

**U. PORTO**



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO

**Artigo de Revisão Bibliográfica  
Mestrado Integrado em Medicina**

**MÉTODOS NÃO INVASIVOS DE AVALIAÇÃO DO RISCO DE  
REJEIÇÃO DO ENXERTO RENAL**

MARIA INÊS CARDOSO MAGALHÃES

**Orientador(a): Dr<sup>a</sup> Manuela Almeida**

**Grau Académico: Licenciatura em Medicina**

Porto 2011

## **Resumo**

O transplante renal é o procedimento de eleição para o tratamento de doentes com insuficiência renal crónica terminal. Apesar dos avanços nesta área, e dos protocolos imunossupressores a que os doentes transplantados são sujeitos, a rejeição do enxerto, continua a ser um dos principais problemas com que os clínicos se deparam no seguimento destes doentes. A imunossupressão é necessária durante toda a vida do enxerto, e, como tal, acarreta múltiplas complicações. O diagnóstico de rejeição baseia-se, essencialmente, na clínica com avaliação da função renal, e na biópsia como método confirmatório do diagnóstico. Pelo facto da biópsia ser um procedimento invasivo com riscos para o doente e para o enxerto, outras alternativas menos invasivas ou não invasivas, têm sido investigadas. A expansão dos conhecimentos e o desenvolvimento de novas técnicas em biologia celular e molecular estão a revolucionar o entendimento da fisiopatogenia de diversas condições associadas à disfunção e rejeição do enxerto, possibilitando diagnósticos mais precisos e precoces. A utilização de biomarcadores capazes de dar informação sobre o status imunológico do doente, a aloreactividade das células envolvidas na resposta imunológica ou ainda o peso de alguns genes, têm sido largamente estudados, recorrendo a material biológico, como o sangue ou a urina, de fácil acesso e reprodutibilidade. Infelizmente, até agora nenhum biomarcador mostrou ser por si só, suficientemente fidedigno no diagnóstico e na avaliação do risco de rejeição do enxerto renal. A utilização de vários destes marcadores em conjunto, tem sido alvo de investigação, tendo em vista a sua introdução na prática clínica e a diminuição da necessidade de realização de biopsias renais.

## **Palavras-chave**

biomarcador; rejeição do transplante; métodos não invasivos; monitorização imune; frequência de células T

## **Abstract**

Kidney transplant is the procedure of choice for the treatment of patients with chronic renal failure. Despite advances in this procedure and immunosuppression protocols that are compulsory in all transplant recipients the risk of kidney rejection was not eliminated. Immunosuppression is necessary throughout life, but this leads to multiple complications. The diagnosis of acute rejection is confirmed by biopsy which is an invasive procedure. Because the biopsy is an invasive procedure with risks to the patient and the graft, other less invasive alternatives or non-invasive have been investigated. The expansion of knowledge and the development of new techniques in cell and molecular biology are revolutionizing the understanding of the pathogenesis of several conditions associated with graft dysfunction, enabling more accurate and precocious diagnosis. The use of biomarkers can provide information on the immune status of the patient, the reactivity of cells involved in immune response gene or the weight of some genes have been widely studied, using biological material such as blood or urine, easy access and repeatability. Unfortunately, so far no biomarker has proved itself sufficiently reliable in the diagnosis and assessment of the risk of kidney graft rejection. The use of several of these markers together has been the subject of research, with a view to its introduction into clinical practice as much as possible and reducing the need for biopsy.

## **Keywords**

biomarkers; transplant rejection; noninvasive methods; immune monitoring; T cells frequency

## **Agradecimentos**

Agradeço à minha Família e Amigos, que sempre me acompanharam, principalmente ao longo dos últimos seis anos.

À minha orientadora da Tese, Dr<sup>a</sup> Manuela Almeida, por todo o tempo disponibilizado, orientação e motivação prestados.

À Dr<sup>a</sup> Paula Xavier, por toda a disponibilidade, ajuda e incentivo na compreensão do tema desenvolvido.

<b>I. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>II. Biomarcadores não invasivos Clássicos</b>	
1. Creatinina	3
2. Cistatina C	4
3. Anticorpos anti-HLA	5
4. Ensaio de hipersensibilidade retardada (DTH)	6
<b>III. Biomarcadores não invasivos Inovadores</b>	
<b>1. SANGUE PERIFÉRICO</b>	
1.1. Aloreactividade como marcador do <i>status</i> imunológico	
1.1.1. Reacção linfocitária mista (MLR)	7
1.1.2. Ensaio de diluição limitante (LDA)	8
1.1.3. Ensaio de ELISPOT	8
1.1.4. Ensaio de citotoxicidade directa (CML)	8
1.1.5. Ensaio funcional Cycles™ ImmunoKnow <sup>R</sup>	9
1.2. Perfil fenotípico e genético na monitorização da aloreactividade	
1.2.1. Perfil fenotípico	9
1.2.1.1. Células T reguladoras e FoxP3	10
1.2.1.2. CD127	11
1.2.2. Perfil genético	12
<b>2. SORO</b>	
2.1. Anticorpos anti-MICA	13
2.2. Anticorpos anti-endotélio	13
2.3. CD30 solúvel (sCD30)	14
2.4. Óxido nítrico (ON)	15
2.5. IL-2 e IFN $\gamma$	16
<b>3. URINA</b>	
3.1. mRNA da perforina e granzima B e CD103	17
3.2. IP-10 e CXCR3	17
3.3. PD-1:PD-L1/PD-L2	18
3.4. Fracções ou fragmentos proteicos - MICRO RNAs (miRNAs)	18
<b>IV. Monitorização imunológica para melhor interpretação da biópsia</b>	<b>20</b>
<b>V. Conclusão</b>	<b>22</b>
<b>VI. Bibliografia</b>	<b>23</b>

## I. Introdução

Embora os doentes com Insuficiência Renal Terminal possam ser mantidos com terapia dialítica, a melhor sobrevivência e qualidade de vida do doente torna o transplante renal como o método preferido de substituição da função renal. Em Dezembro de 1954, foi realizado o primeiro transplante renal com sucesso entre gémeos idênticos.<sup>(1)</sup>

Apesar da experiência médica e cirúrgica adquirida ao longo dos anos na manipulação de doentes transplantados, a utilização de fármacos imunossupressores continua a ser a única forma de controlar a perda do aloenxerto renal por rejeição. A rejeição aguda observa-se, essencialmente, nos primeiros meses pós-transplante e, embora seja tratada com sucesso na maioria dos casos, a sua ocorrência está associada ao desenvolvimento de rejeição crónica, responsável pela perda do órgão a médio e a longo prazo.<sup>(2)</sup>

A terapia imunossupressora continuada é nociva, causa nefropatia, alterações metabólicas, e maior propensão a infecções e neoplasias. Contudo, a sua sub-utilização leva à disfunção e perda do enxerto renal.<sup>(3)</sup>

Com o aumento e generalização do transplante, a necessidade de monitorizar pacientes imunodeprimidos, de diagnosticar situações de rejeição e de determinar quais as causas de disfunção do aloenxerto, constituem um desafio para os clínicos e para outros profissionais de saúde.<sup>(4)</sup> A biópsia é o método *gold standard* para diagnosticar a rejeição de enxerto.<sup>(5)</sup> Para além de identificar rejeição aguda ou crónica, com componente preferencialmente celular ou humoral, ainda permite identificar outras causas da disfunção, como toxicidade dos agentes imunossupressores, doença recorrente, e infecção por poliomavirus BK.<sup>(6)</sup>

Contudo, apesar da sua reconhecida utilidade, a biópsia renal tem riscos. As complicações major podem ser definidas como aquelas que necessitam de um procedimento invasivo durante ou após a realização da biópsia como transfusão sanguínea, embolização ou cirurgia. Depois da biópsia, as complicações mais frequentes consistem em hemorragias, que aparecem como hematúria macroscópica ou sob a forma de hematoma. Num estudo de 508 doentes, a taxa de hospitalização após biópsia em transplantados renais foi de 1.9%. Neste grupo verificou-se, 1% de complicações major, 0,3% necessitaram de transfusões de sangue e 0,7% de algaliação devido à presença de trombos no tracto urinário. As fístulas arterio-venosas são também uma complicação frequente.<sup>(7)</sup> Num estudo, 5-8% dos pacientes desenvolveram fístula após a realização de biópsia pós-transplante renal. Para além disso, as biópsias apresentam limitações, que incluem a presença de infiltrados de

células inflamatórias, dificuldade em distinguir a infecção por políomavirus da rejeição aguda celular, e a impossibilidade de distinguir as diferentes causas de nefropatia crónica<sup>(4)</sup>.

Na prática actual, a monitorização imunológica e citotóxica dos enxertos renais é feito através da quantificação sérica dos níveis de imunossuppressores, pela avaliação da função renal, através dos níveis da creatinina sérica e, sempre que houver suspeita de rejeição ou de toxicidade, pela avaliação histológica do enxerto, segundo os critérios de Banff.<sup>(2)</sup>

A creatinina foi identificada como um forte predictor de sobrevivência do transplante, mas os seus valores podem estar falsamente elevados, por exemplo, devido ao uso de imunossuppressores como a ciclosporina e o tacrolimus.<sup>(8)</sup> Há uma forte correlação entre os níveis séricos de creatinina aos três e aos seis meses pós-transplante, com a sobrevivência do enxerto renal no primeiro ano.<sup>(9)</sup> De forma semelhante, aumentos de creatinina de >0,5 ou >1,0 mg/dL nas primeiras seis semanas após rejeição aguda, estão correlacionados com a disfunção do enxerto.<sup>(10)</sup> Contudo a creatinina sérica é um indicador insensível de disfunção renal por traduzir tardiamente uma perda funcional importante por causas não detectadas. Além disso, na ausência de quaisquer alterações da creatinina sérica, até um terço dos enxertos irá demonstrar sinais histológicos de rejeição aguda nos primeiros três meses pós-transplante. Estas são as rejeições subclínicas, que, se não forem tratadas atempadamente afectam a sobrevivência do órgão.<sup>(2)</sup>

Tendo em conta toda esta problemática, mais testes, idealmente não invasivos, com elevada especificidade e sensibilidade, capazes de detectar precocemente situações de rejeição, ou outras, são necessários para que se possa intervir especificamente e o mais precocemente possível. A pesquisa de marcadores de alorreactividade, citotoxinas, quemocinas e citocinas na urina e no sangue apresentam-se como possíveis métodos ideais.<sup>(3)</sup>

Outros marcadores incluem expressão de genes e de proteínas que devem ser pesquisados no sangue periférico, na urina e no próprio enxerto, todos eles locais de alorreactividade.<sup>(4)</sup>

Actualmente, os biomarcadores utilizados em transplantação renal podem ser divididos em dois grandes grupos: os clássicos e os inovadores. Ambos vão ser alvo de revisão neste artigo.

## II. Biomarcadores não invasivos Clássicos

### 1. Creatinina

Actualmente, a monitorização da rejeição aguda reside, essencialmente, na repetição seriada da creatinina sérica. A maioria dos episódios de rejeição ocorre nos primeiros seis meses após o transplante, ocorrendo a maioria, muito precocemente, logo após a cirurgia. As rejeições após os seis meses são, tipicamente, devido ao não cumprimento da terapêutica ou a reduções drásticas da imunossupressão. Para ajudar a detectar tais eventos, a monitorização frequente dos níveis de creatinina sérica é essencial. O perfil da tensão arterial e a proteinúria podem também ajudar, mas não são específicos para rejeição do enxerto. Imediatamente após a transplante são pedidas análises diárias com determinação da creatinina sérica e nos primeiros meses mantida uma periodicidade elevada de monitorizações.<sup>(14)</sup>

Nos primeiros tempos pós transplante as medições da creatinina devem ser frequentes:<sup>(15)</sup>

- Duas vezes por semana no primeiro mês pós-transplante;
- Semanalmente no segundo mês;
- Quinzenalmente no terceiro e quarto mês;
- Mensalmente, do quinto mês ao décimo segundo;
- Bimensalmente ao longo do segundo ano pós transplante;
- Trimestralmente a partir do terceiro.

Os doentes com risco elevado de rejeição renal aguda devem ser submetidos a uma vigilância particularmente cuidada. Normalmente, aumentos de creatinina de >0,5 ou >1,0 mg/dL nas primeiras seis semanas após transplante estão correlacionados com a disfunção do enxerto renal. Num estudo, transplantados que tinham valores de creatinina sérica entre 0,5 a 1,5 mg/dL tinham sobrevida média de 11,5 anos, enquanto que os doentes com valores compreendidos entre 1,6 e 2,5 mg/dL e > 2,5 mg/dL, apresentaram uma sobrevida de 9,6 e 7,2 anos, respectivamente.<sup>(16)</sup>

Embora a creatinina seja o marcador mais amplamente utilizado, não é sensível para lesão renal.<sup>(14)</sup> Por exemplo, os seus valores podem estar falsamente aumentados pelo uso de ciclosporina ou do tacrolimus, imunossupressores usados na terapêutica pós-transplante.<sup>(16)</sup> Apesar da creatinina ser usada como marcador de preferência para avaliar a função renal, por ser um produto metabólico do tecido muscular, a sua concentração é influenciada pela idade, sexo e massa muscular, o que representa uma grande desvantagem.<sup>(21)</sup> Além disso, é pouco sensível na detecção de pequenas diminuições na taxa de filtração glomerular.<sup>(22)</sup>

O doente transplantado está sujeito a mudanças do estado nutricional e catabólico pelos eventuais eventos de infecção e rejeição, além do uso crónico de corticosteróides, que, todos juntos, reduzem a massa muscular e, portanto, a redução da creatinina. Isto explica em parte os erros de estimação da taxa de filtração glomerular através da creatinina.<sup>(24)</sup>

## **2. Cistatina C**

A cistatina C é uma proteína básica não-glicosada. Tem como função regular a actividade das cisteínas proteinases e parece ser o inibidor principal da cisteína proteinase.<sup>(17)</sup> É encontrada em diversos fluidos biológicos humanos.<sup>(18)</sup>

Tem sido proposta como marcador de lesão renal por ser muito sensível às alterações da taxa de filtração glomerular. É produzida em taxa constante por células nucleadas, é filtrada no glomérulo e quase completamente reabsorvida e catabolizada por células renais do túbulo proximal.<sup>(19)</sup>

Nalguns estudos o valor da cistatina C no soro parece ser um melhor marcador de taxa de filtração glomerular do que a creatinina sérica.<sup>(20)</sup> Ao contrário da creatinina, os níveis séricos de cistatina C não são afectados pela massa muscular e alteram-se muito pouco com a idade, representando isto uma grande vantagem.

Muitos estudos indicam que a cistatina C possa ser usada como preditora da taxa de filtração glomerular. A quantificação da cistatina C tem sido aclamada como um teste rápido, acessível e de grande sensibilidade diagnóstica também no transplante renal.<sup>(24)</sup>

Num estudo que envolveu 30 transplantados renais, *Risch e al* identificaram uma melhor correlação entre a taxa de filtração glomerular e a cistatina C do que com a creatinina.<sup>(25)</sup> Num estudo pediátrico, conclui-se que os níveis séricos de cistatina C podem ter interesse em doentes nos quais os níveis de creatinina possam estar afectados.<sup>(28)</sup> Há, ainda, estudos que identificam algumas limitações do uso dos níveis séricos da cistatina, como idade avançada, sexo masculino, fumadores, obesos, alterações da função tiróideia e níveis altos de proteína C reactiva.<sup>(26)</sup> Para além disso, estudos recentes evidenciam que os níveis de Cistatina C são afectados pela corticoterapia.<sup>(21)</sup> Em doentes transplantados e em situações de rejeição aguda, foram relatados níveis altos de Cistatina C sérica e subestimação da taxa de filtração glomerular. Não há evidência de que a terapia imunossupressora altere os níveis de cistatina C, a não ser com a ciclosporina, que parece diminuir os seus valores.<sup>(27)</sup>

Apesar de ser um bom marcador da função renal, apresenta como principal desvantagem o seu custo mais elevado face à determinação da creatinina sérica, fazendo com que seja difícil a sua inserção em testes laboratoriais rotineiros.

### **3. Anticorpos anti-HLA**

A resposta humoral a aloantígenos desempenha um papel importante nas rejeições aguda e crónica do enxerto renal.<sup>(25)</sup> A detecção de aloanticorpos é um teste imunológico importante, não só na selecção do par dador-receptor, mas também no pós-transplante, na detecção e identificação da presença de anticorpos anti-HLA (Human Leucocitary Antigen) “*de novo*”. Para além disso, a determinação da especificidade dos anticorpos – se são específicos do dador (DSA) ou não (NDSA) – bem como a sua quantificação ao longo do tempo, adquirem especial relevo, não só pelos possíveis danos tecidulares que causam, mas também para orientar o clínico quanto a uma possível intervenção imunossupressora específica.<sup>(26)</sup>

Num estudo retrospectivo, multicêntrico, a presença destes anticorpos antes do transplante, foi associada a uma pior função tardia do enxerto e a um aumento do número de episódios de rejeição aguda, durante os primeiros três meses, assim como foi relacionado com o risco aumentado de perda do enxerto nos primeiros três anos.<sup>(27)</sup> Também, a maioria dos pacientes com rejeição crónica do enxerto apresentam títulos elevados de anticorpos anti-HLA, sendo que o intervalo entre o aparecimento destes e a falência do transplante pode ser de cerca de um ano.<sup>(2)</sup>

Sabe-se que cerca de 30% dos candidatos a transplante renal têm anticorpos anti-HLA em circulação e o aparecimento destes relaciona-se com transfusões sanguíneas, infecções, patologias auto-imunes, transplantes prévios e, ainda, com a gravidez, no caso das mulheres.<sup>(28)</sup> Um estudo de *Lefaucher* relacionou a quantidade de anticorpos pré-transplante com a rejeição aguda mediada por anticorpos, e a sobrevivência dos enxertos. A sobrevivência ao fim de 8 anos foi pior nos doentes que apresentavam títulos elevados de anticorpos antes do transplante. Neste mesmo estudo conclui-se que tanto a rejeição aguda mediada por anticorpos como a perda de enxerto estão directamente relacionadas como o pico de anticorpos específicos anti-dador antes do transplante, permitindo uma melhor estratificação do risco imunológico dos doentes, e, portanto, uma melhor monitorização da carga imunossupressora necessária.<sup>(29)</sup>

Um estudo de *Kimbal P.*, 2011, refere que monitorizar os aloanticorpos pode facilitar o diagnóstico de rejeição crónica, embora, infelizmente, não esteja

estabelecido quais são os transplantados que devem ser monitorizados, por não haver ainda uma técnica padrão. Neste mesmo estudo, dois terços dos doentes que mostraram diminuição completa dos títulos de aloanticorpos, um ano após o transplante, tiveram poucos efeitos colaterais e, ainda uma sobrevida aos 3 anos de 95% após terapêutica específica com ATG (timoglobulina), para além da imunossupressão tripla (MMF - micofenolato de mofetil, tacrolimus e um corticóide).<sup>(30)</sup>

Existem testes muito sensíveis como a Citometria de fluxo e métodos de ELISA que permitem detectar baixos níveis de anticorpos, mas com custo elevado. Neste momento é o teste mais importante na monitorização de doentes com anticorpos anti-HLA em circulação.

#### 4. **Ensaio de hipersensibilidade retardada (DTH)**

Os ensaios de hipersensibilidade retardada (DTH) permitem determinar a magnitude da resposta a antigénios do dador, após inoculação trans-vivo de células do receptor com antigénios do dador em animais de laboratório.<sup>(31)</sup>

Apresenta como desvantagens a subjectividade do tamanho do edema resultante, e também ser dependente de ratos. Estudos indicam que este é um teste útil na identificação de transplantados com tolerância estabelecida, mais do que vantajoso em dizer que pacientes em imunossupressão estarão em risco de desenvolver tolerância no futuro.<sup>(31)</sup>

Teoricamente, este teste pode ser útil em transplantados estáveis, que possam usufruir de uma diminuição da carga imunossupressora. No entanto, devido à complexidade deste ensaio, a sua utilização na rotina é pouco praticável.<sup>(32)</sup>

### III. Biomarcadores não invasivos Inovadores

#### 1. SANGUE PERIFÉRICO

##### 1.1. Aloreactividade como marcador do *status* imunológico

Os linfócitos periféricos parecem representar um dos meios ideais de monitorização da actividade imune nos transplantados renais. Os seus fenótipos e características funcionais são semelhantes às das células que estão presentes nos enxertos, daí que possam ser considerados uma ferramenta de estudo útil.<sup>(33)</sup>

Tradicionalmente, os métodos que avaliam a reactividade das células T incluem a reacção linfocitária mista (MLR), ensaios de diluição limitante (LDA), ensaios imunoenzimáticos (ELISPOT), ensaios de hipersensibilidade retardada (DTH), ensaios de citotoxicidade directa e ainda o ensaio funcional Cyclex. Com a excepção do ensaio de citotoxicidade, nenhum teste mostrou ser eficaz a ponto de permitir diminuir a terapia imunossupressora.<sup>(2)</sup>

**1.1.1. A reacção linfocitária mista (MLR)**, foi das primeiras técnicas a ser desenvolvida para avaliar a resposta proliferativa dos linfócitos na presença de células HLA incompatíveis. Na forma clássica, os linfócitos periféricos de dois indivíduos são misturados numa cultura por vários dias. Apenas os linfócitos do receptor proliferam em resposta aos antigénios de histocompatibilidade não compatíveis do dador, e a aloreactividade destas células é medida pela incorporação da timidina tritiada.<sup>(34)</sup> Num estudo, com 19 receptores de transplante renal, uma resposta dador-específica diminuída verificada aos 3 e aos 6 meses após o transplante, mostrou associar-se a uma melhor sobrevida do enxerto ao fim de um ano.<sup>(35)</sup> Também num estudo pediátrico recente, *Ferraris JR*, mostrou que a hiporesposta em MLR se associa a uma maior sobrevida do enxerto.<sup>(36)</sup> Estes dados podem ser utilizados para a identificação de doentes que beneficiem de doses menores de imunossupressão.<sup>(35)</sup> Apesar de ser um teste de fácil realização e baixo custo, demora cerca de uma semana e a sua reprodutibilidade é fortemente influenciada pela presença de citocinas e pelas drogas imunossupressoras administradas. Dificilmente será considerado como uma ferramenta útil na monitorização do risco de rejeição aguda de enxerto renal.

**1.1.2. Os ensaios de diluição limitante (LDA)** permitem com sensibilidade elevada, calcular a frequência de aparecimento de precursores de células T aloreactivas<sup>(37)</sup>, através de diluições seriadas de células do dador e do receptor e medindo a proliferação, a citotoxicidade ou a quantidade de citocinas que estas produzem após vários dias de incubação.<sup>(38)</sup> Vários estudos apontam para uma correlação directa entre o número de precursores em células periféricas e a rejeição histologicamente estabelecida em enxertos de rim ou coração.<sup>(39)(40)</sup> Embora estes resultados possam ser preditivos da sobrevivência do enxerto a curto prazo, a complexidade e o tempo prolongado da técnica limita a aplicabilidade do teste.

**1.1.3. Os ensaios ELISPOT** combinam o conceito de MLR com o princípio da metodologia de ELISA. Neste teste as células T do receptor são cultivadas com as células T inactivadas do dador – MLR -, em placas de cultura tratadas com o anticorpo específico para a citocina que se quer identificar. Após um período curto de incubação a citocina produzida pelas células T do receptor é medida utilizando enzimas segundo o princípio de ELISA. Esta técnica permite calcular a frequência de células T previamente activadas ou de célula T de memória que respondem a antigénios específicos, produzindo uma citocina específica.<sup>(41)</sup> Esta técnica apresenta vantagens em relação a outras que também quantificam citocinas.<sup>(42)</sup> Num estudo de 55 transplantados renais, a aloreactividade determinada por ELISPOT, durante os primeiros seis meses, mostrou uma associação significativa entre a positividade do teste e a disfunção do enxerto.<sup>(42)</sup> Contudo, análises multivariadas mostram que a correlação entre o IFN $\gamma$  medido por ELISPOT e a creatinina sérica é independente da rejeição aguda, da hipersensibilidade retardada ou da presença de anticorpos antes do transplante.<sup>(33)</sup> O método ELISPOT pode ser útil na detecção de respostas “ocultas” no receptor, que podem não ser imediatamente ou sensivelmente detectadas pelos níveis sérios de creatinina.<sup>(43)</sup> Tem elevada sensibilidade, mede a frequência celular, é de fácil execução e permite a medida da aloreactividade directa e indirecta. Contudo, a contagem de células é subjectiva e é realizada com base na produção de citocinas.<sup>(33)</sup>

**1.1.4. Os ensaios de citotoxicidade directa (CML)** medem a capacidade dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> do receptor lisarem células do dador, nas quais foi previamente incorporado <sup>51</sup>Cr radioactivo. Em transplantados renais, foi

observada uma maior sobrevivência do enxerto a longo prazo, relacionada com uma baixa citotoxicidade mediada por linfócitos, enquanto uma elevada taxa de lise celular se associa a um risco elevado de rejeição aguda.<sup>(44)</sup> *Weimer* relata o sucesso da retirada dos imunossuppressores, com base nos resultados destes testes. Estes dados sugerem que depois do transplante, a citotoxicidade das células T do receptor dador-específica, pode ser orientativa do tratamento imunossupressor, e poderá permitir identificar receptores tolerantes.<sup>(45)</sup> No entanto, este ensaio é complexo, demora uma semana, e obriga a exposição dos investigadores ao <sup>51</sup>Cr radioactivo, o que limita o seu uso na prática clínica.

**1.1.5. O ensaio funcional Cyclex™ ImmunoKnow<sup>R</sup>** é um ensaio de detecção da imunidade mediada por células em doentes imunodeprimidos.<sup>(46)</sup> Este mede o aumento do metabolismo das células T CD4 após estimulação *in vitro* com o mitogénio fitohemaglutinina-L (PHA), e quantifica a produção de ATP produzido pelas células estimuladas. Num estudo multicêntrico em transplantados, *Kowalski et al.* referem uma associação entre os valores da resposta imune e a situação clínica dos pacientes. Doentes com rejeição respondiam fortemente com valores >700ng/mL, enquanto doentes com infecções tinham uma resposta diminuída (<25ng/mL). Em contraste, os transplantados em situação estável mostravam uma resposta moderada, com valores médios de 280ng/mL.<sup>(47)</sup> Embora este teste seja muito reprodutível, pouco demorado e relativamente barato, a sua utilidade clínica é limitada. Um valor isolado é difícil de interpretar, particularmente nos casos em que é utilizada terapia depletora de linfócitos, em que o número de linfócitos T CD4 é severamente diminuído. Para além disso, o impacto da produção de ATP em situações de proliferação, não está documentado, nem está feita a comparação entre os valores de rejeição ou disfunção do enxerto com o método *standard* de diagnóstico (biópsia).<sup>(2)</sup>

## **1.2. Perfil fenotípico e genético na monitorização da aloreactividade**

### **1.2.1. Perfil fenotípico**

Os linfócitos periféricos são a ferramenta ideal na monitorização da resposta imune em transplantados. Vários estudos mostram que existem semelhanças

fenotípicas e funcionais entre as células circulantes e as infiltrantes do enxerto.<sup>(33)</sup>

#### 1.2.1.1. Células T reguladoras e FoxP3

Um aloenxerto estimula vários mecanismos de imunidade celular e humoral, específicos e não específicos. Os linfócitos T são o centro da resposta imunológica em transplantação e muitos dos conhecimentos sobre a fisiologia e funções das células T advêm de estudos de transplantes. Diversas publicações destacam uma subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em mecanismos de controlo da rejeição de enxertos e prevenção de auto-imunidade.<sup>(48)</sup> Por isso, mudanças nos fenótipos dos linfócitos periféricos têm sido propostas como uma forma relativamente fácil de monitorizar a alorreactividade em doentes transplantados, em particular, o facto de a situação clínica de um transplantado ser o resultado do balanço entre a actividade das células T reguladoras e das efectoras. As células T reguladoras (Tregs) representam uma população de linfócitos T capazes de controlar a resposta imune <sup>(48)</sup> em várias doenças patogénicas e no pós-transplante. O ratio entre células T reguladoras e efectoras poderá fornecer informação importante no risco de rejeição ou no estabelecimento de tolerância imunológica. Esta população de células corresponde a cerca de 5%-15% dos linfócitos periféricos totais em indivíduos normais e caracteriza-se fenotipicamente por exprimirem na sua maioria os determinantes **CD25** (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) e **FoxP3**, tendo sido encontradas altas concentrações das mesmas em alguns estudos com doentes transplantados estáveis.<sup>(49)</sup> Estes dados sugerem a identificação de doentes com baixos índices de alorreactividade, e por isso com risco diminuído de rejeição aguda, sendo por isso passíveis de diminuição da terapia imunossupressora.<sup>(50)</sup> No entanto, os mecanismos que levam a hiporreactividade, assim como os mecanismos que aumentam a sobrevida do enxerto, são ainda pouco conhecidos. Por outro lado, estas células mostram um papel ambivalente na resposta imunológica. As células Tregs não só estão envolvidas na manutenção da diminuição da resposta do alo-enxerto e no estabelecimento de tolerância, como, durante o processo de rejeição elas mesmas são capazes de se expandir. Conhecer melhor o papel dos ligantes tímicos responsáveis pela selecção de células Tregs, qual ou quais os mecanismos efectoras pelo quais essas células exercem o

seu efeito regulador e qual o papel dos diferentes subtipos destas células na modulação do sistema imune, bem como a identificação de novos marcadores de superfície destas células T,<sup>(51)</sup> é emergente para que estas possam ser usadas na prática clínica.

Também o efeito dos diferentes imunossuppressores sobre estas células Tregs não é uniforme. Os inibidores da calcineurina, como a ciclosporina (CsA) e o Tacrolimus (FK), estão associados a diminuição dos níveis de Tregs circulantes, pelos seus efeitos inibitórios sobre as células produtoras de interleucina-2 (IL-2), e que é necessária à proliferação das Tregs. Pelo contrário, nos receptores em que é utilizada imunossupressão com inibidores da m-TOR, como a rapamicina (RAPA), foi verificado um aumento do número de células Tregs. Apesar desta associação, a sobrevida do enxerto não é maior, e o número de rejeições é maior com os inibidores da m-TOR.<sup>(52)</sup>

Outra população de células T com capacidade reguladora, são as células T com fenótipo **CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>**, as quais têm sido associadas a baixas taxas de rejeição em receptores transplantados de rim e de fígado.<sup>(53)</sup> Estas células T supressoras (Ts) são FoxP3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, são específicas ao antígeno, restritas aos antígenos MHC classe I e reagem directamente com as células apresentadoras de antígeno (APCs), induzindo nestas uma regulação negativa de moléculas co-estimuladoras ou uma regulação positiva de receptores inibidores e de transcriptos tipo imunoglobulina (Ig), os quais inibem a activação celular. Alguns estudos evidenciam uma correlação significativa entre rejeição aguda e a expressão do gene FoxP3, que codifica uma proteína que está envolvida na resposta imune ao transplante. A baixa expressão deste gene no momento da rejeição tem sido associada a uma má resposta terapêutica e a um aumento do risco de falência do enxerto aos 6 meses. Mais, níveis elevados de transcrição deste gene na urina, estão associados a uma evolução clínica desfavorável,<sup>(50)</sup> mostrando mesmo uma maior correlação com a rejeição aguda do que os níveis séricos de creatinina.<sup>(54)</sup>

#### 1.2.1.2 CD127

Um outro marcador de linfócitos T que mostrou estar relacionado com a rejeição de enxerto renal foi o **CD127**. A sua expressão parece distinguir entre as células Tregs e linfócitos T activados, o que não era

possível apenas com o CD25, uma vez que este receptor não é específico de uma só sub-população linfocitária. Num estudo, verificou-se que uma baixa expressão de CD127 se relacionava com uma boa função renal do enxerto. Assim, conclui-se que a quantificação de linfócitos T que exprimiam CD127, juntamente com outros marcadores destas células, como o CD25, pode ser útil na monitorização da função renal após o transplante.<sup>(55)</sup>

### **1.2.2. Perfil genético de linfócitos periféricos**

Em transplantação renal, a análise genética de linfócitos periféricos tem sido correlacionada com a situação clínica e a sobrevida do alo-enxerto renal. Esta observação surgiu do facto de genes da granzima B e da perforina terem sido identificados precocemente em células do sangue periférico e na urina de doentes que vieram a desenvolver rejeição aguda do transplante.<sup>(56)</sup>

*Sawitzki et al*, estudaram também a expressão de genes, como o gene TOAG-1 (associado à apoptose das células T), e a  $\alpha$ 1-manosidase (importante na expressão de proteínas membranares e na produção de citocinas), e verificaram que a baixa expressão destes, intra-enxerto e no sangue periférico precede episódios de rejeição em modelos murínicos. Contrariamente, a regulação positiva destes dois marcadores ocorre durante períodos de tolerância<sup>(55)</sup>.

Num estudo prospectivo em transplantados cardíacos, em que foi usado um painel com vários genes, *Deng et al*. conseguiram discriminar situações de estabilidade/tolerância e de rejeição do enxerto.<sup>(57)</sup> Adicionalmente, um estudo que envolveu a análise de 49 genes potencialmente relacionados com a rejeição do transplante renal, em amostras de sangue de 75 doentes transplantados com função renal estável, mostrou que 33 dos 49 genes, ou seja, cerca de 67% destes, permitiam fazer a distinção entre tolerância imunológica e rejeição crónica, com 99% de sensibilidade e 86% de especificidade<sup>(58)</sup>.

Resumindo, todos estes resultados associados a uma identificação precisa dos genes envolvidos na resposta alogénica, constituem um método não invasivo promissor capaz de identificar doentes em risco de rejeição ou doentes aos quais é possível diminuir ou até mesmo retirar a imunossupressão.<sup>(58)</sup>

## 2. SORO

### 2.1. Anticorpos anti-MICA

Os antígenos MICA (*Major histocompatibility complex class I-related chain A*) são glicoproteínas semelhantes às moléculas MHC da classe I, mas às quais não se associa a  $\beta$ -2microglobulina. São altamente polimórficos e exprimem-se em células endoteliais, células dendríticas, fibroblastos, células epiteliais e em muitas neoplasias, mas não em linfócitos.<sup>(59)</sup> Estes antígenos não se exprimem constitucionalmente na maioria das células, mas a sua expressão, contrariamente às moléculas HLA, que são reguladas por citocinas como o INF $\gamma$ , é regulada em resposta à infecção, ao stress oxidativo ou à isquemia, causada pela má perfusão dos órgãos. Em transplantados, embora os eventos que normalmente se associam a imunossensibilização (transfusões, gravidezes, infecções e transplantes), nem sempre se correlacionem com o aparecimento de anticorpos anti-MICA, estes são significativamente mais frequentes em doentes transfundidos, previamente transplantados, em mulheres múltiparas, em doentes com doença renal crónica em estadio V e na população de sexo masculino.<sup>(60)</sup> Alguns autores verificam que doentes com sensibilização HLA têm mais probabilidade de produzir anticorpos anti-MICA.<sup>(60)(61)</sup>

Num estudo de *Zou et al*, os anticorpos anti-MICA foram detectados em 11.4% dos 1910 transplantados e estiveram relacionados com a rejeição do enxerto. A sobrevivência após um ano do transplante foi de 88.3%  $\pm$  2.2 % nos doentes com a presença destes anticorpos, comparando com uma sobrevivência de 93.0%  $\pm$  0.6%, ao fim do mesmo tempo, mas para pacientes sem este tipo de anticorpos.<sup>(59)</sup>

Na prática clínica, estes anticorpos só têm valor prognóstico quando associados aos anticorpos anti-HLA, não sendo por si só impeditivos de realização do transplante.<sup>(60)</sup>

### 2.2 Anticorpos anti-endotélio

Sendo a superfície do endotélio vascular a primeira linha de contacto entre o órgão transplantado e os vasos sanguíneos do receptor, vários estudos evidenciam o papel da célula endotelial na rejeição, pois estas são as alvos directos de possíveis anticorpos em circulação.<sup>(61)</sup>

Para além das suas inúmeras funções, o endotélio pode, também, ser considerado como um órgão imunocompetente, já que ele expressa antígenos de

histocompatibilidade, antígenos ABO e antígenos tecido-específicos.<sup>(62)</sup> Quando o endotélio é activado em resposta a doenças inflamatórias, agudas ou crónicas, ou por citocinas, ele pode sofrer mudanças tanto morfológicas como antigénicas, aumentando a expressão de moléculas com actividades diferenciadas, as quais podem funcionar como moléculas de apresentação antigénica.

As células endoteliais estão implicadas no processo de rejeição de órgãos sólidos e desempenham três funções cruciais no processo de rejeição dos enxertos:

- estimulam o sistema imune do receptor através da apresentação de alo-antígenos aos linfócitos do mesmo, iniciando o processo de rejeição;
- respondem a estímulos do receptor, como, por exemplo, a citocinas inflamatórias, promovendo uma inflamação dentro do enxerto e trombose, que contribui para lesão do órgão transplantado;
- a camada endotelial que recobre os vasos do enxerto é o primeiro alvo para a resposta imune do receptor contra o órgão transplantado.<sup>(63)</sup>

Os anticorpos anti-endotélio representam um grupo heterogéneo de anticorpos (como o receptor tipo I de angiotensina II, MICA, vimentina) dirigidos para vários determinantes das células endoteliais.<sup>(61)</sup>

Num número significativo de transplantados renais (15-20%) com crossmatch linfocitário negativo, ocorre perda precoce do enxerto por rejeição.<sup>(64)</sup> Anticorpos que reagem exclusivamente contra células endoteliais foram observados em pacientes após rejeição renal, o que mostrou que antígenos de superfície expressos em células endoteliais poderiam ser importantes na componente vascular da rejeição de enxertos renais.<sup>(65)</sup>

Em doentes transplantados, os alo-anticorpos para antígenos não-HLA – a maioria associados com as células endoteliais e monócitos, e não detectáveis em linfócitos – têm sido descritos em transplantados renais HLA-idênticos e têm sido associados a arteriosclerose e rejeição crónica do enxerto.<sup>(63)</sup>

### **2.3 CD30 solúvel (sCD30)**

O CD30 é uma glicoproteína de membrana que pertence à superfamília do Factor de Necrose Tumoral (TNF). Exprime-se em células T activadas, mais especificamente em células Th2.<sup>(66)(67)</sup> Foi relatado que a ligação do CD30 ao seu receptor natural CD30-L pode levar a uma resposta apoptótica por parte dos linfócitos T CD30<sup>+</sup>.<sup>(1)</sup> Após a activação de células CD30<sup>+</sup>, uma forma solúvel de CD30 é libertada e pode ser medida no soro – sCD30.<sup>(66)(67)</sup> Num estudo de *Martinez et al*, verificou-se

que a resposta primária a alo-antígenos induzia a diferenciação em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> que exprimiam CD30<sup>+</sup>.<sup>(68)</sup> Existem no entanto, algumas evidências que mostram que níveis séricos elevados de sCD30 pré-transplante, podem ser indicativos de um aumento de risco de perda do enxerto<sup>(69)</sup>, ou que identificam o sCD30 como um bom marcador de rejeição aguda, 15 dias após a realização do enxerto.<sup>(70)</sup> Um estudo refere, ainda, que a concentração de sCD30 antes do transplante é um melhor preditor de desenvolvimento de anticorpos anti-HLA pós-transplante e de rejeição aguda, do que o PRA (painel reactivo de anticorpos) pré-transplante.<sup>(71)</sup>

Assim, este biomarcador tem sido interpretado por alguns, como preditivo de rejeição do transplante renal, podendo ajudar na identificação de doentes com maior risco de perda de enxerto, e aos quais a terapia imunossupressora deve ser mais agressiva. Contudo, todos estes estudos têm de ser alargados para serem considerados ferramentas úteis no diagnóstico de rejeição do transplante renal.

## **2.4 Óxido nítrico (ON)**

A maioria das rejeições agudas ocorre no primeiro mês pós transplante e tem impacto significativo na sobrevida do enxerto a longo termo.<sup>(72)</sup>

O óxido nítrico (ON) é um radical livre endógeno, produzido nos tecidos, com propriedades vasodilatadoras. É um regulador importante de funções biológicas e também desenvolve um papel importante na patogénese da lesão celular.<sup>(73)</sup> A sua produção é regulada por múltiplos mecanismos e está aumentada nas infecções.<sup>(74)</sup>

Os doentes transplantados, imunocomprometidos, têm um risco aumentado de episódios infecciosos, associados a alteração dos níveis séricos de ON, que aumentam.<sup>(74)</sup> O ON também pode aumentar durante a rejeição como resposta à estimulação de várias citocinas.<sup>(75)</sup> Foi recentemente demonstrado que níveis séricos elevados de ON, durante o episódio de rejeição, decrescem com a completa resolução do episódio, colocando-se a possibilidade de utilização do ON como marcador não invasivo de diagnóstico e monitorização da evolução dos episódios de rejeição aguda.<sup>(74)</sup>

Apesar de ser um teste não invasivo, facilmente efectuado, reproduzível e de baixo custo o seu papel não está definido na avaliação pós transplante, de forma isolada ou em associação com outros marcadores.<sup>(73)(74)</sup> Serão necessários estudos adicionais prospectivos e multicêntricos.

## 2.5. INF $\gamma$ e IL-2

As primeiras citocinas inflamatórias a serem produzidas como resposta a um estímulo imunológico são a IL-1 e o TNF. Nos primeiros dias pós-transplante renal, estas são produzidas essencialmente por monócitos e macrófagos, que infiltram o órgão e promovem o recrutamento de leucócitos e o aumento da sua sobrevivência. Em caso de rejeição aguda, a IL-1 produzida fornece os sinais de activação linfocitária necessários. São, então, activados não só linfócitos T helper (Th) CD4+, como linfócitos T CD8+ e linfócitos B. Uma vez activadas, estas células secretam IL-2 e INF $\gamma$ , que são importantes co-factores na expansão clonal, na maturação e diferenciação de células alo-reativas, que levam à destruição do enxerto. Dependendo do estímulo imunológico e do micro-ambiente, podem ser produzidos diferentes padrões de citocinas. A IL-2 e o INF $\gamma$  são característicos de uma resposta Th1 e relacionam-se com rejeição celular. Já a IL-4, IL-5 e IL-10 e IL-13 são características de um padrão Th2, e associam-se a padrões de tolerância. <sup>(76)</sup>

A IL-2 e o INF $\gamma$  são por isso, consideradas citocinas pró-inflamatórias, desempenham um papel activo na rejeição do alo-enxerto, e são alvo de estudo como potenciais biomarcadores de rejeição do transplante renal.

### 3. URINA

Embora a urina possa ser o local óbvio, não é, de momento, utilizada com esse objectivo. No entanto, alguns estudos tem sido relatados. <sup>(2)</sup>

#### 3.1 mRNA de perforina e granzima B e níveis de CD103

*Li et al.*, em 2001, mostraram que os níveis de mRNA da perforina e da granzima B, na urina de transplantados renais, eram marcadores sensíveis de rejeição aguda – 83% e 64% de sensibilidade, respectivamente.<sup>(77)</sup> Alguns autores dizem que os níveis urinários de mRNA da granzima sobem rapidamente na rejeição aguda, comparativamente aos níveis séricos de creatinina.<sup>(78)</sup>

Outros marcadores incluem o inibidor da protease da serina 9, um inibidor natural da granzima B, e o **CD103** que se exprime em células T CD8<sup>+</sup> activadas.<sup>(79)</sup> Pela sua localização intratubular, os níveis urinários de células CD103<sup>+</sup> poderão representar um preditor de rejeição renal. Esta proteína de superfície celular, exprime-se em células epiteliais e é um componente da integrina  $\alpha E\beta 7$ , responsável pela ligação da caderina-E.<sup>(79)</sup> Num estudo de *Ding R.*, em 2003, o nível urinário de mRNA do CD103 e de granzima foi muito superior em doentes com rejeição aguda, quando comparado com os doentes estáveis, e inferior aos que apresentavam rejeição crónica. A rejeição aguda do enxerto foi prevista com uma sensibilidade de 59% e especificidade de 75%, usando como biomarcador o CD103.<sup>(80)</sup>

#### 3.2. IP-10 e CXCR3

Outros marcadores que têm suscitado interesse são a **proteína IP-10**, induzida pelo IFN $\gamma$ , e o **CXCR3** que é o seu ligando. Estas proteínas são denominadas de quemocinas, por serem responsáveis pela migração de células aloreactivas para o enxerto, e assim participarem no desenvolvimento da resposta imunológica ao transplante.<sup>(81)</sup> Sedimentos urinários de transplantados renais com rejeição aguda <sup>(82)</sup> mostram níveis elevados destas proteínas. Estudos relatam uma sensibilidade de 100% e especificidade de 78% para o IP-10, e uma sensibilidade de 63% e uma especificidade de 83% para o CXCR3 em transplantados com rejeição.<sup>(81)</sup> Noutro estudo, *Segeer et al.*, detectou que a expressão de mRNA de IP-10 nas biópsias renais estava elevada, em doentes transplantados com rejeição aguda.<sup>(83)</sup>

Contudo, a avaliação destes marcadores isoladamente não é suficiente para

detectar rejeições *border-line*, nem rejeição crónica do enxerto.<sup>(83)</sup> Uma vez que o IP-10 se exprime em células tubulares renais e o CXCR3 em células T CD4<sup>+</sup>, será necessário complementar a investigação da rejeição com os níveis urinários de granzima B e de perforina, já que estes grânulos são libertados por células T CD8<sup>+</sup>. Obter-se-ia desta forma uma maior precisão de resultados.<sup>(81)</sup>

### **3.3. PD-1:PD-L1/PD-L2**

Estudos recentes destacam o papel do PD-1, que é uma molécula de superfície induzida e exprimir-se em células T, células B e CDs, e que após ligação aos seus ligandos, PD-L1 e PD-L2, regula negativamente a resposta à acção do INF $\gamma$  no epitélio do túbulo renal. Inibe ainda, a proliferação de células Th1 e Th2, a produção de citocinas e promove apoptose. O seu bloqueio pode inibir a tolerância, que culminará na rejeição do enxerto.<sup>(84)</sup> Estudos dizem que as células que exprimem PD-L1 devem ser medidas em testes urinários, mas para já não há evidência de que estes possam ser testes fiáveis na identificação da rejeição aguda do transplante renal.<sup>(85)</sup> São necessários mais estudos.

### **3.4. Fracções ou fragmentos proteicos – MICRO RNAs (miRNAs)**

Uma estratégia alternativa será a abordagem de fracções ou fragmentos proteicos – análise proteómica da urina, mas também no sangue periférico. Estes fragmentos proteicos ou miRNAs são pequenos RNAs não codificados, com aproximadamente 22 nucleotídeos, mas capazes de regular a expressão de alguns genes, a degradação de mRNA e/ou a inibição transcripcional. Os miRNAs controlam processos como a sobrevivência, o desenvolvimento, a diferenciação e a proliferação celular, bem como são capazes de modular a resposta inata e adaptativa. Recentemente, *Anglicheau et al.* identificaram vários miRNAs preditivos de rejeição aguda em transplantados renais. Assim, a utilização de diferentes perfis de miRNAs, como biomarcadores, no diagnóstico e/ou prognóstico de rejeição em aloenxertos, tem sido objecto de investigação.<sup>(86)</sup>

Muitos investigadores defendem que os níveis séricos de proteínas aparecem alterados quando já há um atingimento drástico da função renal. Daí que a análise proteómica da urina seja cada vez mais, um forte candidato à identificação precoce de lesão renal por rejeição do enxerto.<sup>(87)</sup> Apresenta ainda vantagens por ser um teste

não invasivo, fácil de obter em larga escala, e por as proteínas e os peptídeos da urina serem mais estáveis e menos complexos. Para além disso, a quantidade e a composição da análise proteómica reflectem, directamente, as funções do rim e do tracto genito-urinário. <sup>(88)</sup>

*Shaub et al* identificaram um perfil de proteínas urinárias associadas a rejeição renal crónica. <sup>(89)(90)</sup> A definição destas proteínas é de extrema importância para a compreensão da patogénese da doença. Comparativamente a doentes transplantados estáveis e a indivíduos saudáveis, doentes com rejeição aguda tubulo-intersticial, e com um pH urinário mais baixo, apresentam níveis elevados de proteases. <sup>(88)</sup> A microglobulina- $\beta$ 2, a defensina- $\beta$ 1 e a anti-quimiotripsina- $\alpha$ 1 foram já identificadas como potenciais biomarcadores de rejeição aguda do enxerto. <sup>(88)</sup> Contudo, a análise proteómica da urina está, para já, aquém de ser considerada uma ferramenta ideal na avaliação rotineira do transplante renal. <sup>(86)</sup>

Recentemente, num estudo prospectivo, multicêntrico e observacional, *Suthanthiran*, verificou com elevado grau de evidência, que perfis de mRNA de células urinárias eram indicativos de rejeição aguda renal. A expressão de mRNA para além de permitir prever a rejeição do enxerto renal permitirá ainda fazer uma imunossupressão individualizada. Neste estudo foi possível prever a ocorrência de rejeição com uma antecedência de 90 a 60 dias utilizando como biomarcadores a perforina e o PI-9; 60 a 30 dias antes com a perforina, IP-10, CXCR3 e Foxp3; e 16 a 29 dias antes com a perforina, PI-9, IP-10, CXCR3, CD3 e granzima B. <sup>(91)</sup>

Em conclusão, a tecnologia proteómica é uma metodologia promissora uma vez que permite detectar proteínas que se associam a rejeição aguda do enxerto renal. No entanto, mais esforços devem ser feitos para aumentar o número de ensaios e de proteínas testadas. <sup>(80)</sup>

#### IV. Monitorização imunológica para melhor interpretação da biópsia

A biópsia renal é o procedimento *gold-standard* para o diagnóstico de disfunção e rejeição do alo-enxerto.<sup>(92)</sup> Os aspectos histológicos que normalmente estão presentes quando há rejeição crónica do enxerto são fibrose intersticial, atrofia tubular, vários graus de hialinização arteriolar e glomerulosclerose. Estas lesões são não específicas e quando presentes são irreversíveis. Por exemplo, são descritas em doentes com longa exposição a fármacos inibidores da calcineurina e, mais recentemente, em doentes com infecção pelo poliomavírus, infecção emergente associada ao aumento da imunossupressão. Como resultado, é necessária uma modulação da imunossupressão, evitando por um lado que esta seja insuficiente, e se associe a episódios de rejeição, e por outro que seja excessiva e aumente o risco de nefrotoxicidade ou de infecções oportunistas como a do poliovírus.<sup>(93)</sup>

Nalguns centros de transplante são efectuadas biópsias renais protocoladas em diferentes períodos de tempo pós transplante. A sua realização poderá ser útil na detecção precoce de patologias inesperadas em doentes transplantados com bom funcionamento do enxerto. Por exemplo, naqueles doentes com rejeição *borderline* ou subclínica, ou no diagnóstico precoce de rejeição crónica, com fibrose intersticial, atrofia tubular ou glomerulopatia do transplante. O re-ajuste da terapêutica numa situação de rejeição, poderá aumentar a sobrevida do enxerto renal. Assim, quanto mais cedo forem identificados os achados histológicos de rejeição, mais cedo será ajustada a terapia imunossupressora, e maior será a sobrevida do enxerto renal.<sup>(93)</sup>

Estudos recentes mostraram que a corticoterapia durante 1 a 3 dias, na fase inicial de rejeição subclínica, diminui os episódios de rejeição aguda, diminui a doença tubulo-intersticial e diminui a creatinina sérica.<sup>(94)</sup> Apesar da biópsia ser considerada o método ideal de diagnóstico de rejeição, a sua informação pode ser limitada, tendo em conta o impacto clínico e o prognóstico do processo. Diferentes mecanismos patogénicos podem estar subjacentes às mesmas alterações histológicas. Por exemplo, não haver nenhuma alteração histológica que se associe à rejeição subclínica do órgão e que a permita distinguir de uma rejeição clínica com disfunção significativa do enxerto. Para aumentar a precisão da avaliação dos achados histológicos seria necessário haver mais testes imunológicos que permitissem medir a aloreactividade do transplante.<sup>(2)</sup>

Várias tentativas têm sido feitas no sentido de correlacionar o fenótipo das células infiltrantes, com a severidade da rejeição aguda. Por exemplo, foram encontrados valores mais altos de monócitos infiltrantes na rejeição clínica do que na subclínica. Contudo, não foram estabelecidos valores limites que permitiam a sua

distinção. Também, a utilização de anticorpos depletors de linfócitos deve ser tomada em atenção, já que estes alteram o fenótipo dos leucócitos, quer no sangue periférico, quer no enxerto.<sup>(95)</sup>

Resultados mais promissores têm sido obtidos por análise genética de biópsias renais. Diversos grupos utilizando **microarrays** de alta densidade, identificaram padrões de expressão que se associam a tipos histológicos específicos e a diferentes resultados.<sup>(95)</sup> Este método permite analisar, simultaneamente, milhares de genes, é muito robusto e facilmente reproduzível. Estudos recentes têm demonstrado uma elevada heterogeneidade molecular na rejeição do enxerto, com diferenças detectadas por transcrição e que passam despercebidas pelos métodos histológicos.<sup>(96)</sup> Também a definição de padrões associados com cortiço-resistência e a capacidade da creatinina sérica retornar a valores normais após corticoterapia, tem uma componente genética.

Outros grupos têm tentado definir plataformas para análise, combinando técnicas de PCR em tempo real, de grupos fixos de 20-100 genes, com microarrays de baixa densidade, que permitam identificar padrões associados a diferentes tipos de rejeição, nomeadamente naqueles em que as alterações histológicas da biópsia são subtis.<sup>(98)</sup> Apesar de ainda não existir nenhum kit validado para uso na prática clínica, esta tecnologia poderá vir a representar mais uma arma útil na monitorização da alorreactividade do enxerto.

O C4d é uma proteína do complemento que se deposita nas células endoteliais dos capilares peri-tubulares e causa lesão. Tem sido associado à disfunção do enxerto e perda deste a médio e longo prazo. É visualizado nas biópsias por técnicas de imunocitoquímica e faz parte da maioria dos protocolos clínicos, por ser um marcador sensível e específico no diagnóstico de rejeição, e um importante factor de prognóstico. A identificação deste marcador é uma mais valia na análise histológica da rejeição do enxerto.<sup>(98)</sup>

## V. Conclusão

Actualmente a existência de métodos não invasivos, de fácil execução técnica, abre novas perspectivas na monitorização da aloreactividade e no diagnóstico diferencial de doentes transplantados. Ao longo da última década, muitos ensaios não invasivos foram testados e desenvolvidos, e os seus resultados foram avaliados e, em alguns casos, comparados com os métodos clássicos. De entre aqueles revistos neste trabalho, destacam-se os resultados obtidos com o ELISPOT, Cyclex Immunoknow e a análise da expressão de mRNA na urina, pelo facto de permitirem diferenciar os transplantados com risco acrescido de rejeição aguda, daqueles a quem possivelmente se poderá reduzir a imunossupressão. Contudo, a validação destes testes continua por ser feita. De facto, a maioria destes foi feita em centros individuais, e utilizou grupos de estudo relativamente pequenos comprometendo, assim, a análise estatística. Para além disso, nenhum ensaio testou com fiabilidade, se poderia ser usado com eficácia como alternativa, ou se contribuía com mais informação útil para a biópsia. Espera-se que num futuro próximo, os resultados dos ensaios não invasivos forneçam resultados comparáveis com os obtidos com os parâmetros clássicos (níveis de creatinina sérica e de imunossupressores, e histologia da biópsia), de avaliação da dose e eficácia da imunossupressão. A indução e avaliação de tolerância imunológica é um dos principais objectivos desta área de investigação clínica, pois alguns doentes poderão vir a beneficiar de uma redução significativa da imunossupressão.

Em conclusão, nenhum ensaio por si só mostrou ser capaz de avaliar de uma forma alargada toda a resposta imunológica de um receptor ao enxerto, mas combinando vários tipos destes ensaios não invasivos, que utilizam diferentes marcadores celulares e genéticos, é possível melhorar a especificidade e a sensibilidade destes, permitindo uma melhor caracterização da resposta imunológica do indivíduo ao longo do tempo e uma redução no número de biópsias

## VI. Bibliografia

- (1) TANTRAVAHU J, WOMER KL, KAPLAN B. Why hasn't eliminating acute rejection improved graft survival? *Annu Rev Med* 2007;58:369–385
- (2) CRAVEDI P, NEGRI M, Noninvasive methods to assess the risk of kidney transplant rejection, *Expert Rev Clin Immunol.* 2009; 5: 535–546. doi:10.1586/eci.09.36.
- (3) RUSH D. Protocol transplant biopsies: an underutilized tool in kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:138–143.
- (4) MANNON RB, KIRK AD. Beyond histology: novel tools to diagnose allograft dysfunction. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:358–366.
- (5) RUSH D. Insights into subclinical rejection. *Transplant Proc* 2004;36:71–73
- (6) CORNELL LD, COLVIN RB: Chronic allograft nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005;14: 229 –234,
- (7) SCHWARZ A, GWINNER W, HISS M, et al. Safety and adequacy of renal transplant protocol biopsies. *Am J Transplant* 2005;5:1992–1996
- (8) HARIHARAN S, MCBRIDE M, CHERIKH W, et al, Post-transplant renal function in the first year predicts long-term kidney transplant survival - *Kidney International*, 2002, 62, 311–318
- (9) GIRAL, M, TADDEI, C, NGUYEN, JM, et al: Single center analysis of 468 first cadaveric kidney allograft with uniform ATG-CsA sequential therapy, in *Clinical Transplants*, 1996 edited by MJ CECKA, TERASAKI PI, Los Angeles, UCLA Tissue Typing Laboratory, pp 257–264
- (10) HUMAR A, KERR S, GILLINGHAM KJ, MATAS AJ: Features of acute rejection that increase risk for chronic rejection. *Transplantation* 1999 68: 1200–1203,
- (11) AMEND, WJ, VINCENTI, et al. The first three posttransplant months. In: *Handbook of Kidney Transplantation*, 4th ed, 2005, Danovitch GM (Ed), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- (12) OPELZ G, DÖHLER B, COLLABORATIVE TRANSPLANT STUDY REPORT, Influence of time of rejection on long-term graft survival in renal transplantation., *Transplantation.* 2008;85:661.
- (13) FURNESS PN, PHILPOTT CM, CHORBADJIAN MT, et al; Protocol biopsy of the stable renal transplant: a multicenter study of methods and complication rates; *Transplantation.* 2003;76:969
- (14) HEYMSFIELD SB ET AL. Measurement of muscle mass in humans: validity of the 24-hour urinary creatinine method. *Am. J. Clin. Nutr* 1983;37: 478-494..
- (15) LEVEY AS ET AL. Creatinine filtration, secretion and excretion during progressive renal disease. *Kidney Int.*, 1989, 36: S73-S80,.
- (16) MEDEIROS F, Avaliação da dosagem sérica de cistatina C para detecção precoce de alterações na função do enxerto após o transplante, 2007 São Paulo
- (17) TARIF N ET AL. Serum Cystatin C as a Marker of Renal Function in Patients with Acute Renal Failure. *Saudi J Kidney Dis Transplan.* 2008, 19:918-923.
- (18) NEWMAN DJ. Cystatin C. *Ann Clin Biochem*, 2002, 39: 89-104..
- (19) KOEING W et al. Plasma Concentrations of Cystatin C in Patients with Coronary Heart Disease and Risk for Secondary Cardiovascular Events: More than Simply a Marker of Glomerular Filtration Rate. *Clinical Chemistry.*, 2005, 51: 321-327.
- (20) FREID L. Creatinine and cystatin C: What are the values? *Kidney International.* 2009;75: 578-580.
- (21) RISCH L, BLUMBERG A, HUBER A, Rapid and accurate assessment of glomerular filtration rate in patients with renal transplants using serum cystatin C, *C. Nephrol Dial Transplant*, 1999; 14: 1991-6
- (22) M.C.P. FRANCO, S.S. NAGASAKO, P.G. MACHADO, et al, Cystatin C and renal function in pediatric renal transplant recipients, *Braz J Med Biol Res*, 2009, Volume 42(12) 1225-1229

- (23) KNIGHT EL, VERHAVE JC, SPIEGELMAN D, HILLEGE ET AL. Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement. *Kidney Int* 2004; 65: 1416-1421
- (24) XU H, LU Y, TENG D, WANG J, WANG L, LI Y. Assessment of glomerular filtration rate in renal transplant patients using serum cystatin C. *Transplant Proc* 2006; 38: 2006-2008
- (25) CRUZADO JM, BESTARD O, GRINYO JM. Control of anti-donor antibody production post-transplantation: conventional and novel immunosuppressive therapies. *Contrib Nephrol* 2009;162:117–128
- (26) NICOLAIDOU A, THEODORAKI A, DOXIADIS I, Expansion of humoral donor-specific alloreactivity after renal transplantation correlates with impaired graft outcome, 2005, 66, Issue: 9, Pages: 985-988
- (27) SUSAL C, DOHLER B, SADEGHI M, ET AL. HLA antibodies and the occurrence of early adverse events in the modern era of transplantation: a collaborative transplant study report. *Transplantation* 2009; 87:1367–1371.
- (28) TERASAKI PL. Humoral Theory of Transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3: 665-673.
- (29) LEFAUCHER C., LOUPY A, HILL G, ANDRADE J, et al, Preexisting Donor-Specific HLA Antibodies Predict Outcome in Kidney Transplantation, *JASN* August 1, 2010 vol. 21 no. 8 1398-1406
- (30) KIMBALL P, BAKER M, MARY B et al, Surveillance of alloantibodies after transplantation identifies the risk of chronic rejection, 2011 International Society of Nephrology
- (31) NAJAFIAN N, ALBIN MJ, NEWELL KA. How can we measure immunologic tolerance in humans? *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2652–2663.
- (32) VAN BESOUW NM, VAN DER MAST BJ, VAN DE WETERING J, et al, Tapering immunosuppressive therapy significantly improves in vivo cutaneous delayed type hypersensitivity responses. *Transpl Immunol* 2008;19:229–234
- (33) HERNANDEZ-FUENTES MP, WARRENS AN, LECHLER RI.. Comprehensive review of the available tools to monitor the immune response in organ transplant recipients. *Immunologic monitoring. Immunol Rev* 2003;196:247–264
- (34) THOMAS FT, LEE HM, LOWER RR, et al. Immunological monitoring as a guide to the management of transplant recipients. *Surg Clin North Am* 1979;59:253–281.
- (35) GHOBRIAL II, MORRIS AG, BOOTH LJ. Clinical significance of in vitro donor-specific hyporesponsiveness in rena allograft recipients as demonstrated by the MLR. *Transpl Int* 1994;7:420–427
- (36) FERRARIS JR, TAMBUTTI M, PRIGOSHIN N. Improved long-term graft function in kidney transplant recipients with donor antigen-specific hyporeactivity. *Pediatr Transplant* 2007;11:139–144.
- (37) PHILIP D. MASON, CATHERINE M. ROBINSON, and ROBERT I. LECHLER Detection of donor-specific hyporesponsiveness following late failure of human renal allografts, *Kidney International*, Vol. 50 ,996:1019—1025
- (38) LEFKOVITS I. Induction of antibody-forming cell clones in microcultures. *Eur J Immunol* 1972; :360–366.
- (39) CATTELL EL, CUNNINGHAM AC, BAL W, et al, Limiting dilution analysis: quantification of IL-2 producing allospecific lymphocytes after renal and cardiac transplantation. *Transpl Immunol* 1994;2:300–307.
- (40) VAESSEN LM, DAANE CR, MAAT AP, et al. T helper frequencies in peripheral blood reflect donordirected reactivity in the graft after clinical heart transplantation. *Clin Exp Immunol* 1999;118:473–479.
- (41) MASHISHI T, GRAY CM. The ELISPOT assay: an easily transferable method for measuring cellular responses and identifying T cell epitopes. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:903–910.

- (42) HRICIK DE, RODRIGUEZ V, RILEY J, et al. Enzyme linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay for interferon- $\gamma$  independently predicts renal function in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2003;3:878–884.
- (43) BESTARD O, NICKEL P, CRUZADO JM, et al. Circulating alloreactive T cells correlate with graft function in longstanding renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:1419–1429.
- (44) WRAMNER L, OLAUSSON M, SODERSTROM T, et al. Evidence of donor-specific cellular suppressor activity in donor-specific cell-mediated lympholysis unresponsiveness in renal transplant patients. *Transplantation* 1987;44:390–395.
- (45) WEIMAR W, RISCHEN-VOS J, DE KUIPER P, et al. Tapering immunosuppression in recipients of living donor kidney transplants. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19: 61-63.
- (46) ISRAELI M, KLEIN T, SREDNI B, et al. ImmuKnow: A new parameter in immune monitoring of pediatric liver transplantation recipients<sup>†</sup>. *Transplantation* 2006;82:663-668
- (47) KOWALSKI RJ, POST DR, MANNON RB, et al. Assessing relative risks of infection and rejection: a metaanalysis using an immune function assay. *Transplantation* 2006;82:663–668.
- (48) SALAMA AD, REMUZZI G, HARMON WE, et al, Challenges to achieving clinical transplantation tolerance. *J Clin Invest* 2001;108:943–948.
- (49) MELONI F, VITULO P, BIANCO AM, et al. Regulatory CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome. *Transplantation* 2004;77:762–766.
- (50) MUTHUKUMAR T, DADHANIA D, DING R, et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 2005;353:2342–2351.
- (51) FARIA B, SILVA S, ABREU M., NAPIMOGA M., T regulatory lymphocytes action in transplants, *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 2008;30:309-315
- (52) KORCZAK-KOWALSKA G, WIERZBICKI P, BOCIAN K, ET AL. The influence of immunosuppressive therapy on the development of CD4+CD25+ T cells after renal transplantation. *Transplant Proc* 2007;39:2721–2723
- (53) RONCO C, CHIARAMONTE S, REMUZZI G, *Kidney Transplantation: Strategies to Prevent Organ Rejection*. *Contrib Nephrol*. Basel, Karger, 2005, vol 146, pp 132-142
- (54) SAWITZKI B, BUSHELL A, STEGER U, ET AL. Identification of gene markers for the prediction of allograft rejection or permanent acceptance. *Am J Transplant* 2007;7:1091–1102.
- (55) ARIAS R, ALVAREZ B, VAZQUEZ A, et al, CD127<sup>low</sup> expression en CD4+CD125<sup>high</sup> T cells as immune biomarker of renal function in transplant patients, *Transplantation*, 2009, Vol 88
- (56) VASCONCELLOS LM, SCHACHTER AD, ZHENG XX, et al, Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation* 1998;66:562–566.
- (57) DENG MC, EISEN HJ, MEHRA MR et al, Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling. *Am J Transplant* 2006; 6: 150–160
- (58) BROUARD S, MANSFIELD E, BRAUD C, et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:15448–15453. Microarray evaluation of operational tolerance in transplant recipients; one of the first studies of its kind.
- (59) ZOU Y, STASTNY P, CUSAL C, et al, Antibodies against MICA Antigens and Kidney-Transplant Rejection, *The new engl and journa l o f medicine*, 2007, 357;13
- (60) LEMY A; ANDRIEN, M; WISSING, K; RYHAHI, K et al, Major Histocompatibility Complex Class 1 Chain-Related Antigen A Antibodies: Sensitizing Events and Impact on Renal Graft Outcomes, *Transplantation*. , 2010, 90(2):168-174.

- (61) BENJAMIN A, MORAES L, PORTO S, PONTES L, Are The Anti-Endothelial Cell Antibodies Important In Kidney Transplantation?, *J Bras Nefrol* 2004;26: 104-108
- (62) BRASILLE L, RODMAN E, SHIELD CF, CLARKE J, CERILLI J. The association of antivasular endothelial cell antibody with hyperacute Rejection: A case report. *Surgery* 1986 ;99:637.
- (63) CINES DB, POLLAK ES, BUCK CA, LOSCALZO J, ZIMMERMAN GA, MCEVER RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91:3527-61
- (64) PONTES LFS, SOUZA ERM, PORTO LC. Anticorpos anti-doador e rejeição de transplante renal. *J Bras Urol* 1999;25:1-9
- (65) MORAES JR, STASTNY P. Allo-antibodies to endothelial cell antigens. In: *Histocompatibility Testing 1975*. Copenhagen. Munksgaard. 1975:391-7
- (66) KOVAC J, ARNOL M, VIDAN-JERAS B, et al. Does pretransplant soluble CD30 serum concentration affect deceased-donor kidney graft function 3 years after transplantation? *Transplant Proc* 2008;40:1357– 1361.
- (67) HEINEMANN FM, REBMANN V, WITZKE O, et al. Association of elevated pretransplant sCD30 levels with graft loss in 206 patients treated with modern immunosuppressive therapies after renal transplantation. *Transplantation* 2007;83:706–711
- (68) MARTINEZ OM, VILLANUEVA J, ABTAHI S, et al. CD30 expression identifies a functional alloreactive human T-lymphocyte subset. *Transplantation* 1998; 65: 1240.
- (69) PELZL S, OPELZ G, DANIEL V, WIESEL M, SAL C, Evaluation of posttransplantation soluble cd30 for diagnosis of acute renal allograft rejection, *Transplantation*:2003 – 75, 421-423
- (70) SENGUL S, KEVEN H, GORMEZ U et al, Identification of Patients at Risk of Acute Rejection by Pretransplantation and Posttransplantation Monitoring of Soluble CD30 Levels in Kidney Transplantation *Transplantation* 2006;81: 1216–1219
- (71) VAIDYA S, PARTLOW D, BARNES T, GUGLIUZZA K, Pretransplant Soluble CD30 is a better predictor of postransplant development of donor-specific antibodies and acute vascular rejection than panel reactive antibodies, *Transplantation* 2006; 82: 1606-1609
- (72) GIERTSON DW Impact of delayed graft function and acute rejection on kidney graft survival. *Clin Transpl*: 2000, 467–80
- (73) ZWEIER J, LI H, SAMOUILOV A, DAVIS XL, Mechanisms of Nitrite Reduction to Nitric Oxide in the Heart and Vessel Wall; Heart and Lung Research Institute and The Division of Cardiovascular Medicine, Department of Internal Medicine, The Ohio State University College of Medicine, Columbus, Ohio, USA Nitric Oxide. 2010 February 15; 22: 83–90. doi:10.1016/j.niox.2009.12.004.
- (74) KHANAFER A, ILHAM M, NAMAGONDLU G, JANZIC A, SIKAS N, Increased Nitric Oxide Production During Acute Rejection in Kidney Transplantation: A Useful Marker to Aid in the Diagnosis of Rejection, Dona Smith, David Griffiths, Rapheal Chavez, and Argiris Asderakis, *Transplantation* 2007;84: 580–586
- (75) ALBRECHT EW, VAN GOOR H, TIEBOSCH AT, MOSHAGE H, TEGZESS AM, STEGEMAN CA, Nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in acute human renal allograft rejection. (2000) *Transplantation* 70:1610–1616
- (76) [LOVERRE A](#), [DIVELLA C](#), [CASTELLANO G](#) et al, T helper 1, 2 and 17 cell subsets in renal transplant patients with delayed graft function. [Transpl Int](#). 2011 Mar;24(3):233-42.
- (77) Li B, HARTONO C, DING R, ET AL. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* 2001;344:947–954.
- (78) ANGLICHEAU D, SUTHANTHIRAN M, Noninvasive prediction of organ graft rejection and outcome using gene expression patterns. *Transplantation*, 2008; 86: 192-199

- (79) MUTHUKUMAR T, DING R, DADHANIA D, ET AL. Serine proteinase inhibitor-9, an endogenous blocker of granzyme B/perforin lytic pathway, is hyperexpressed during acute rejection of renal allografts. *Transplantation* 2003;75:1565–1570.
- (80) DING R, LI B, MUTHUKUMAR T, DADHANIA D et al, CD103 mRNA levels in urinary cells predict acute rejection of renal allografts, *Transplantation* 2003 Vol. 75, 1307–1312, No. 8
- (81) TATAPUDI, R, MUTHUKUMAR, T, DADHANIA, D, DING, R, LI, B, SHARMA, V, Noninvasive detection of allograft inflammation by measurements of mRNA for IP-10 and CXCR3 in urine, *Kidney International*, 2004 Vol. 65 . 2390-2397
- (82) HAUSER IA, SPIEGLER S, KISS E, et al. Prediction of acute renal allograft rejection by urinary monokine induced by IFN- $\gamma$  (MIG). *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1849–1858.
- (83) HU H, AIZENSTEIN B, PUCHALSKI A, BURMANIA J, HAMAWY M, KNECHTLE S, Elevation of CXCR3-binding chemokines in urine indicates acute renal allograft dysfunction, *American journal of transplantation* 2004; 4: 432-437
- (84) MUTHUKUMAR T, DING R, DADHANIA D, ET AL. mRNA for FOXP3 in the urine of renal allograft recipients, *N Engl J Med* 2005; 353: 2342-2351
- (85) AFANEH C, MUTHUKUMAR T, LUBETZKY M et al, Urinary Cell Levels of mRNA for OX40, OX40L, PD-1, PD-L1, or PD-L2 and Acute Rejection of Human Renal Allografts *Transplantation* 2010;90: 1381–1387
- (86) LING X, SIGDEL T, LAU K et al, Integrative Urinary Peptidomics in Renal Transplantation Identifies Biomarkers for Acute Rejection *J Am Soc Nephrol*. 2010 April; 21: 646–653.
- (87) YONG D, TIANYU L, WANG K, HUANG Y, LI D, LIU J, Detection of acute renal allograft rejection by analysis of renal tissue proteomics in rat models of renal transplantation, 2008,: Vol 19: 952-959
- (88) WU J, CHEN Y, GU, W, Urinary proteomics as a novel tool for biomarker discovery in kidney diseases, *Journal of Zhejiang University – SCIENCE B*, 2010; 11:227-237
- (89) QUINTANA L, MANEUS E, SOLE A et al, Urine Proteomics Biomarkers in Renal, *Transplantation: An Overview* *Transplantation* 2009;88: 45–49
- (90) SCHAUB S, RUSH D, WILKINS J, et al. Proteomic-based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:219–227.
- (91) M. SUTHANTHIRAN, R. DING, V. SHARMA, M. ABECASSIS, D. DADHANIA, B. SAMSTEIN, S. KNECHTLE, W. HANCOCK, L. HAN, J. SCHWARTZ, J. LIU, N. BRIDGES, A. SHAKED, Urinary Cell Messenger RNA Expression Signatures Anticipate Acute Cellular Rejection: A Report from CTOT-04. *American transplant congress*, 2011, Philadelphia
- (92) SEMENTILLI A, DAVID D, MALHEIROS D, VISONA I, PEGAS K, FRANCO M, SOARES M, EDELWEISS M, CALDAS M, ARAÚJO S, Renal transplant pathology: main morphological findings and how to sign out biopsies, *Jornal Bras Patol Med lab*, Vol 44, 4, p 293-304
- (93) RUSH D, Protocol biopsies of renal transplant, *Saudi J Kidney Dis Transplant*, 2010; 21: 1-9
- (94) GRIMM P, MCKENNA R, NICKERSON P, et al, Clinical Rejection Is Distinguished from Subclinical Rejection by Increased Infiltration by a Population of Activated Macrophages, *J Am Soc Nephrol* 10: 1582–1589, 1999
- (95) ZARKHIN V, SARWAL MM. Microarrays: Monitoring for transplant tolerance and mechanistic insights. *Clin Lab Med* 2008;28:385–410
- (96) Shah S, Sarwal MM. Microarrays: interrogating the transplant transcriptome. *Clin Transpl* 2004;18:261–267
- (97) HOFFMANN SC, HALE DA, KLEINER DE, et al. Functionally significant renal allograft rejection is defined by transcriptional criteria. *Am J Transplant* 2005;5:573–581

(98) KOLLER H, STEURER W, MARK W, MARGREITER R, LHOTTA K, MAYER G, ROSENKRANZ R, Clearance of C4d deposition after successful treatment of acute humoral rejection in follow up biopsies: a report of three cases, *Transplant international*; 2004, 17:177-81.

