>#</sup>
				0,0001 <sup>Δ</sup>
<b>CD79B</b>	1,294 ± 0,633	0,585 ± 0,246	0,589 ± 0,107	0,0001 <sup>*</sup>
				0,0001 <sup>#</sup>
				-
<b>SH2D1B</b>	0,382 ± 0,185	0,324 ± 0,186	0,633 ± 0,207	-
				0,001 <sup>#</sup>
				0,001 <sup>Δ</sup>
<b>MS4A1</b>	0,517 ± 0,288	0,466 ± 0,291	0,643 ± 0,265	-
				-
				-
<b>TCL1A</b>	0,192 ± 0,160	0,112 ± 0,085	0,681 ± 0,361	-
				0,0001 <sup>#</sup>
				0,0001 <sup>Δ</sup>
<b>SLC8A1</b>	0,467 ± 0,216	0,299 ± 0,144	0,661 ± 0,205	0,004 <sup>*</sup>
				0,014 <sup>#</sup>
				0,0001 <sup>Δ</sup>

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de  $p < 0,05$ . Teste U de *Mann-Whitney*: \*Grupo 1 vs Grupo 2; # Grupo 1 vs Grupo Controlo; Δ Grupo 2 vs Grupo Controlo.

#### 4.6. Expressão génica em subpopulações celulares

Nas células Tregs, a expressão do gene que codifica o FoxP3 apresentou uma expressão diminuída nos grupos 1 e 2 em comparação com o grupo controlo. Verificando-se diferenças estatisticamente significativas apenas, entre o grupo 1 e o grupo controlo ( $p = 0,009$ ).

Em relação à expressão do gene que codifica o TGF- $\beta$ 1, observaram-se níveis de expressão aumentados nos grupos 1 e 2 em relação ao grupo controlo, obtendo-se diferenças significativas entre o grupo 1 e o grupo controlo com valor de  $p = 0,0001$ , e entre o grupo 2 e o grupo controlo com  $p = 0,007$ . Já, entre o grupo 1 e o grupo 2, o significado estatístico tem como valor de  $p = 0,0001$ .

A expressão do gene *GATA3* apresentou níveis mais elevados nos grupos 1 e 2 comparativamente com o grupo controlo. Sendo que, o grupo 1 foi o que apresentou

níveis de expressão mais elevados, obtiveram-se diferenças significativas com valor de  $p=0,0001$  entre o grupo 1 e o grupo 2, e entre o grupo 1 e o grupo controle.

Por último, e ainda nas células Tregs, não se obtiveram diferenças significativas na expressão dos genes *IL 10* e *CTLA4*. Embora, em relação ao gene do CTLA4, o grupo 2 tenha demonstrado uma tendência para uma expressão mais elevada, enquanto no caso do gene da IL 10 se tenha observado uma homogeneidade entre os valores para os diferentes grupos.

Nas células B  $CD19^+CD27^+$ , em nenhum dos genes se obtiveram diferenças significativas, contudo, algumas tendências podem ser referidas. No caso do gene que codifica a IL 10, o grupo 1 demonstrou uma tendência para valores de expressão mais elevados do que os restantes grupos. No gene *TGF- $\beta$ 1*, os grupos 1 e 2 apresentaram também, uma tendência para valores mais elevados de expressão deste gene em relação ao grupo controle. Em relação ao gene *HLA-DRB1*, talvez o grupo 2 seja propenso a níveis de expressão mais elevados quando comparado com os grupos 1 e o grupo controle. Finalmente, no gene que codifica a molécula CD79b verificou-se uma homogeneidade nos valores de expressão entre os três grupos.

De igual modo, nas células B  $CD19^+CD27^-$  não se obtiveram diferenças significativas para os diferentes genes estudados. Nos genes *IL 10*, *TGF- $\beta$ 1* e *CD79B*, os seus valores de expressão foram semelhantes entre os grupos para cada um dos genes. No caso do gene *HLA-DRB1*, o grupo 2 e o grupo controle apresentaram valores de expressão próximos, enquanto no grupo 1 se verificou uma tendência para um valor aumentado.

Na tabela XXIII encontram-se os valores médios e desvio-padrão da expressão génica normalizada para cada um dos genes supracitados. São apresentados, também, os valores de p com significado estatístico.

**Tabela XXIII.** Valores médios da expressão génica normalizada (NGE) e de desvio-padrão, dos vários genes estudados nas fracções celulares separadas a partir de sangue periférico dos dois grupos de transplantados.

		<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo Controlo</b>	<b>Valor de p&lt;0,05</b>
<b>Células Tregs</b>	<b>FoxP3</b>	0,540 ± 0,279	0,660 ± 0,180	0,820 ± 0,225	-
					0,009#
					-
		0,918 ± 0,323	0,520 ± 0,162	0,353 ± 0,095	0,0001*
					0,0001#
					0,007 <sup>Δ</sup>
	<b>IL 10</b>	0,198 ± 0,153	0,145 ± 0,130	0,115 ± 0,074	-
					-
					-
		1,463 ± 0,472	0,927 ± 0,419	0,779 ± 0,074	0,0001*
					0,0001#
					-
<b>CTLA4</b>	0,574 ± 0,291	0,610 ± 0,251	0,419 ± 0,162	-	
				-	
				-	
<b>Células B CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup></b>		2,272 ± 2,010	1,489 ± 1,333	0,438 ± 0,195	-
					-
					-
	<b>TGF-β1</b>	0,493 ± 0,473	0,387 ± 0,342	0,016 ± 0,014	-
					-
					-
		1,246 ± 0,367	1,534 ± 0,510	0,959 ± 0,143	-
					-
-					
<b>CD79B</b>	1,258 ± 0,534	1,067 ± 0,063	1,162 ± 0,396	-	
				-	
				-	
<b>Células B CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup></b>		0,003 ± 0,002	0,007 ± 0,006	0,0012 ± 0,0009	-
					-
					-
	<b>TGF-β1</b>	1,820 ± 0,529	1,832 ± 0,604	1,819 ± 0,357	-
					-
					-
		2,060 ± 1,023	1,666 ± 0,509	1,878 ± 0,384	-
					-
-					
<b>CD79B</b>	1,687 ± 0,759	1,377 ± 0,374	1,589 ± 0,222	-	
				-	
				-	

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p < 0,05. Teste U de *Mann-Whitney*: \*Grupo 1 vs Grupo 2; # Grupo 1 vs Grupo Controlo; Δ Grupo 2 vs Grupo Controlo.

**Capítulo 5.**

**Discussão**

Nos últimos 20 anos, a rejeição aguda deixou de constituir um problema com o uso dos imunossuppressores, passando a manutenção dos órgãos transplantados a longo prazo a constituir a principal preocupação. A causa mais comum da perda tardia do enxerto é a rejeição/ disfunção crónica.

Daí a importância e os extensos estudos feitos, hoje em dia, para uma melhor caracterização dos mecanismos envolvidos no processo de rejeição/ disfunção crónica, de forma a conseguir efectuar uma monitorização imunológica do doente mais informativa, de um valor acrescentado na antecipação dos eventos relacionados com a disfunção e menos invasiva.

### **5.1. Incompatibilidades HLA e presença de anticorpos**

Em termos de incompatibilidades verificou-se que não existem diferenças entre os grupos 1 e 2, pois o menor número possível de incompatibilidades HLA foi tido em conta, para que o transplante fosse realizado, tentando minimizar o risco de rejeição precoce do enxerto, em virtude dos principais alvos da resposta imune do receptor contra o aloenxerto serem os antigénios MHC presentes no enxerto alogénico (Bharat e Mohanakumar, 2007).

Em relação à presença de anticorpos, no grupo 1, a frequência encontrada de anticorpos anti-HLA I e anti-HLA II foi muito mais baixa do que no grupo 2, isto é, no grupo dos transplantados renais com rejeição/ disfunção crónica, o número de casos positivos foi cerca do dobro quando comparado com o número de casos positivos para o grupo com uma função renal estável (Tabela XVII). É de referir também, dentro do grupo 2, que a percentagem de anticorpos anti-HLA II obtida é muito superior à encontrada para os anticorpos anti-HLA I.

A importância da sensibilização humoral contra antigénios HLA “non-self” foi reconhecida desde o começo da medicina de transplantação. Daí, o resultado negativo do teste “crossmatch” entre o soro do receptor e células do dador ser mandatório para a realização de transplante renal de dador cadáver (Sawitzki *et al.*, 2011).

A implementação de novas técnicas como o “crossmatching” por citometria de fluxo e ensaios por Luminex permitiram aumentar a sensibilidade na determinação de anticorpos anti-HLA I e anti-HLA II (Sawitzki *et al.*, 2011).

A partir de estudos anteriores, demonstraram que o desenvolvimento *de novo* de anticorpos anti-HLA quer sejam ou não específicos contra o dador está associado com

um pior resultado a longo prazo do enxerto (Seveso *et al.*, 2009). E, recentemente, foi reportado que a presença de anticorpos anti-HLA II no soro será o factor mais predictivo de danos na microcirculação sugerindo, então, que este tipo de anticorpos possui uma maior capacidade do que os anticorpos anti-HLA I para desencadear a perda do enxerto (Einecke *et al.*, 2009; Issa *et al.*, 2008).

Neste trabalho não foram referidos os resultados da realização do “Single Antigen Assay”, isto é, do ensaio cuja aprofundada análise, nos permitiria colocar a hipótese de que os anticorpos anti-HLA, presentes no soro dos transplantados, serem ou não específicos para o dador. Todavia, deverá ser feita esta análise num trabalho futuro.

O desenvolvimento de anticorpos específicos HLA é um processo dependente de células T, que começa quando um indivíduo é exposto, pela primeira vez, a proteínas HLA alogénicas. As células B naïve expressam imunoglobulinas de superfície celular e quando estas encontram um antígeno, para o qual são específicas, como no caso de moléculas HLA alogénicas, internalizam o complexo receptor/antígeno, processam-no e o antígeno regressa à superfície celular ligado a moléculas HLA classe II.

A ligação antígeno – célula B é completamente activada através de interacções subsequentes com as células Th, onde os TCRs se ligam ao complexo péptido antígeno/HLA nas células B. A ligação de moléculas co-estimulatórias como o CD40L das células T com o CD40 das células B, em conjunto com citocinas produzidas pelas células T, activam as células B e estimulam a formação do centro germinal. Nos centros germinais, as células B activadas dividem-se rapidamente e sofrem hipermutações somáticas, maturação de afinidades e “switch” de isoformas.

Alguns dos clones de alta afinidade, também se diferenciam em células B de memória e plasmócitos secretores de anticorpos. Os anticorpos produzidos antes e depois da transplantação poderão ditar o destino de aloenxertos (Montgomery *et al.*, 2011).

## **5.2. Perfil farmacogenético**

A Ciclosporina ou Tacrolimus, um destes fármacos imunossupressores esteve presente na imunossupressão inicial aplicada aos doentes transplantados renais, que constituíram os grupos de estudo deste trabalho.

Nos resultados obtidos em termos de percentagem de SNP para o gene *ABCB1*, observou-se uma percentagem semelhante entre os grupos 1 e 2, e em ambos os casos, o genótipo heterozigótico (Wt/ Mt) foi o de maior frequência.

Em relação ao SNP para o gene *CYP3A5*, a maior percentagem obtida observou-se, nos dois grupos, para a homozigotia da mutação (Mt/ Mt). No entanto, é de realçar que no grupo 2 se verificou uma completa anulação do genótipo “wild-type” homozigótico e a percentagem, do genótipo heterozigótico no grupo 2, foi cerca do dobro da observada no grupo 1.

De forma, a reduzir a toxicidade inerente ao uso destes fármacos e mantendo a baixa incidência da rejeição aguda celular na fase inicial pós-transplante, a qual vai representar benefícios clínicos a longo prazo, em termos de uma menor perda do enxerto e aumento da sobrevivência do paciente, uma cuidada monitorização das concentrações sanguíneas de CsA e FK506 é uma parte essencial do acompanhamento dos pacientes depois do transplante de órgãos (Masuda e Inui, 2006).

Discutindo-se, actualmente, uma monitorização da terapêutica farmacológica (TDM, do inglês “Therapeutic Drug Monitoring”) baseada numa terapia imunossupressiva personalizada. Pois, uma das limitações da tradicional TDM é que só é iniciada quando o imunossupressor é administrado e, portanto, não pode ser usada na previsão da dose inicial (Masuda e Inui, 2006).

Assim, para uma melhor compreensão e previsão da farmacocinética individualizada para regimes com doses personalizadas, tem de ser feita a análise de factores moleculares que possam afectar as variações farmacocinéticas, nomeadamente, a variabilidade farmacogenética, as regulações da transcrição e as modificações pós-transcripcionais.

E, por conseguinte, nos últimos anos, foi demonstrada a importância da informação genética relacionada com as variações inter e intra-indivíduos da farmacocinética de fármacos como a CsA e o FK506, tendo estes imunossupressores uma estreita janela terapêutica e concentrações sanguíneas muito variadas sob um regime com dose fixa. (Masuda e Inui, 2006; Felipe *et al.*, 2009).

Ciclosporina e Tacrolimus (assim como, Sirolimus e Everolimus) são substratos da P-gp e da enzima metabólica CYP3A5. Os polimorfismos genéticos nos genes que codificam estas duas proteínas podem explicar, em parte, a variabilidade das concentrações sanguíneas dos fármacos imunossupressores (Felipe *et al.*, 2009).

A P-gp está presente na membrana apical das células epiteliais renais, na membrana canalicular de hepatócitos mediando a excreção biliar de fármacos lipofílicos e seus metabolitos, e na membrana luminal dos enterócitos limitando a absorção de fármacos administrados oralmente. A P-gp também se encontra em linfócitos T e B. A expressão específica de *ABCB1* em tecidos sugere, então, que a função da proteína constitui uma barreira protectora (Masuda e Inui, 2006).

O SNP 3435 C>T é um SNP silencioso. E, embora, o seu impacto funcional não tenha sido avaliado *in vivo*, estudos *in vitro* verificaram que o impacto do SNP *ABCB1* 3435 C>T está associado a uma redução da expressão de mRNA (Hoffmeyer *et al.*, 2000), a uma redução da sua estabilidade (Wang *et al.*, 2005) e, recentemente, com alterações na especificidade do substrato (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007).

A enzima CYP3A5 medeia a biotransformação de FK506 e CsA, e está presente no intestino delgado e no estômago (Felipe *et al.*, 2009).

O SNP no intrão 3 (6986 A>G), do gene *CYP3A5*, promove um erro de splicing, dando origem a mRNA aberrante com um códon stop prematuro, o que se traduz numa proteína truncada (Kuehl *et al.*, 2001).

Em suma, a presença dos SNPs 6896 A>G (*CYP3A5*) e 3435 C>T (*ABCB1*) tornam, de certa forma, os seus portadores piores metabolizadores dos fármacos imunossupressores em questão. Em virtude da distribuição das frequências dos SNPs estudados serem idênticas nos dois grupos, não houve influência deste perfil genético nas manifestações de disfunção crónica do enxerto.

### **5.3. Expressão génica em células do sedimento urinário**

Nos resultados obtidos, na avaliação da presença de mistura celular no sedimento urinário, observou-se um equilíbrio entre a percentagem de células do próprio e de células do enxerto, em ambos os grupos.

Li *et al.*, num dos seus estudos, realizaram a medição do mRNA codificante de proteínas citotóxicas nas células da urina, e isto porque, constituía uma forma não invasiva de tentar diagnosticar a rejeição aguda dos aloenxertos renais. Daí, se ter recorrido à análise da expressão génica nas células do sedimento urinário, pois a urina constitui o microambiente do aloenxerto e o acesso a este material biológico, não constitui qualquer risco para o doente.



Começando a análise da expressão génica, nomeadamente, do gene que codifica o factor de transcrição *FoxP3*, característico das células Tregs, verificaram-se níveis semelhantes de expressão entre os grupos 1 e 2.

Muthukumar *et al* observaram que os níveis de mRNA deste factor de transcrição, nas células urinárias, estavam aumentados durante o processo de rejeição aguda e que estariam associados com uma rejeição aguda reversível e com baixo risco de perda do enxerto. Estes resultados estão consistentes com a hipótese de que as células Tregs servem para limitar a imunidade anti-aloenxerto.

No caso, do gene da  *$\alpha$ -1,2-manosidase* verificou-se uma expressão mais elevada no grupo 2. A enzima  $\alpha$ -1,2-manosidase está envolvida na *N*-glicosilação de proteínas (Jiang, 2008), e este tipo de glicosilação de proteínas da superfície de células T pode ser importante para a regulação negativa da activação de células T, nestes doentes com disfunção crónica instalada.

Relativamente, à expressão dos genes que codificam a Perforina e a Granzima B, não se observaram diferenças estatísticas entre o grupo dos transplantados com função renal estável e o grupo dos transplantados com disfunção crónica. Li *et al* demonstraram que os níveis do mRNA que codificam cada uma destas proteínas citotóxicas se encontravam elevados em células urinárias, mas de pacientes com episódios de rejeição aguda. Uma vez que, as células citotóxicas estão frequentemente associadas a aloenxertos sob rejeição aguda, e a sua contribuição para a rejeição crónica, não é tão relevante.

Ao nível da expressão do gene que codifica a KIM-1, também, não se observaram diferenças significativas entre os grupos 1 e 2. KIM-1 é uma glicoproteína da membrana celular do tipo I e o aumento da sua expressão está associada a danos no enxertos mas, mais frequentemente, a processos de rejeição aguda (Bonventre, 2009).

No caso da expressão dos genes que codificam as quimiocinas CXCL10 e CXCL9 verificou-se uma maior expressão destes dois genes no grupo 2 com diferenças significativas perante o grupo 1. Em estudos anteriores, Tatapudi *et al*, associaram a detecção da quimiocina CXCL10 e do seu receptor CXCR3 a casos de rejeição aguda do enxerto, o que poderia ser útil para a monitorização da inflamação. De certa forma, os resultados obtidos poderão ser indiciadores de um processo onde haverá algum envolvimento da célula T na disfunção crónica do enxerto (grupo 2).

E, por último, os níveis de expressão do gene *TGF- $\beta$ 1* foram significativamente mais elevados no grupo 2. Em estudos anteriores de análise da expressão de TGF- $\beta$ 1,

em biópsias de aloenxertos renais, foi correlacionada a presença de fibrose intersticial com a expressão intra-enxerto de TGF- $\beta$ 1. Além disso, a sobreexpressão de TGF- $\beta$ 1 foi, também, correlacionada com a Nefropatia Crónica do Aloenxerto (CAN), sendo esta a maior causa da disfunção do enxerto a longo prazo (Carpenter, 1995; Paul, 1995; Tanabe *et al.*, 1996). A fibrose intersticial é a principal característica histológica da CAN (Kasiske, 1991).

A transição tubular epitelial-mesenquimal é, por definição, um processo no qual as células tubulares renais perdem o fenótipo epitelial e adquirem características mesenquimais, e está, intimamente, relacionada com a fibrose intersticial. Esta conversão de fenótipo concede uma elevada plasticidade às células epiteliais tubulares depois do desenvolvimento e ocorre produção de matriz (Li, 2004; Kalluri e Neilson, 2003).

Através de múltiplos mecanismos, o TGF- $\beta$ 1 actua como o maior regulador da produção e degradação da matriz extracelular; estimula a síntese de matriz extracelular (colagénio, fibronectina e proteoglicanos), aumenta a expressão de integrinas e reduz a actividade de proteases que degradam a matriz (Nakamura *et al.*, 1992; Kalluri e Neilson, 2003; Pribylova-Hibrova *et al.*, 2006).

#### **5.4. Expressão génica em células do sangue total**

No sangue periférico foram analisados diversos genes, uns relacionados com as células T e outros com as células B.

A análise dos genes *CD79B*, *TCL1A*, *SH2D1B*, *MS4A1* e *SLC8A1* foi feita tendo em conta os resultados obtidos na investigação feita por Sago e colaboradores. Nesse estudo, em primeiro lugar, foi feito um Microarray, de forma a detectar as alterações ao nível da expressão de genes entre receptores tolerantes sem imunossupressão, receptores estáveis, pacientes com rejeição crónica e pessoas saudáveis. Após extensa análise dos resultados obtidos, criaram um top 10 dos genes, que melhor distinguiam os indivíduos tolerantes dos não-tolerantes. Nesse top, 6 dos 10 genes são expressos pelas células B ou estão relacionados com a sua função. Especulando-se, portanto, um importante papel das células B na promoção da tolerância.

Em relação ao gene *CD79B*, verificou-se uma elevada expressão no grupo 1, obtendo-se diferenças significativas quer com o grupo 2, quer com o grupo controlo. A molécula codificada por este gene está implicada na formação do BCR, sendo este

responsável pelo reconhecimento dos antígenos pelas células B. Sagoo *et al* obtiveram uma sobreexpressão deste gene para os receptores tolerantes, sendo que estes transplantados não realizavam qualquer terapêutica imunossupressora.

No gene *SH2D1B*, a sua expressão apresentou-se diminuída nos grupos 1 e 2 com diferenças significativas com grupo controlo. As células B activadas sofrem apoptose precocemente na presença de SH2D1B. No estudo de Sagoo *et al*, os receptores tolerantes tiveram uma sobreexpressão deste gene.

A expressão do gene *MS4A1* não apresentou diferenças significativas entre os três grupos. A molécula da superfície celular específica dos linfócitos B, codificada por este gene, a molécula CD20, está envolvida na activação e diferenciação das células B. A sobreexpressão deste gene foi observada por Sagoo *et al*.

No caso do gene *TCL1A*, a expressão obtida para os grupos 1 e 2 foi significativamente inferior à obtida no grupo controlo. A sobreexpressão desta oncoproteína está associada a uma maior sobrevivência das células B naïve. Sagoo e colaboradores obtiveram, mais uma vez, a sobreexpressão deste gene em receptores tolerantes.

E, por último, o gene *SLC8A1*, que não está relacionado com as células B, apresentou uma expressão significativamente mais baixa nos grupos 1 e 2, comparando com o grupo controlo. O grupo 2 foi o que apresentou a expressão mais baixa dos três grupos. O gene *SLC8A1* codifica uma proteína transmembranar que desempenha um papel fundamental no reabastecimento de  $Ca^{2+}$  no retículo endoplasmático. É expressa nos macrófagos e monócitos, restaura os sinais de  $Ca^{2+}$  que induzem a produção de TNF- $\alpha$  (Sagoo *et al.*, 2010). Tal como no trabalho aqui apresentado, também Sagoo *et al* obtiveram uma sub-expressão deste gene.

Os resultados aqui obtidos, parcialmente coincidentes com o trabalho desenvolvido por Sagoo e colaboradores, são indiciadores da obtenção de algum grau de tolerância nos doentes estudados, apesar do grupo de doentes com função normal do enxerto dez anos após o transplante continuar sujeito a uma terapêutica imunossupressora de manutenção, maioritariamente com inibidores de calcineurina (CsA), enquanto que os que constituíam o grupo de estudo de Sagoo e colaboradores, designado como tolerante, não fazia qualquer tipo de imunossupressão.

No que diz respeito, aos níveis de expressão dos genes que codificam citocinas Th1, verificamos que no gene da IL 2 não existem diferenças significativas entre os três

grupos. Deve-se ter em conta, que os grupos 1 e 2 recebem terapia imunossupressora com o intuito de diminuir a resposta imune através de células T alo-reativas, e a IL 2 tem um papel preponderante no crescimento e diferenciação das células T.

Em relação ao gene da IL 12, verificou-se um aumento significativo nos grupos 1 e 2 comparativamente com o grupo controlo, e o grupo 1 apresentou níveis mais elevados do que o grupo 2. A IL 12 é produzida pelas APCs de forma a promover as células Th1.

No gene IFN- $\gamma$ , verificou-se uma menor expressão no grupo 1, tendo diferença significativa com o nível de expressão obtido no grupo controlo. Esta citocina estimula apresentação de antígenos.

Iniciando a análise da expressão génica das citocinas Th2, não se observaram diferenças significativas entre os três grupos no gene da IL 4, sendo esta citocina responsável pelo direccionamento da diferenciação das células T naïve em células Th2.

Em relação ao gene que codifica a IL 6 verificaram-se níveis de expressão significativamente reduzidos nos grupos 1 e 2 em comparação com o grupo controlo. A IL 6 influencia a secreção de anticorpos.

No gene *IL 10*, os níveis de expressão nos grupos 1 e 2 foram significativamente mais baixos do que no grupo controlo. E o grupo 2 apresentou um nível de expressão mais elevado do que o grupo 1, com significado estatístico. O papel desta citocina prende-se, fundamentalmente, com a inibição da resposta Th1.

Os níveis de expressão do gene *TGF- $\beta$ 1* foram homogéneos entre os três grupos. Esta citocina está implicada na inibição da proliferação e funções efectoras das células T.

As células Th2 têm vindo a ser reportadas como tendo um papel protector no contexto da alotransplantação. Por outro lado, as células Th1 estão associadas a mecanismos de rejeição do aloenxerto (Nankivell e Alexander, 2010; Braza *et al.*, 2012; Moraes-Vieira *et al.*, 2012).

Em estudos anteriores foi demonstrado que genes caracterizadores de respostas pró-inflamatórias Th1 se encontram reduzidos em pacientes tolerantes. Adicionalmente, aproximadamente, 90% das citocinas pró-inflamatórias conhecidas estão sub-expressas em pacientes tolerantes comparando com pacientes com rejeição crónica. Também, observaram a não existência de diferenças na expressão de TGF- $\beta$ 1, contudo, este é

responsável pela regulação da função de parte dos genes do sangue periférico que diferenciam a tolerância da rejeição crónica (Brouard *et al.*, 2007; Braza *et al.*, 2012).

A análise dos genes relacionados com a presença das células Tregs tem merecido imensa atenção por parte dos investigadores na área da transplantação.

Neste trabalho verificou-se um nível de expressão do gene *FoxP3* significativamente mais elevado no grupo 1 do que no grupo 2. E ao efectuarmos a razão entre os níveis de expressão *FoxP3*/ $\alpha$ -1,2-manosidase, verifica-se que esta razão é mais baixa no grupo 2, sendo este grupo constituído, então, pelos transplantados com rejeição crónica. Sago *et al* também obtiveram uma razão dos níveis de expressão de *FoxP3*/ $\alpha$ -1,2-manosidase, substancialmente, mais baixos para pacientes transplantados renais com rejeição crónica comparando com os pacientes estáveis e tolerantes operacionais.

No caso das moléculas com actividade citotóxica, a Perforina, a Granzima B e o Fas-L, os níveis de expressão dos genes que codificam estas moléculas não apresentaram quaisquer diferenças significativas entre os grupos 1 e 2. Observando-se, apenas, níveis significativamente mais baixos, para os três genes, comparando os grupos 1 e 2, e o grupo controlo. Estes resultados farão algo sentido, no sentido em que uma expressão aumentada destes genes está associada à rejeição aguda do enxerto.

A expressão dos genes que codificam quimiocinas induzidas por IFN- $\gamma$ , a CXCL9 e a CXCL10, apresentaram características de expressão diferentes, no caso do gene *CXCL9*, a sua expressão não foi muito dispar entre os grupos 1 e 2. Já, no caso do gene *CXCL10*, o grupo 2 demonstrou níveis de expressão mais elevados comparando com o grupo 1.

A quimiocina CXCL10 encontra-se intimamente envolvida na patogénese da rejeição aguda e, está presente e pode estar envolvida na nefropatia crónica do enxerto, também (Romagnani e Crescioli, 2012).

Um estudo recente de análise de expressão génica, em células do sangue periférico, de pacientes com rejeição aguda do aloenxerto renal, demonstrou uma expressão de CXCL10 sobre-regulada, principalmente, em pacientes com fracas respostas à terapia anti-rejeição (Mao *et al.*, 2011).

As funções da quimiocina CXCL10 estão associadas aos processos inflamatórios, quimiotaxia e recrutamento de células Th1.

As quimiocinas CXCL9 e CXCL10 partilham características, nomeadamente, o facto de serem ambas induzidas por IFN- $\gamma$  e a sua expressão estar associada à rejeição aguda de aloenxertos com incompatibilidades MHC (Rosenblum *et al.*, 2009).

Assim, ao analisar a expressão destas quimiocinas nestes grupos de transplantados renais, pode-se especular que níveis de expressão mais elevados de CXCL10 estarão, também, associados a uma contínua disfunção do aloenxerto.

### **5.5. Expressão génica em subpopulações celulares**

Nas células Tregs, em primeiro lugar, foi analisada a expressão de um marcador principal deste tipo celular, o factor de transcrição FoxP3. O que se observou nos níveis de expressão deste gene foi uma semelhança entre o grupo 2 e o grupo controlo, não havendo, também, diferenças significativas entre os grupos 1 e 2. Os níveis de expressão foram significativamente mais baixos para o grupo 1 em comparação com o grupo controlo.

As células Tregs podem actuar directamente na atenuação da apresentação de antígenos pelas células dendríticas e funções co-estimulatórias (Wing *et al.*, 2008). Podem, também, suprimir directamente a activação de células T (Garin *et al.*, 2007; Bopp *et al.*, 2007). E podem criar um meio anti-inflamatório pela presença de TGF- $\beta$  ou IL 10 (Thornton e Shevach, 1998; Roncarolo *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2003).

Numa primeira abordagem, em estudos anteriores foi demonstrado que a expressão de FoxP3 seria feita, unicamente, em células Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) que ocorrem naturalmente no timo (nTregs) (O'Garra e Vieira, 2004).

E, relativamente, às populações de células, cuja actividade imunossupressora é induzida na periferia (iTregs), as células Th3 e as células Tr1, são as que apresentam importância ao nível da tolerância na transplantação. As células Tr1 são produtoras de IL 10 e não expressam FoxP3, inibem a proliferação de células T CD4<sup>+</sup> naïve. As células Th3 segregam, principalmente, TGF- $\beta$  (Schlickeiser e Sawitzki, 2012).

Então, o passo seguinte seria a análise da expressão destas duas citocinas, IL 10 e TGF- $\beta$ , responsáveis, em grande parte, pela actividade imunossupressora. Onde se

observou uma expressão significativamente elevada do gene TGF- $\beta$  no grupo 1 comparando quer com o grupo 2, quer com o grupo controlo. No caso do gene IL 10 não se verificaram diferenças nos níveis de expressão.

As células nTregs expressam uma molécula da superfície celular, CTLA4, que através da interacção via directa com as APCs induz uma sub-modulação das moléculas co-estimulatórias CD80/86 (Schlickeiser e Sawitzki, 2012). Analisando a expressão do gene que codifica esta molécula, obtiveram-se níveis de expressão semelhantes entre os grupos.

Estudos recentes sugerem que embora as células Th2 e as células Tregs pertençam a diferentes subgrupos da linhagem de células T CD4<sup>+</sup>, elas podem apresentar uma estreita relação. Relação essa devido a uma intercomunicação entre factores de transcrição no balanço entre Th2/iTregs (Chapoval *et al.*, 2010).

As células T CD4<sup>+</sup> naïve recebem os sinais através do TCR e de moléculas co-estimulatórias para iniciarem o seu processo de diferenciação. Assim, a IL 4 liga-se ao seu receptor (IL 4R do tipo I) presente na superfície das células T e induz a activação do STAT6, o qual leva à transcrição de GATA3 e suprime a transcrição de FoxP3. GATA3 controla o *locus* das citocinas Th2 e regula a transcrição de IL 5.

A ligação de TGF- $\beta$  ao seu receptor conduz à activação da família de factores de transcrição Smad. Em cooperação com os sinais do TCR e do IL 2R, Smad leva à transcrição do FoxP3, o qual regula a expressão de genes importantes para o fenótipo Treg.

GATA3 pode inibir a capacidade do FoxP3 em induzir genes Treg e, por outro lado, o FoxP3 pode inibir a acção do GATA3 em regular genes Th2 (Chapoval *et al.*, 2010).

O que se verificou ao nível da expressão do gene, que codifica o factor de transcrição GATA3, foi um aumento significativo da sua expressão no grupo 1 comparativamente ao grupo 2 e ao grupo controlo.

Actualmente, as atenções, ao nível de tolerância na transplantação, estão muito direccionadas para as células B. Uma vez feita a separação de duas subpopulações celulares, as células B de memória (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) e as células B naïve (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>), foi analisada a expressão génica de determinados genes, onde a obtenção hipotética de diferenças pudesse conduzir a uma possível distinção dos grupos de transplantados aqui estudados.

Começou-se pela análise da expressão de genes de citocinas imunomoduladoras, a IL 10 e o TGF- $\beta$ , que podem estar implicados na tolerância. Não se observaram diferenças entre os grupos, em nenhuma das duas subpopulações.

A molécula CD79b ao fazer parte do BCR despertou a curiosidade de se analisar a expressão do gene que a codifica. Também, não se obtiveram diferenças entre os grupos, em nenhuma das duas subpopulações.

E, por último, podendo a célula B desempenhar a função de APCs, foi feita a análise da expressão de uma molécula HLA Classe II, a molécula HLA-DRB1. Assim como em todos os outros genes analisados, não se obteve quaisquer resultados significativos entre os grupos nas duas subpopulações.

Como se pode verificar, na avaliação dos genes estudados para as populações de células B, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Uma das causas que pode ter estado na base, dos resultados obtidos, pode ter sido o facto de a média da percentagem de linfócitos B presentes nas amostras dos grupos 1 (4,83%) e 2 (3,01%) ser reduzida perante a média obtida para o grupo controlo (8,93%). Assim, a quantidade de células a partir da qual se extraiu o RNA condicionou e, de forma relevante, a análise da expressão génica nestes tipos celulares. É de salientar, também, que embora a análise da expressão génica do gene *IL 10* constitua um objectivo nas células B, esta análise noutros estudos tem sido conseguida através de prévia estimulação das células (Newell *et al.*, 2010).

Futuramente, poder-se-á analisar outros genes implicados na activação das populações de células B, uma vez que, estas deverão desempenhar um papel relevante no estabelecimento da disfunção/ rejeição crónica do enxerto. A produção de anticorpos anti-HLA mais elevada nos doentes do grupo 2, o comportamento das células B como APCs e, eventualmente, o seu papel regulador deverão ser aspectos a considerar no desenvolvimento de trabalhos futuros.



**Capítulo 6.**

**Conclusões**

A tolerância ao aloenxerto constitui o *Santo Graal* na imunologia da transplantação. O conhecimento dos mecanismos base implicados na tolerância ao transplante pode promover a identificação de biomarcadores predictivos na monitorização da evolução do enxerto.

Após a realização deste trabalho ficou evidente, mais uma vez, a relação entre a presença de anticorpos e rejeição/ disfunção do aloenxerto, sobretudo de anticorpos anti-HLA Classe II. Apesar dos grupos de doentes que participaram neste trabalho apresentarem um número semelhante de incompatibilidades HLA.

A avaliação da presença de anticorpos nos soros dos doentes não ficou completa, além do “screening” e da realização do “Single-Antigen Assay”, cujos resultados não foram apresentados neste trabalho, ficou suspensa uma extensa análise, na qual se tentaria descobrir se os anticorpos presentes seriam ou não específicos para o dador.

Relativamente, ao estudo do perfil farmacogenético dos doentes, na tentativa de os classificar como melhores ou piores metabolizadores de fármacos imunossupressores, verificaram-se frequências dos SNPs estudados semelhantes entre o grupo da função estável dez anos após transplante e o grupo dos doentes com disfunção/ rejeição crónica.

Assim, pode-se concluir que a distribuição das frequências dos SNPs ao serem idênticas nos dois grupos, não tiveram influência nas manifestações de disfunção crónica do enxerto.

Na determinação do grau de mistura celular (quimerismo) no sedimento urinário, a conclusão a que se chegou foi que estava presente uma igual contribuição das células do rim e células do próprio nos dois grupos.

Em termos de expressão génica em células do sedimento urinário conclui-se que a contribuição da expressão de genes que codificam moléculas com actividade citotóxica, a Perforina e a Granzima B, apontadas como bons indicadores de rejeição aguda, não serão em casos de rejeição/ disfunção crónica. Logo, a contribuição de células T citotóxicas para a rejeição/ disfunção crónica do aloenxerto parece não ser relevante.

No caso da análise da expressão, ainda no sedimento urinário, dos genes que codificam as quimiocinas CXCL10 e CXCL9, os resultados obtidos poderão ser indicadores de um processo onde haverá algum envolvimento da célula T na disfunção crónica do enxerto (grupo 2).

Os níveis da expressão do gene *TGF-β1* ao serem mais elevados no grupo 2, tendem a demonstrar o envolvimento da transição tubular epitelial-mesenquimal na perda progressiva da função do aloenxerto, na qual o TGF-β1 apresenta um papel regulador.

Já nas células do sangue periférico, avaliando a expressão génica de genes como *CD79B*, *TCL1A*, *SH2D1B*, *MS4A1* e *SLC8A1* conclui-se que os resultados obtidos poderão ser indiciadores da obtenção de algum grau de tolerância nos doentes estudados, apesar do grupo de doentes com função normal do enxerto dez anos após o transplante continuar sujeito a uma terapêutica imunossupressora de manutenção.

Em termos de citocinas Th1 e Th2, os resultados obtidos não são muito informativos na medida em que, não se encontraram grandes diferenças entre os dois grupos de doentes, tendo sempre em conta, que os doentes estão sob efeito de imunossupressores.

Relativamente, aos resultados obtidos na expressão do gene que codifica o factor de transcrição FoxP3, característico das células Tregs, permitem confirmar, uma vez mais, indícios de algum grau de tolerância no grupo de doentes com função renal estável há mais de dez anos. Confirmando, também, o envolvimento das células Tregs na tolerância ao aloenxerto.

Nas células do sangue periférico, também não se obtiveram níveis de expressão diferentes para os genes codificantes de moléculas com actividade de citotóxica (Granzima B, Perforina e Fas-L) entre os grupos de doentes. Corroborando a hipótese da baixa contribuição das células T citotóxicas para rejeição/ disfunção crónica do enxerto.

No caso da quimiocina CXCL10, os níveis de expressão do gene que a codifica poderão permitir uma distinção entre os grupos.

E, por último, na expressão génica em subpopulações celulares, os resultados obtidos nas células Tregs, nomeadamente, nos níveis de expressão do gene *TGF-β1*, poderão confirmar, novamente, o papel imunomodulador deste tipo celular na manutenção da tolerância ao transplante.

Este trabalho pretendeu estabelecer as bases de estudo dos mecanismos e moléculas envolvidos no processo de disfunção/ rejeição crónica do enxerto renal. A caracterização humoral, celular, genética e genómica, e os resultados aqui obtidos, apesar de muito preliminares, poderão fornecer sugestões para aprofundar os

mecanismos que possam estar na base do estabelecimento do estado de tolerância ou da disfunção crónica e avaliar o seu valor predictivo.

Assim, todo o trabalho realizado visou contribuir para a possível monitorização da evolução do transplante sem recorrer a procedimentos invasivos e, principalmente, qual a contribuição de determinadas características na longevidade do enxerto. Mas, convém frisar, uma vez mais, que a contribuição deste trabalho é muito pequena, perante a complexidade dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de tolerância *versus* rejeição/ disfunção.

Na sequência deste trabalho recorrendo às amostras dos doentes, que participaram neste estudo e se encontram armazenadas, nomeadamente, as restantes subpopulações celulares, pois de nove subpopulações apenas três foram estudadas, e amostras de urina, muitos outros estudos se perspectivam. Nas amostras de urina, por exemplo, poderá ser feita a quantificação de uma proteína indicadora da ocorrência da transição tubular epitelial-mesenquimal, a vimentina. E ao nível das restantes populações celulares, a análise da expressão génica em cada uma delas será um factor adicional, para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no desencadear de um estado de tolerância ou de disfunção crónica do enxerto.

**Capítulo 7.**

**Bibliografía**

Adalid-Peralta, Laura, Fragoso, Gladis, Fleury, Agnes and Sciutto, Edda (2011). Mechanisms underlying the induction of regulatory T cells and its relevance in the adaptive immune response in parasitic infections. *Int. J. Biol. Sci.* 7(9), 1412 – 1426.

Adams, Andrew B. and Newell, Kenneth A., (2012). B cells in clinical transplantation tolerance. *Seminars in Immunology* 24, 92 – 95.

Alachkar, Nada, Rabb, Hamid, Jaar, Bernard G. (2011). Urinary biomarkers in acute kidney transplant dysfunction. *Nephron Clin Pract* 118, c173 – c181.

Baxter-Lowe, Lee Ann and Busch, Michael P. (2006). DNA microchimerism and organ transplant rejection. *Clinical chemistry* 52 (4): 559-561

Bharat, Ankit and Mohanakumar, T. (2007). Allopeptides and the alloimmune response. *Cellular Immunology* 248, 31 – 43.

Billen, Evy V.A. (2011); HLA antibodies detection and clinical relevance. *Universitaire Pers Maastricht*.

Bonventre, Joseph V. (2009). Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. *Nephrol Dial Transplant* 24, 3265 – 3268.

Bopp, T. *et al* (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 204, 1303-1310.

Braza, Faouzi, Soulillou, Jean-Paul and Brouard, Sophie (2012). Gene expression signature in transplantation tolerance. *Clinica Chimica Acta* 413, 1414 – 1418.

Brouard, S., Mansfield E., Braud, C., et al (2007). Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(39), 15448 – 15453.

Carpenter, C.B. (1995). Long-term failure of renal transplants: adding insult to injury. *Kidney Int* 50, S40 – S44.

Chang, Alexander T. and Platt, Jeffrey L. (2009). The role of antibodies in transplantation. *Transplantation reviews* 23, 191 – 198.

Chapoval, Svetlana *et al* (2010). Regulation of the T helper cell type 2 (Th2)/T regulatory cell (Treg) balance by IL-4 and STAT6. *Journal of Leukocyte Biology* 87, 1011 – 1018.

Chen, W., *et al* (2003). Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> - naïve T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor FoxP3. *J Exp Med* 198, 1875 – 1886.

Cornell, Lynn D., Smith, R. Neal and Colvin, Robert B. (2008). Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *Annual Rev. Pathol. Mech. Dis.* 3, 189 – 220.

Cravedi, Paolo and Mannon, Roslyn, B. (2009). Noninvasive methods to assess the risk of kidney transplant rejection. *Expert Rev Clin Immunol.* 5(5), 535 – 546.

Dias, Esther Cristina Aquino, Camara, Niels Olsen Saraiva *et al* (2005). Monitorização molecular da rejeição de transplantes renais. *J Bras Nefrol* 27 (2): 76 – 83.

Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* 42, 1007 – 1017.

Duquesnoy, R.J. (2008). Clinical usefulness of HLAMatchmaker in HLA epitope matching for organ transplantation. *Curr Opin Immunol* 20: 594 – 601.

Einecke, G., Sis, B., Reeve, J., Mengel, M., Campbell, P.M. *et al* (2009). Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant* 9, 2520 – 2531.

Felipe, C. Rosso, Veras de Sandes, T., Sampaio, E. L. Mandia *et al* (2009). Clinical impact of polymorphisms of transport proteins and enzymes involved in the metabolismo of immunossuppressive drugs. *Transplantation Proceedings* 41, 1441 – 1455.

Feucht, Helmut E. and Opelz, Gerhard (1996). The humoral immune response towards HLA class II determinants in renal transplantation. *Kidney international* 50, 1464 – 1475.

Garin, M.I., Chu C.C., *et al* (2007). Galectin 1: a key effector of regulation mediated by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Blood* 109, 2058 – 2065.

Halloran, Philip F. (2004). Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 351, 2715 – 2729.

Heidt, Sebastiaan, Segundo, David San, Shankar, Sushma, *et al* (2011). Peripheral blood sampling for the detection of allograft rejection: biomarker identification and validation. *Transplantation* 92, 1 – 9.

Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., *et al* (2000). Functional polymorphisms of the human multi-drug resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3473- 3478.

Huehn, Jochen, Polansky, Julia K., Haman, Alf (2009). Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nature reviews Immunology* 9, 83 – 89.

Issa, N., Cosio, F.G., Gloor, J.M. *et al* (2008). Transplant glomerulopathy: risk and prognosis related to anti-human leukocyte antigen class II antibody levels. *Transplantation* 86, 681 – 685.

Jain, Sunjay, Furness, Peter N., Nicholson, Michael L. (2000). The role of transforming growth-factor beta in chronic renal allograft nephropathy. *Transplantation* 69 (9), 1759 – 1766.

Jiang, Shuiping (2008). *Regulatory T cells and clinical application*. Springer



Joosten, Simone A., Sijpkens, Yvo W.J., Kooten, Cees Van, Paul, L. C. (2005). Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. *Kidney International* 68, 1 - 13.

Kalluri, Raghu and Neilson, Eric G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* 112, 1776 – 1784.

Kalra, B.S. (2007). Cytochrome P450 enzyme isoforms and their therapeutic implications: an update. *Indian J Med Sci* 61:102.

Kamoun, Malek (2001); Cellular and molecular parameters in human renal allograft rejection. *Clinical biochemistry* 34, 29-34.

Kasiske, B.L., Kalil, R. S., Lee, H.S., Rao, K.V. (1991). Histopathologic findings associated with a chronic, progressive decline in renal allograft function. *Kidney Int* 40, 514 – 524.

Kimchi-Sarfaty, Chava et al (2007). A “silent” polymorphism in the *MDR1* gene changes substrates specificity. *Science* 315, 525 – 528.

Konieczny, B. *et al* (1998). IFN- $\gamma$  is critical for long-term allograft survival induced by blocking the CD28 and CD40 ligand T-cell costimulation pathways. *J. Immunol.* 160, 2059 – 2064.

Kuby, J., Kindt T.J., Goldsby R.A., Osborne B.A (2003). *Immunology*. 5<sup>th</sup> edition. W.H. Freeman and Company. New York

Kuehl, Peter, Zhang, Jiong, Lin Y., Lamba, J., Assem, M. *et al* (2001). Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nature genetics* 27, 383 – 391.

Lee, B., Oh, C.K., Kim, J.H., Kim, S.J., Kim, H.S. and Shin, G.T. (2012). Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells during acute renal allograft rejection. *Transplantation Proceedings* 44, 236 – 240.

Leitão, T. G., Becker, L. E., *et al* (2006). Expression of cytotoxic mediators (perforin, granzyme B, FAS and FAS-l) in renal allograft biopsies. *Einstein* 4(4): 277 – 283.

Li, Baogui *et al* (2001). Noninvasive diagnosis of renal allograft rejection by measurement of Messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* 344 (13), 947 – 954.

Liu, Youhua; (2004). Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention. *J Am Soc Nephrol* 15; 1 – 12.

Malhotra, Prashant (2011). Immunology of transplant rejection. *Drugs, Diseases & Procedures*

Manfro, R. C., Gonçalves, L. F. S., Saitovitch, David (1999). Revisão/ Atualização em transplante renal: progressos na indução de tolerância em transplantes renais. *J. Bras. Nefrol.* 21, 130 – 142.

Mannon, Roslyn B. (2010). Immune monitoring and biomarkers to predict chronic allograft dysfunction. *Kidney Int.* 78 (Suppl 119), S59 – S65.

Mao, Y., Wang, M., Zhou, Q. *et al* (2011). CXCL10 and CXCL13 expression were highly upregulated in peripheral blood mononuclear cells in acute rejection and poor response to anti-rejection therapy. *J Clin Immunol* 31, 414 – 418.

Masuda, Satohiro and Inui, Ken-ichi (2006). An up-date review on individualized dosage adjustment of calcineurin inhibitors in organ transplant patients. *Pharmacology & Therapeutics* 112, 184 – 198.

Mechanisms underlying the induction of regulatory T cells and its relevance in the adaptive immune response in parasitic infections. *Int. J. Biol. Sci.* 7(9), 1412 – 1426.

Mendes, J., Martinho, A., Simões, O., Mota, A., Breitenfeld, L. and Pais, L. (2009). Genetic polymorphisms in *CYP3A5* and *MDR1* genes and their correlations with plasma

levels of Tacrolimus and Cyclosporine in renal transplant recipients. *Transplantation Proceedings* 41, 840 – 842.

Montgomery, Robert A., Cozzi, Emanuele, West, Lori J., Warren, Daniel S. (2011). Humoral immunity and antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. *Seminars in Immunology* 23, 224 – 234.

Moraes-Vieira, Pedro Manoel M., Takenaka, M. C. S., Silva, H. M. *et al* (2012). *GATA3* and a dominant regulatory gene expression profile discriminate operational tolerance in human transplantation. *Clinical Immunology* 142, 117 – 126.

Muthukumar, Thangamani, Dadhania, D., Ding, R. *et al*. (2005). Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 353, 2342 -2351.

Nakamura, T., Miller, D., *et al* (1992). Production of extracellular matrix by glomerular epithelial cells is regulated by transforming growth factor-beta 1. *Kidney Int* 41, 1213 – 1221.

Nankivell, Brian J. and Alexander, Stephen (2010). Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med* 363, 1451 – 1462.

Newell, Kenneth A., Asare, Adam, Kirk, Allan D., *et al*. (2010). Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 120(6), 1836 – 1847.

O'Garra, A. and Vieira, P. (2004). Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 10, 801 – 805.

Opal, Steven M. and DePalo, Vera A. (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117, 1162 – 1172.

Paul, L.C. (1995). Chronic renal transplant loss. *Kidney Int* 47, 1491 – 1499.

Pereira, A. B. *et al* (2009). Citocinas e quimiocinas no transplante renal. *J Bras Nefrol* 31 (4), 286 – 296.

Pribylova-Hibrova, P., Kotsch, K. *et al* (2006). TGF- $\beta$ 1 mRNA upregulation influences chronic renal allograft dysfunction. *Kidney Int.* 69, 1872 – 1879.

Priyadharshini, Bhavana, Greiner, Dale L., Brehm, Michael A. (2011). T-cell activation and transplantation tolerance. *Transplantation reviews.*

Roedder, Silke *et al* (2011). Biomarkers in solid organ transplantation: establishing personalized transplantation medicine. *Genome Medicine* 3:37.

Romagnani P, Crescioli C, CXCL10: A candidate biomarker in transplantation, *Clin Chim Acta* (2012), doi: 10.1016/j.cca.2012.02.009.

Roncarolo, M.G., Gregori, S., *et al* (2006). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212, 28 – 50.

Rose, Marlene L. and Hutchinson, Ian (2006). Transplant immunology I: immunological mechanisms of graft injury. *Basic Science, Surgery* 24:2, 47 – 52.

Rosenblum, Joshua M., Shimoda, Naohiko *et al* (2009). CXC Chemokine ligand (CXCL) 9 and CXCL10 are antagonistic costimulation molecules during the priming of alloreactive T cell effectors. *The Journal of Immunology* 184, 3450 – 3460.

Sagoo, Pervinder, Perucha, E., Sawitzki, B., Tomiuk, S., Stephens, D. A. *et al* (2010). Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 120 (6): 1848 – 1861.

Sawitzki, Birgit *et al* (2011). Monitoring tolerance and rejection in organ transplant recipients. *Biomarkers* 16(S1), S42 –S50.

Sayegh, Mohamed H. and Turka, Laurence A. (1998); The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *Mechanisms of disease* 338, 35, 1813 – 1821.

Schlickeiser, Stephan and Sawitzki, Birgit (2012). Peripheral biomarkers for individualizing immunosuppression in transplantation – regulatory T cells. *Clinica Chimica Acta* 413, 1406 – 1413.

Shuker, N., *et al* (2011). ATP-binding cassette transporters as pharmacogenetic biomarkers for kidney transplantation. *Clin Chim Acta*, doi: 10.1016/j.cca.2011-09-040.

Somasundaran, Murali and Quiroga, Isabel (2011). Principles in transplantation: immunology. *Basic science, Surgery* 29:7, 295 – 300.

Tanble, K., Takahashi, K., Toma, H. (1996). Causes of long-term graft failure in renal transplantation. *World J Urol* 14, 230 – 235.

Tatapudi, R. R., Muthukumar T., *et al* (2004). Noninvasive detection of renal allograft inflammation by measurements of mRNA for IP-10 and CXCR3 in urine. *Kidney Int* 65, 2390 – 2397.

Taylor, Anna L., Watson, Cristopher J. E. and Bradley, J. Andrew (2005). Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Critical reviews in Oncology/Hematology* 56, 23 – 46.

Thaunat, Olivier (2012). Humoral immunity in chronic allograft rejection: puzzle pieces come together. *Transplant immunology* 26, 101 – 106.

Thornton, A.M., Shevach, E.M. (1998). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188, 287 – 296.

Turolo, Stefano, Tirelli, Amedea S. *et al* (2010). Frequencies and roles of CYP3A5, CYP3A4 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms in italian teenagers after kidney transplantation. *Pharmacological reports* 62, 1159 – 1169.

Wallace, Catherine J. and Kingsmore, David B. (2006). Transplantation and immunosuppressive therapy. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* 7:6, 196 – 199.

Wang, Danxin, Johnson, A. D., Papp, A. C. *et al* (2005). Multidrug resistance polypeptide 1 (*MDR1*, *ABCB1*) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenetics and Genomics* 15, 693 – 704.

Wing, K., *et al* (2008). CTLA4 control over FoxP3+ regulatory T cell function. *Science* 322, 271 – 275.

Wood, Kathryn and Sakaguchi, Shimon (2003). Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nature reviews Immunology* 3, 199 – 210.