Maisa Carla Silveira Takenaka

**Peptídeos urinários no transplante renal humano: busca de
um perfil diferencial na tolerância operacional**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em Ciências
Área de concentração: Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Dra. Verônica Porto Carreiro de
Vasconcellos Coelho

São Paulo

2010

Maisa Carla Silveira Takenaka

**Peptídeos urinários no transplante renal humano: busca de
um perfil diferencial na tolerância operacional**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Dra. Verônica Porto Carreiro de
Vasconcellos Coelho

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Takenaka, Maisa Carla Silveira

Peptídeos urinários no transplante renal humano : busca de um perfil diferencial na tolerância operacional / Maisa Carla Silveira Takenaka. -- São Paulo, 2010.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Verônica Porto Carreiro de Vasconcellos Coelho.

Descritores: 1.Transplante de rim 2.Tolerância imunológica 3.Rejeição de enxerto
4.Biomarcadores 5.Urina 6.Proteômica 7.Peptídeos

USP/FM/DBD-224/10

Dedico este trabalho a minha família, meu porto seguro, por
todo amor e, principalmente, pela força para enfrentar os
obstáculos da vida

Ítaca

Quando começares a tua viagem para Ítaca,
Reza para que o caminho seja longo,
Cheio de aventura e de conhecimento.
Não temas monstros como os Ciclopes ou o zangado Poseidon:
Nunca os encontrarás no teu caminho
Enquanto mantiveres o teu espírito elevado,
enquanto uma rara excitação agitar o teu espírito e o teu corpo.
Nunca encontrarás os Ciclopes ou outros monstros
a não ser que os tragas contigo dentro da tua alma,
a não ser que a tua alma os crie em frente a ti.
Deseje que o caminho seja bem longo
para que haja muitas manhãs de verão em que,
com quanto prazer, com tanta alegria,
entres em portos que vês pela primeira vez;
Para que possas parar em postos de comércio fenícios
para comprar coisas finas, madrepérula, coral e âmbar,
e perfumes sensuais de todos os tipos –
tantos quantos puderes encontrar;
e para que possas visitar muitas cidades egípcias
e aprender e continuar sempre a aprender com os seus escolares.
Tem sempre Ítaca na tua mente.
Chegar lá é o teu destino.

Mas não te apresses absolutamente nada na tua viagem.

Será melhor que ela dure muitos anos
para que sejas velho quando chegares à ilha,
rico com tudo o que encontraste no caminho,
sem esperares que Ítaca te traga riquezas.

Ítaca deu-te a tua bela viagem.

Sem ela não terias sequer partido.

Não tem mais nada a dar-te.

E, sábio como te terás tornado,
tão cheio de sabedoria e experiência,
já terás percebido, à chegada, o que significa uma Ítaca.

Konstantínos Kaváfis

AGRADECIMENTOS

Antes de manifestar meus sinceros agradecimentos, gostaria de manifestar que este trabalho foi resultado da colaboração de muitas pessoas que contribuíram de diversas maneiras para concretizá-lo. Muito obrigada a todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram desta trajetória!!!

Gostaria de agradecer os pacientes que aceitaram participar deste trabalho gratuitamente, sem nenhum benefício próprio. Muito Obrigada!

Aos meus pais, Vicente e Neusa, por sempre me apoiaram nas minhas escolhas profissionais. A compreensão, o apoio e a força de vocês foram fundamentais para superar os obstáculos nesta caminhada. Obrigada de coração pelo amor!

Aos meus queridos irmãos, Fabio e Aninha, pela alegria e companheirismo em tudo. Obrigada pela força em todas as horas.

Ao meu companheiro Lucas, com quem tenho aprendido muito sobre a vida e a imunologia. Ao seu lado tenho vivido momentos muito especiais. Obrigada de coração pela ajuda para finalização desse trabalho. Muito obrigada de coração!!

Ao professor Jorge Kalil, pela oportunidade de desenvolver este trabalho no laboratório de imunologia do Incor e, principalmente, pelas discussões, críticas e sugestões nas reuniões de grupo.

A minha orientadora Verônica Coelho, a qual venho trabalhando a 7 anos. Responsável pela minha iniciação na vida científica, com você cresci

muito cientificamente. Você me mostrou o quanto é belo e ao mesmo tempo intrigante fazer ciência. Muito obrigada pela orientação!!

A professor Edecio pela ajuda em desenvolver a parte proteômica, pelas discussões e sugestões para melhorar este trabalho.

A doutora Luiza pelas discussões e sugestões nas reuniões de grupo.

Ao professor Mario Palma, pela oportunidade de desenvolver a análise de peptídeos em seu laboratório. Obrigada por todas as discussões sobre meu trabalho, sua ajuda foi fundamental neste trabalho.

Aos meus queridos amigos, Hernandez e Pedro, companheiros do projeto de tolerância operacional, que tiveram participação fundamental no progresso deste trabalho, sempre dispostos a ajudar, a discutir...Neste período construímos uma amizade, que levarei para sempre no coração. Hernandez, sua ajuda foi fundamental para finalização deste trabalho. Obrigada meu amigo!!!

A querida Sandra Mary, também companheira do projeto de tolerância operacional pelo carinho e por sempre estar disposta a ajudar.

Aos integrantes do projeto Longo Tempo, David Saitovith e Francine Lemos, pela ajuda no recrutamento e seleção dos sujeitos de pesquisa estudados.

A minha amiga Carol Borba pela amizade, construímos nossa amizade durante este período. Obrigada por sempre me receber de portas abertas na sua casa quando saí do lab de madrugada. Amiga você sempre estará no meu coração.

Ao meus colegas de trabalho do grupo Tx dividir e conviver esse período ao lado de todos vocês foi muito gratificante. Contem comigo sempre!!!

A Priscila, a Keity e a Helen por toda a sua ajuda, convívio e amizade.

Ao Daniel e Paulo, do laboratório da UNESP, que me ajudaram com a parte metodológica deste trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo financiamento da bolsa de estudo.

Sumário

Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xvi
Resumo.....	xviii
Summary	xx
1. Introdução	1
Transplante renal	1
Vias de alorreconhecimento	4
Tipos de rejeição no transplante renal	8
Mecanismos de regulação da resposta imune	12
Tolerância no transplante	17
Tolerância operacional	21
Avaliação da função renal do aloenxerto	31
Análise proteômica e função renal	33
2. Objetivo.....	39
3. Material e Métodos.....	40
3.1. Delineamento experimental.....	40
3.2. Sujeitos de pesquisa	40
3.2. Sujeitos de pesquisa	41
3.3. Recrutamento e coleta das amostras de urina	42
3.4. Processamento e armazenamento das amostras de urina	43
3.5. Etapa I - Extração dos peptídeos da urina	44
3.5.1. Protocolo A: Precipitação com acetona 100%	45

3.5.2. Protocolo B: Precipitação com solução de acetonitrila 20% em água deionizada	46
3.6. Etapa II - Dessalinização e concentração dos peptídeos da urina usando coluna Sep-Pak® C ₁₈ (Waters Corporation, Milford, MA)	46
3.7. Etapa III - Digestão proteolítica com a enzima tripsina	47
3.8. Shotgun Proteomics	48
3.9. Etapa IV - Análise dos peptídeos da urina pela abordagem <i>Shotgun Proteomics</i> usando o equipamento LC-MS-IT-ToF (Shimadzu, Kyoto)	49
3.10 Critérios da seleção das proteínas	52
3.11 Análise funcional das proteínas.....	52
3.12 Análise Estatística	52
4. Resultados.....	53
4.1. Sujeitos de pesquisa	53
4.1.2. Avaliação urinária e da função renal nos grupos de estudo	57
4.2. Análise comparativa do perfil de peptídeos urinários	61
4.3 Repertório diferencial dos peptídeos urinários e suas proteínas correspondentes, nos diferentes grupos do estudo.....	68
4.4. Frequência das proteínas identificadas a partir da fragmentação tríptica dos peptídeos presentes na urina entre os grupos de estudo.	74
4.4.1. Relação entre a frequência das Proteínas Identificadas e frequência dos indivíduos nos Diferentes Grupos de Estudo	76
4.5. Localização celular das proteínas identificadas entre os diferentes grupos de estudo.....	82

4.6. Distribuição das Proteínas Associadas ao Sistema Imune entre os Diferentes Grupos	86
4.7. Proteínas compartilhadas com o grupo Tolerância Operacional	89
4.7.1. Compartilhamento de proteínas entre os grupos TO e RC	91
4.7.2. Compartilhamento de proteínas entre os grupos TO e EST	95
4.7.3. Compartilhamento de proteínas entre os grupos TO e SA	99
4.8. Proteínas exclusivas dos diferentes grupos do estudo	104
4.9. Frequência das Proteínas Exclusivas nos Diferentes Grupos de Estudo	108
4.10 Painel de proteínas relacionadas com uma possível assinatura molecular urinária do grupo de tolerantes operacionais	110
5. Discussão	111
6. Conclusões	123
ANEXOS	126
ANEXO A	127
ANEXO B	133
7. Referências bibliográficas	171

Lista de Figuras

Figura 1. Dosagem de creatinina sérica dos indivíduos transplantados renais e indivíduos saudáveis, no momento da coleta da amostra de urina.....	58
Figura 2. Taxa de filtração glomerular calculada pela equação de Crockroft–Gault dos indivíduos transplantados renais no momento da coleta da amostra de urina.....	59
Figura 3. Níveis de proteinúria entre os grupos de estudo no momento da coleta da amostra de urina.....	59
Figura 4. Cromatograma dos fragmentos de peptídeos da urina dos indivíduos transplantados renais com rejeição crônica.....	62 e 63
Figura 5. Cromatograma dos fragmentos de peptídeos da urina dos indivíduos transplantados renais tolerantes operacionais.....	64
Figura 6. Cromatograma dos fragmentos de peptídeos da urina dos indivíduos transplantados renais estáveis com uso habitual de drogas imunossupressoras.....	65
Figura 7. Cromatograma dos fragmentos de peptídeos da urina dos indivíduos saudáveis.....	66 e 67
Figura 8. Média do número de sequências diferentes de peptídeos identificadas por grupo de estudo.....	71
Figura 9. Relação entre a frequência de proteínas diferentes identificadas e dos indivíduos em que foram detectadas.....	75
Figura 10. Localização celular das proteínas identificadas entre os grupos de transplantados renais e o grupo de indivíduos saudáveis.....	82

Figura 11. Caracterização funcional das proteínas identificadas nos diferentes grupos de estudo.....	84 e 85
Figura 12. Frequência de proteínas identificadas exclusivamente nos indivíduos dos grupos TO e RC.....	92
Figura 13. Frequência de proteínas identificadas exclusivamente nos grupos TO e RC, de acordo com a localização celular.....	94
Figura 14. Classificação funcional das proteínas diferentes identificadas somente nos grupos TO e RC.....	95
Figura 15. Frequência de proteínas identificadas exclusivamente nos indivíduos dos grupos TO e EST.....	98
Figura 16. Frequência de proteínas identificadas exclusivamente nos grupos TO e EST de acordo com a localização celular.....	98
Figura 17. Caracterização funcional das proteínas diferentes identificadas somente nos grupos TO e EST.....	99
Figura 18. Frequência de proteínas identificadas exclusivamente nos grupos TO e SA.....	100
Figura 19. Frequência de proteínas identificadas exclusivamente nos grupos TO e SA de acordo com a localização celular.....	102
Figura 20. Caracterização funcional das proteínas diferentes identificadas somente nos grupos TO e SA.....	103
Figura 21. Frequência de proteínas exclusivas de cada grupo de estudo de acordo com a localização celular.....	105
Figura 22. Classificação funcional das proteínas exclusivas nos diferentes grupos de estudo.....	107

Figura 23. Frequência de proteínas identificadas exclusivamente nos indivíduos dos grupos de estudo.....	109
--	-----

Lista de Tabelas

Tabela 1. História clínica dos diferentes grupos de indivíduos transplantados renais.....	55 e 56
Tabela 2. Caracterização da função renal dos indivíduos estudados no momento da coleta de urina.....	60
Tabela 3. Total de sequências de peptídeos e de proteínas identificados por indivíduo de estudo, utilizando-se a ferramenta MASCOT.....	70
Tabela 4. Total de proteínas identificadas pelo Mascot por grupo de estudo.....	72
Tabela 5. Distribuição do número de proteínas identificadas nos diferentes grupos de estudo.....	74
Tabela 6. Proteínas identificadas com maior frequência entre os indivíduos transplantados renais e saudáveis.....	76
Tabela 7. Proteínas identificadas na dos maioria indivíduos do grupo RC...	78
Tabela 8. Proteínas identificadas na maioria dos indivíduos do grupo TO...	79
Tabela 9. Proteínas identificadas na maioria dos indivíduos do grupo EST.	80
Tabela 10. Proteínas identificadas na maioria dos indivíduos do grupo SA..	81
Tabela 11. Proteínas relacionadas a resposta imune identificadas entre os 24 indivíduos do estudo.....	87
Tabela 12. Proteínas identificadas apenas nos grupos de transplantados renais.....	90
Tabela 13. Proteínas identificadas apenas nos grupos TO e RC.....	93
Tabela 14. Proteínas presentes apenas nos grupos TO e EST.....	97

Tabela 15. Proteínas identificadas apenas nos grupos TO e SA.....	101
Tabela 16. Localização celular das proteínas identificadas exclusivamente nos diferentes grupos de estudo.....	104
Tabela 17. Relação de proteínas identificadas exclusivamente nos indivíduos do grupo RC.....	133
Tabela 18. Relação de proteínas identificadas exclusivamente nos indivíduos do grupo TO.....	144
Tabela 19. Relação de proteínas identificadas exclusivamente nos indivíduos do grupo EST.....	155
Tabela 20. Relação de proteínas identificadas exclusivamente nos indivíduos do grupo SA.....	162

Resumo

Takenaka, MC. Peptídeos urinários no transplante renal humano: busca de um perfil diferencial na tolerância operacional [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

Um grupo especial de indivíduos transplantados renais mantém a função do enxerto estável após a total retirada da terapia imunossupressora, alcançando um estado imunológico chamado de *Tolerância operacional*. Ainda não há marcadores moleculares e celulares que discriminem a tolerância no transplante humano, e os seus mecanismos estão sendo investigados. O perfil de peptídeos presentes na urina pode trazer informações importantes sobre o estado fisiopatológico renal. Nós investigamos se a *tolerância operacional* apresenta um perfil diferencial de peptídeos urinários, potencialmente, relevante para diagnóstico deste estado imunológico, assim como para a compreensão de seus mecanismos. Realizamos análises qualitativas do extrato de peptídeos da urina de indivíduos dos diferentes grupos do estudo: saudáveis (SA, n=6), tolerantes operacionais (TO, n=5), rejeição crônica (RC, n=8) e estável sob terapia imunossupressora convencional (EST, n=5), utilizando a abordagem proteômica de *Shotgun*. Identificamos um total de 15283 diferentes peptídeos em todos os grupos, correspondentes a 646 proteínas distintas, distribuídas nos diferentes grupos: TO = 189, RC = 296, EST = 205 e no grupo SA 219 proteínas. Observamos proteínas exclusivas dos diferentes grupos: TO teve 87 proteínas exclusivas, RC 168, EST 106 e SA 108

proteínas. Apesar das proteínas exclusivas não terem sido compartilhadas por todos os indivíduos do mesmo grupo, a totalidade dos indivíduos de cada grupo apresentou várias dessas proteínas (cada indivíduo apresentou em média 15% das proteínas exclusivas de seu grupo). Das 646 proteínas identificadas, apenas 2,3% foram classificadas pelo *Gene ontology* como relacionadas ao sistema imune e os compartimentos celulares mais frequentes foram: núcleo 36% e citoplasma 23%. Destacamos algumas proteínas relacionadas à resposta imune, exclusivas de alguns grupos, como no grupo TO, a *C-C motif chemokine 24* (CCL24) e *Endothelin-1* e no grupo RC, a beta 2 microglobulina. Essas moléculas podem ter relevância nos mecanismos imunológicos desses estados clínicos. A abordagem proteômica aplicada neste trabalho permitiu a identificação de um perfil diferencial de peptídeos na urina de cada grupo diferente de estudo. Os peptídeos urinários diferenciais e suas respectivas proteínas podem ter relevância – funcional ou como biomarcadores - em relação ao estado fisiológico e às diferentes evoluções clínicas no transplante renal.

Descritores: Transplante de rim, Tolerância imunológica, Rejeição do enxerto, Biomarcadores, Urina, Proteômica, Peptídeos.

Summary

Takenaka, MC. *Urine peptides in human kidney transplantation: research for a differential profile on operational tolerance* [dissertation]. Faculty of Medicine, University of São Paulo, SP (Brazil); 2010

A special group of renal transplant recipients maintain stable graft function after the complete withdrawal of immunosuppression, achieving a state called *operational tolerance*. To date, there are no cellular or molecular biomarkers to discriminate human transplantation tolerance and the underlying mechanisms are being investigated. The profile of urinary peptides may provide important information about different renal physiopathological statuses. We investigated whether *operational tolerance* displays a differential urinary peptide profile, potentially relevant as biomarkers or for the understanding of mechanisms involved in tolerance. We performed qualitative analysis of peptide urinary extracts in individuals from different study groups: healthy (HI, n=6), operational tolerance (OT, n=5), chronic rejection (CR, n=8) e stable under conventional immunosuppression (Sta, n=5), using *Shotgun proteomics*. Altogether, we identified 15283 different peptides, corresponding to 646 distinct proteins, distributed in all groups: OT = 189, CR = 296, Sta = 205, and 219 proteins in HI. Several proteins were exclusively detected in specific groups: OT showed 87 exclusive proteins, CR 168, Sta 106 and HI 108 proteins. Although the exclusive proteins were not shared by all individuals from that specific group,

all individuals from each group presented several of the group-exclusive proteins (each individual presented an average of 15% of the proteins exclusive to his group). Of the 646 proteins identified, only 2.3% were classified in *Gene Ontology* as related to the immune system and the most frequent cellular compartments were: 36% from nucleus and 23% cytoplasmic. Of notice, some proteins related to the immune response were also group-exclusive, such as, in OT, a C-C motif chemokine 24 (CCL24) and Endothelin-1, and beta 2 microglobulin in CR. These proteins may display relevant roles in the mechanisms involved in these clinical statuses. In conclusion, the proteomic approach used in this study allowed the identification of a differential urinary peptide profile in each different study groups. The differential urinary peptides and their corresponding proteins may display a relevant role – functional or as biomarkers - in the state of homeostasis and in different clinical outcomes in renal transplantation.

Keywords: Kidney Transplantation, Immunologic tolerance, Allograft rejection, Proteomics, Peptide, Urine, Biomarkers.

1. Introdução

Transplante renal

O transplante renal é a terapêutica indicada aos indivíduos com doenças renais irreversíveis, com o objetivo de melhorar a sobrevida e a qualidade de vida dessas pessoas. No Brasil, na anos de 2009 foram realizados 2080 transplantes renais, que equivalem a 70,4% de todos os transplantes de órgãos sólidos realizados no país (ABTO, 2009). Esses dados epidemiológicos mostram a relevância do transplante de rim na saúde pública do país e a importância de estudos para melhorar a sobrevida do enxerto renal.

O transplante de órgãos, sem o correto uso de fármacos imunossupressores, desencadeia uma resposta imunológica efetora direcionada às células e/ ou aos tecidos transplantados, mediada principalmente por células T, resultando na rejeição do órgão transplantado. Além disso, mesmo com o permanente desenvolvimento de novas drogas imunossupressoras e com os avanços nos exames laboratoriais pré-transplante, a maior limitação para o sucesso do transplante de órgãos alogeneicos é a rejeição crônica (Nankivell *et al.*, 2003).

A rejeição é um processo de deterioração funcional e estrutural do enxerto, mediada principalmente por fatores imunológicos, porém fatores não imunológicos como a hipertensão e a toxicidade pelos inibidores de calcineurina, também podem contribuir para a degradação do rim transplantado. Dentre os fatores imunológicos envolvidos na rejeição,

destacamos como os principais alvos as moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*). Em humanos, as moléculas MHC são chamadas de antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês, *Human Leukocyte Antigens*).

O sistema HLA foi, primeiramente, descrito por Jean Dausset, Jan van Rood e colaboradores sendo responsável pela indução de rejeição de aloenxertos, em humanos (Rapaport *et al.*, 1965). Contudo, a função fisiológica desse sistema, que é a apresentação antígenos protéicos para os linfócitos T, só foi desvendada posteriormente (revisado por Delves e Roitt, 2000).

Em humanos, os genes que fazem parte do sistema HLA localizam-se no cromossomo 6. Sabe-se que o sistema HLA é poligênico e altamente polimórfico, contendo mais de 1000 diferentes alelos. As moléculas do sistema HLA são classificadas em classe I (HLA-A, B e C) e classe II (HLA-DR, DP e DQ). Na mesma região gênica do sistema HLA há outros genes que também participam da resposta imune como: HSP (do inglês, *Heat Shock Protein*); tapsina e TAP (transportador associado ao processamento de antígenos) que codificam proteínas que participam do processamento de antígenos via HLA classe I; proteínas do complemento, entre outras (revisado por Delves e Roitt, 2000).

As moléculas HLA são glicoproteínas de membrana plasmática que se ligam a peptídeos e, desta forma, podem ser reconhecidos por linfócitos T através do seu receptor de célula T (TCR, do inglês, *T Cell Receptor*). Os peptídeos associados às moléculas HLA de classe I, geralmente de origem

intracelular, são reconhecidos principalmente por linfócitos T CD8+. Em contra partida, os peptídeos derivados de proteínas extracelulares se associam às moléculas HLA de classe II e são reconhecidos principalmente por linfócitos T CD4+ (Delves e Roitt, 2000).

As moléculas MHC de classe I são expressas constitutivamente em todas as células nucleadas. Algumas citocinas como IFN- γ e TNF- β (Nagy *et al.*, 1998) podem aumentar a expressão das moléculas de MHC de classe I na superfície celular. As moléculas MHC de classe II são expressas por células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *Antigen-presenting cells*), sendo elas: células dendríticas, células B e macrófagos. Quando estimuladas, porém, outras células podem expressar moléculas MHC classe II e apresentar antígenos, como células endoteliais (Feng *et al.*, 2007) e basófilos (Sokol *et al.*, 2009).

As moléculas HLA do doador expressas na superfície das células do aloenxerto são os principais alvos de reconhecimento dos linfócitos T do receptor. No entanto, já foi descrito por diversos grupos de pesquisa (Magro *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2005), inclusive por nosso grupo, que outros sistemas não HLA como o sistema endotelial (Neumann *et al.*, 1992), assim como determinadas proteínas próprias como a HSP podem participar da resposta imune ao alotransplante (Caldas *et al.*, 2006).

Vias de alorreconhecimento

A resposta imune na rejeição é desencadeada principalmente pelos linfócitos T do receptor que reconhecem as moléculas HLA do doador expressas nas células e/ ou tecidos do órgão transplantado. Outras células do sistema imune podem participar dos mecanismos de rejeição do aloenxerto, como: macrófagos (Rocha *et al.*, 2003), células NK (Maier *et al.*, 2001), linfócitos B, neutrófilos (Rocha *et al.*, 2003). Aproximadamente 1-10% do repertório de linfócitos T periféricos são capazes de reconhecer moléculas HLA alogeneicas (revisado por Heeger, 2003). Uma possível explicação para a alta frequência de reconhecimento de moléculas HLA alogeneicas é que as células T específicas para moléculas HLA próprias tenham reatividade cruzada devido ao mimetismo molecular entre as moléculas HLA próprias e alogeneicas.

Atualmente, há descritas três vias de alorreconhecimento, nas quais as moléculas HLA do doador podem ser reconhecidas pelos linfócitos T do receptor, sendo elas: via direta, indireta e semi-direta. Ao longo da sobrevida do enxerto essas três vias de alorreconhecimento dos linfócitos T do receptor podem ocorrer concomitantemente.

Na via de alorreconhecimento direta os linfócitos T do receptor reconhecem o complexo peptídeo/ MHC intacto expresso na superfície das células do doador, sem necessidade do processamento de aloantígenos pelas células dendríticas do receptor (Lechler e Batchelor, 1982a). Em geral, na via direta de alorreconhecimento as células dendríticas do doador presentes no órgão transplantado migram para os órgãos linfóides

secundários do receptor iniciando uma resposta imune pela via direta de alorreconhecimento (Larsen *et al.*, 1990; Lakkis *et al.*, 2000). Além disso, estudo, *in vivo*, em modelo experimental de transplante cardíaco mostrou que as próprias células endoteliais vasculares do enxerto, que não desempenham classicamente função de células apresentadoras de antígenos, através da via direta de alorreconhecimento, foram capazes de ativar os linfócitos T CD8+ do receptor, resultando na rejeição do enxerto (Kreisel *et al.*, 2002), porém não foram capazes de ativar os linfócitos T CD4+ a uma resposta imune efetora ao enxerto (Kreisel *et al.*, 2004). Contudo, a via direta de alorreconhecimento pode participar do processo de rejeição tanto nos primeiros meses pós transplante, principalmente, devido à presença de leucócitos passageiros do doador no aloenxerto transplantado, como em longo prazo pós transplante, através da ativação dos linfócitos T CD8+ pelas células endoteliais do doador.

Lechler e Batchelor em 1982 propuseram uma segunda via de alorreconhecimento chamada de via indireta, que é a via fisiológica de apresentação de antígenos, nas quais as APCs do receptor processariam e apresentariam via HLA de classe II os antígenos derivados das moléculas HLA do doador para as células T CD4+ do receptor (Lechler e Batchelor, 1982b). Há dados experimentais suportando a relevância do papel da via indireta na resposta imune ao enxerto, como mostrado por Inaba e colaboradores em 1998 que, *in vivo*, em modelo experimental moléculas MHC podem ser apresentadas em forma de alopeptídeos pelas células dendríticas do receptor (Inaba *et al.*, 1998). Além disso, em um estudo de

transplante de pele em camundongos mostrou-se que em animais receptores do enxerto que não expressavam moléculas MHC de classe I rejeitaram enxertos de pele provindos de camundongos deficientes em moléculas MHC de classe II (Auchincloss *et al.*, 1993). Esse resultado só poderia ser explicado pela existência da via indireta de alorreconhecimento, onde os aloantígenos só poderiam ser apresentados por moléculas MHC de classe II do animal receptor.

Muitos estudos na literatura sugerem que a via indireta de alorreconhecimento tenha um papel importante na rejeição crônica do aloenxerto (Vella *et al.*, 1997; Baker *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001), presumivelmente através de uma resposta de hipersensibilidade tardia e produção de aloanticorpos. Ainda reforçando essa idéia, há estudos mostrando que as células T alorreativas indiretas são mais resistentes à imunossupressão convencional (Sawyer *et al.*, 1993).

Por outro lado, outros grupos, inclusive o nosso, têm discutido que a via indireta de alorreconhecimento também pode ter atividade imunorreguladora (Spadafora-Ferreira *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2006; Sánchez-Fueyo *et al.*, 2007). Em um estudo realizado em nosso laboratório, foi observado um predomínio de produção de IL-10 na alorresposta indireta a peptídeos do doador por células de indivíduos transplantados renais, tanto no período pré como no pós-transplante, sem detecção de proliferação celular, sugerindo que células T reguladoras possam fazer parte do repertório de células T envolvidas na alorreatividade indireta (Spadafora-Ferreira *et al.*, 2001). Mais recentemente, Jiang e colaboradores (2006)

observaram que células T reguladora (Treg), purificadas de sangue periférico de indivíduos sadios com alorreconhecimento pela via indireta, específico para o peptídeo HLA-A2, tinham uma maior capacidade de supressão antígeno específica do que as células T CD4⁺ CD25⁺ policlonais (Jiang *et al.*, 2006). Estes resultados sugerem que as células Treg com aloespecificidade indireta pode ser uma interessante abordagem terapêutica para indução de tolerância em alotransplantes.

A terceira via de alorreconhecimento nomeada de semi-direta por Herrera e colaboradores (2004) se baseia em um fenômeno biológico chamado trogocitose no qual, uma célula adquire o conteúdo citoplasmático ou fragmentos da membrana celular de outra célula com a qual interage (revisado por Ahmed e Xiang, 2010). Desta forma, na via semi-direta, moléculas MHC intactas oriundas das células do doador são transferidas para a superfície das APCs ou linfócitos T do receptor, propiciando a ativação de linfócitos T alorreativos (Herrera *et al.*, 2004). Foi mostrado pelo mesmo grupo que, *in vitro*, através do contato célula-célula, moléculas MHC e coestimuladoras, como CD80 e CD86 podem ser transferidas de uma célula para outra (Game *et al.*, 2005). Além disso, neste estudo mostrou-se que as células T que receberam as moléculas MHC e coestimuladoras passaram a exercer atividade funcional de estimular outras células T (Game *et al.*, 2005). Assim, esses dados conjuntamente sugerem que a via semi-direta de alorreconhecimento pode amplificar a resposta imune ao enxerto. No entanto, até o momento não há relatos na literatura mostrando, *in vivo*, no modelo de transplante, a contribuição e a relevância biológica da via

semi-direta de alorreconhecimento no desencadeamento da rejeição.

Tipos de rejeição no transplante renal

No transplante renal, a rejeição é, atualmente, classificada de acordo com as alterações histopatológicas observadas e os fatores imunológicos nela envolvidos, seguindo os critérios de Banff 2005 que foram recentemente modificados (Solez *et al.*, 2007). Assim, as rejeições são classificadas como: aguda ou crônica, mediadas por anticorpos e/ou por células T (Solez *et al.*, 2007).

Dados da literatura mostram que a prevalência de rejeição aguda no primeiro ano pós-transplante é de 5 a 10% em indivíduos não sensibilizados, das quais aproximadamente 25% são mediadas por anticorpos direcionados aos antígenos HLA do doador (Cornell *et al.*, 2008). A diminuição da ocorrência de rejeição aguda no transplante renal se deve tanto à realização dos exames laboratoriais pré-transplante (prova cruzada, painel de reatividade e tipagem HLA) como aos avanços das drogas imunossupressoras (Kindt *et al.*, 2007).

A rejeição aguda mediada por células T é caracterizada pela presença de células mononucleares infiltrantes no aloenxerto, como: macrófagos, linfócitos B e, principalmente, linfócitos T CD4+ e CD8+, acompanhada por inflamação dos túbulos e muitas vezes das artérias renais, e ausência da fração C4d do complemento (Colvin e Nickleleit, 2006). Os principais mecanismos efetores de agressão ao enxerto neste tipo de rejeição são: hipersensibilidade tardia, mediada por citocinas e quimiocinas inflamatórias,

sendo as principais IFN- γ , TNF- α e β e RANTES, MIP-1 α , respectivamente, e citotoxicidade mediada por perforina e granzimas e/ ou por FasL (Hoffmann *et al.*, 2005). Os episódios de rejeição aguda ocorrem, geralmente, entre as primeiras semanas pós-transplante (revisado por Monaco, 2004) e são facilmente revertidas com tratamento imunossupressores convencionais (Helderman *et al.*, 2001).

A rejeição aguda mediada por anticorpos é causada por anticorpos direcionados, principalmente, às moléculas HLA e ABO expressas pelas células endoteliais do doador (Rocha *et al.*, 2003) capazes de ativar a cascata do complemento, resultando na lise celular, trombose e necrose do órgão transplantado. Além dos aloanticorpos, Dragun e colaboradores verificaram que autoanticorpos direcionados aos receptores do tipo I da angiotensina II podem também participar da rejeição mediada por anticorpos (Dragun *et al.*, 2005). Esse dado nos leva a interpretar que no processo de rejeição, tanto moléculas do doador quanto moléculas próprias, podem ser alvos de reconhecimento e ativação da resposta imune ao aloenxerto. Porém, são necessários estudos direcionados para sustentar essa hipótese como a presença de polimorfismo nesses receptores, assim como avaliar a existência pré-transplante desses autoanticorpos no soro dos receptores.

Os principais fatores de risco para rejeição mediada por anticorpos são a pré-sensibilização do receptor através da gravidez, transfusão sanguínea ou por transplantes prévios, diminuição da imunossupressão, muitas vezes, devido ao surgimento de tumores, infecções e à toxicidade causada pelas drogas imunossupressoras, ou ainda pela não aderência ao

tratamento. Os achados histopatológicos encontrados nesse tipo de rejeição são: mínimo processo inflamatório, presença de neutrófilos e monócitos nos capilares peritubulares e glomerulares, e detecção da fração C4d nos capilares peritubulares do aloenxerto, indicando ativação da cascata do complemento (revisado por Moll e Pascual, 2005; Solez *et al.*, 2007). Nesse tipo de rejeição, 88–95% dos indivíduos com deposição de C4d têm anticorpos anti-doador (anti-HLA) na circulação (Colvin, 2007). No entanto, a rejeição mediada por anticorpos pode ocorrer na ausência de aloanticorpos circulantes, provavelmente devido à absorção dos mesmos pelo enxerto (Martin L *et al.*, 2005). Outro mecanismo que pode ocorrer na rejeição mediada por anticorpos é independente do complemento, através da citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), onde os anticorpos se ligam as células alvo e através do reconhecimento da porção Fc desses anticorpos por receptores $Fc\gamma RIIA$ (CD16) presentes nas células NK e macrófagos há uma liberação de citocinas e grânulos, contendo perforina e granzima, que promovem a apoptose da célula alvo (revisado por Cornell *et al.*, 2008).

Atualmente, a rejeição crônica é a principal causa de perda do enxerto renal. Ela pode ocorrer por mecanismos celulares ou humorais ou ambos. Geralmente, é um processo mais latente e ocorre mais frequentemente, em um período mais tardio após o transplante. As principais alterações histopatológicas da rejeição crônica são: **(i)** duplicação ou multilaminação da membrana basal glomerular (glomerulopatia do transplante) e dos capilares peritubulares, **(ii)** arteriopatia do transplante, caracterizada pelo

espessamento da camada íntima e proliferação de células musculares lisas em artérias do enxerto, e menos especificamente, **(iii)** fibrose intersticial e **(iv)** atrofia tubular (Colvin e Nickleit, 2006). As principais manifestações clínicas observadas em indivíduos transplantados renais com rejeição crônica são: hipertensão arterial e proteinúria.

A patogênese da rejeição crônica é ainda pouco conhecida, porém há vários dados experimentais e epidemiológicos que indicam ser um processo multifatorial, com a participação tanto de fatores imunológicos como de fatores não imunológicos. Os principais fatores imunológicos que estão relacionados à progressão da rejeição crônica em indivíduos transplantados renais são: disparidades de antígenos HLA entre o doador e o receptor, sensibilização pré-transplante do receptor dirigido a antígenos HLA, episódios anteriores de rejeição aguda, injúria do órgão transplantado causada pelo tempo de isquemia e reperfusão pré e/ ou durante a cirurgia, e imunossupressão inadequada.

A injúria do aloenxerto causada por isquemia e reperfusão resulta em dano tecidual com uma consequente resposta inflamatória e o aumento da expressão de moléculas como: proteínas de choque térmico (HSP, do inglês, *Heat Shock Protein*), moléculas de adesão, citocinas e quimiocinas, que sinalizam uma resposta imune inflamatória.

Atualmente, há vários protocolos com inúmeros tipos de drogas imunossupressoras, direcionadas tanto para inibir a resposta celular como a resposta humoral. Embora as drogas imunossupressoras sejam as principais responsáveis pelo aumento da sobrevida do aloenxerto, elas não agem

unicamente na resposta imune dirigida ao aloenxerto e induzem um estado de imunossupressão, aumentando o risco do indivíduo para infecções e desenvolvimento de neoplasias. Além disso, as drogas imunossupressoras causam importantes efeitos colaterais (mielossupressão, nefrotoxicidade, distúrbios metabólicos) (revisado por Lisik *et al.*, 2005) e são pouco eficientes no tratamento da rejeição crônica, que é a principal causa da perda mais tardia do aloenxerto. Deste modo, a busca de novos protocolos terapêuticos mais eficazes e com menores efeitos colaterais continua sendo uma necessidade.

Mecanismos de regulação da resposta imune

O sistema imune, através do reconhecimento de moléculas próprias (autoantígenos) e não próprias, é um dos sistemas que contribui para manter a homeostase do organismo. Considera-se tolerância imunológica ao próprio um processo fisiológico de homeostase do organismo no qual é mantido um estado de não agressão aos tecidos próprios em indivíduos imunocompetentes, por meio de mecanismos da tolerância central e da tolerância periférica. No entanto, é importante ressaltar que, fisiologicamente, o nosso organismo também pode também manter através dos mecanismos periféricos de tolerância, um estado de tolerância a organismo alogênico, como na gestação, onde o organismo da mãe não rejeita o feto, e a microorganismos, como na simbiose entre a microbiota e a mucosa gastrointestinal.

A tolerância central é um processo em que a grande maioria das

células T e B imaturas adquirem tolerância a antígenos próprios durante sua maturação no timo e medula óssea, respectivamente. Dessa forma, no timo, somente os linfócitos T imaturos cujos receptores (TCR) reconhecem com afinidade intermediária os complexos MHC-peptídeos próprios apresentados pelas células epiteliais tímicas são selecionados positivamente e recebem sinais para a sua maturação (seleção positiva).

Por outro lado, os linfócitos T imaturos que reconhecem com forte avidéz ou que não reconhecem os complexos MHC-peptídeos próprios apresentados pelas células epiteliais tímicas, morrem por apoptose (seleção negativa) (revisado por Delves e Roitt, 2000). Algumas células, no entanto, podem sobreviver a este processo, mesmo com uma interação de alta afinidade. A maioria dessas células se diferenciam em células T reguladoras (Treg), uma subpopulação de linfócitos T CD4 que expressam na sua superfície a cadeia α (alfa) do receptor de IL-2 (CD25) e o fator de transcrição forkhead box protein P3 (Foxp3); denominadas como células Treg naturais, porque são geradas naturalmente no timo (revisado por Kyewski *et al.*, 2006). Acredita-se que a seleção tímica desempenhe um papel importante na autotolerância dos linfócitos T, diminuindo a possibilidade de maturação e ativação de linfócitos T autorreativos com maior potencial de serem agressivos na periferia (Cohen, 1992 e 2002).

Mesmo com o processo de seleção tímica, há um grande número de células T autorreativas que fazem parte do repertório fisiológico de células T maduras na periferia (Cohen, 1992 e 2002). Geralmente, estas células T autorreativas não são ativadas e não induzem autoimunidade patológica,

indicando que existem outros mecanismos de regulação na periferia que são capazes de manter a tolerância ao próprio.

Ao contrário da tolerância central que é direcionada a moléculas próprias, a tolerância periférica é constituída de diversos mecanismos que são capazes de evitar o desenvolvimento de uma resposta imune efetora, seja frente a moléculas próprias ou não próprias, através **(i)** da deleção por apoptose de células T, **(ii)** da indução de anergia, um estado não-proliferativo induzido pela ausência de sinais coestimuladores nas APCs, **(iii)** de moléculas que inibem a produção de IL-2 e proliferação das células T, **(iv)** da modificação do tipo de resposta, ou desvio imunológico através, principalmente, da mudança na produção de citocinas inflamatórias para citocinas imunorreguladoras como, IL-4 e IL-10; **(v)** da apresentação de antígenos por células dendríticas imaturas ou tolerogênicas e **(vi)** da supressão por células T reguladoras naturais e células T reguladoras induzidas, que diferenciam das células Treg naturais por serem geradas na periferia sob estimulação antigênica e na presença de TGF- β (revisado por Wood e Sakaguchi, 2003; Hayday e Tigelaar, 2003, Mueller, 2010).

A deleção por apoptose na periferia de células autorreativas e de células T ativadas é um dos mecanismos periféricos que controlam a resposta imune. Estudos mostram que a apoptose induzida pela via Fas/FasL (moléculas expressas na superfície de células T ativadas e que têm expressão aumentada em processos inflamatórios) e pela ativação de moléculas intracelulares pró-apoptóticas como *Bim*, são importantes na deleção de células autorreativas presentes na periferia (Watanabe –

Fukunaga *et al.*, 1992; Davay *et al.*, 2002).

Outro mecanismo importante de regulação da resposta imune é a expressão de moléculas que estão associadas com a supressão de células T ativadas. Neste contexto, uma das principais moléculas inibidoras estudadas é a molécula CTLA-4 (do inglês, *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*). Essa molécula é membro da superfamília das imunoglobulinas e é expressa constitutivamente em células Treg, mas que tem sua expressão também aumentada em células T que foram ativadas (Chikuma e Bluestone, 2003). O CTLA-4, assim como a molécula coestimuladora CD28, interage com as moléculas B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) expressas na superfície das APCs. Ao contrário do CD28 que participa do segundo sinal para ativação de células T *naive*, o contato célula-célula de CTLA-4 com a molécula B7 presente na APC induz um sinal inibitório para as células T efectoras, regulando negativamente a resposta imune mediada por essas células.

Outra molécula com função inibidora é a PD-1 (do inglês, *Programmed cell death-1*), membro da superfamília B7-CD28, e expressas principalmente por células T CD4+ e CD8+ ativadas (Fife e Bluestone, 2008). Essa molécula pode se ligar em dois ligantes, o PD-L1 (B7-H1) e o PD-L2 (B7-DC), expressos por APCs e diversos tipos de células parenquimais. A ligação de PD-1 com seu ligante leva à diminuição da proliferação e da produção de IL-2 (Fife e Bluestone, 2008).

A supressão da resposta imune pelas células T reguladoras é um importante mecanismo de tolerância periférica. As células reguladoras são divididas em células T reguladoras naturais (Sakaguchi *et al.*, 1995) e

induzidas (Chen *et al.*, 1994). Ambos os subtipos de células T reguladoras têm a capacidade de inibir a ativação da resposta imune exacerbada ou lesiva ao organismo. Embora muitos dos mecanismos pelos quais as células T reguladoras exercem suas funções ainda não tenham sido elucidados, há trabalhos nos quais é mostrado que as células T reguladoras, em humanos, podem suprimir *in vitro*, uma resposta imune através de interações célula-célula e/ ou pela produção de citocinas, incluindo IL-10 e TGF- β (Dieckmann *et al.*, 2002; revisado por Levings *et al.*, 2002).

Tanto em modelos experimentais como em humanos, células Treg naturais têm sido apontadas como responsáveis pela manutenção da tolerância ao próprio, visto que indivíduos ou camundongos deficientes de Foxp3 desenvolvem doenças autoimunes (Bennett *et al.*, 2001, Brunkow *et al.*, 2001). Além disso, as células Treg CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ estão envolvidas com a regulação negativa de algumas doenças autoimunes em modelos experimentais (Read *et al.*, 2000) e na rejeição de aloenxertos, através de mecanismos dependentes de CTLA-4, IL-10 e TGF- β (Taylor *et al.*, 2001; Kingsley *et al.*, 2002).

Como dito anteriormente, as células T reguladoras induzidas são as células T que adquirem função reguladora na periferia. Entre as células Treg induzidas, podemos citar as células T reguladoras tipo I (Tr1), que se diferenciam de células T CD4⁺ *naïve* na presença de IL-10 (Groux *et al.*, 1997), dexametasona e vitamina D₃ *in vitro* (Barrat *et al.*, 2002). As células dendríticas imaturas também promovem a geração de populações de células T tolerogênicas com características das células Tr1 (Levings *et al.*,

2005). As células Tr1 quando ativadas pelo TCR produzem IL-10, TGF- β , IFN- γ (Chen *et al.*, 2003) e possuem baixa capacidade proliferativa *in vitro* (Bacchetta *et al.*, 2002). Funcionalmente, as células Tr1 suprimem tanto células T *naïve* como células de memória Th1 e Th2 através da produção de IL-10 e TGF- β (revisado por Levings *et al.*, 2002; Cavani *et al.*, 2000). Em modelos animais, tem sido sugerido que a diferenciação das células Tr1 pode ser controlada por certos tipos de células dendríticas, que promovem a produção de IL-10 (Jonuleit *et al.*, 2000).

Outra população de células T reguladoras induzidas são as células T helper tipo 3 (Th3), produtoras de TGF- β (Chen *et al.*, 1994). Essas células foram descritas em modelos de tolerância oral e, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, se diferenciam em células T reguladoras na presença de TGF- β . Há inúmeros dados na literatura mostrando que essas células são capazes de suprimir diferentes tipos de resposta imune, como respostas do tipo Th1, Th2 e Th17 (como revisado por Faria e Weiner, 2005, Mueller, 2010, Sakaguchi *et al.*, 2009)

Tolerância no transplante

A indução de tolerância imunológica em indivíduos transplantados tem sido perseguida como um desafio para se alcançar um maior sucesso no transplante clínico. Em modelos experimentais as abordagens mais utilizadas para a indução de tolerância ao alotransplante são: o uso de agentes bloqueadores de coestimulação, agentes depletadores de linfócitos T, transferência de células T reguladoras e indução de microquimerismo

através da transfusão de sangue doador-específica ou do transplante de células hematopoiéticas, previamente ao transplante (revisado por Kean *et al.*, 2006). Vários grupos de pesquisadores obtiveram resultados satisfatórios na indução de tolerância ao aloenxerto em diferentes modelos experimentais (Fu *et al.*, 1996; Ochando *et al.*, 2006). Em um estudo interessante, feito em um modelo murino de tolerância ao aloenxerto cardíaco, mostrou-se que mesmo após a geração de células T reguladoras CD4+CD25+, não houve comprometimento da imunidade contra vírus, *in vitro* e *in vivo* (Bushell *et al.*, 2005). Este dado tem potencial relevância clínica, uma vez que a imunossupressão mediada por células Treg preservou a imunidade contra o vírus da influenza, sugerindo que a imunossupressão dirigida ao enxerto pelas células Treg preservou a imunocompetência do animal a microorganismos.

Um fenômeno observado nos protocolos para induzir tolerância no transplante, em modelos experimentais, é a tolerância infecciosa (revisado por Waldmann *et al.*, 2006). Na tolerância infecciosa, observou-se que a transferência de células mononucleares de animais tolerizados por anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8 não depletos foi capaz de transmitir às células virgens de animais a capacidade de induzir tolerância ao enxerto (revisado por Waldmann *et al.*, 2006).

Tanto no contexto de modelos animais de autoimunidade patológica, como de transplante, a transferência passiva de células T CD4+CD25+ com fenótipo regulador foi capaz de inibir o desenvolvimento de doenças autoimunes (Sakaguchi *et al.*, 1995, Suri-Payer *et al.*, 1996) e, nos modelos

de transplante, aumentar a sobrevida do aloenxerto em animais (Bushell *et al.*, 2005). Esses dados reforçam a importância dessas células na regulação de respostas imunes inflamatórias e apontam a possibilidade de indução de tolerância tanto no contexto de autoimunidade patológica como em alotransplantes.

Outros fenótipos de células T com atividade reguladora foram descritos tanto no contexto de transplante quanto no de doenças autoimunes em humanos, sendo elas: células T CD8+CD28- (Liu *et al.*, 1998); células NKT (Seino *et al.*, 2001), células T CD4-CD8- (Zhang *et al.*, 2000). Outros tipos celulares não linfóides também podem ter função de regular a resposta imune no transplante alogeneico, dentre eles podemos citar as células dendríticas mieloides imaturas (DePaz *et al.*, 2003), as células dendríticas plasmocitoides (Ochando *et al.*, 2006) e as células mesenquimais (Bartholomew *et al.*, 2002).

As células dendríticas têm um papel muito importante na ativação dos linfócitos T. Essas células quando maduras aumentam a expressão de moléculas MHC, coestimuladoras e de adesão na sua superfície, e secretam citocinas necessárias à ativação dos linfócitos T, gerando uma resposta imune efetora. Muitos pesquisadores, objetivando induzir tolerância ao aloenxerto cardíaco, verificaram, tanto em modelos de camundongos (Fu *et al.*, 1996) como de ratos (DePaz *et al.*, 2003), que a injeção de células dendríticas imaturas foi capaz de induzir um aumento na sobrevida dos transplantes. Os mecanismos responsáveis pela tolerância induzida pelas células dendríticas imaturas incluem: a falta de ativação dos linfócitos T pela

ausência de sinais coestimuladores, indução de apoptose das células T reativas pelas interações Fas/FasL e indução de células T reguladoras Tr1 e Th3 (Jonuleit *et al.*, 2000).

Outro tipo de células dendríticas que pode regular a resposta imune no transplante alogeneico são as células dendríticas plasmocitóides (pDC). Essas células têm um papel importante na indução e manutenção da tolerância, propriedades que dependem da ativação do receptor de IFN do tipo I. Quando imaturas, as pDCs apresentam baixa expressão de moléculas MHC e coestimuladores. Esse subtipo de células dendríticas é encontrado principalmente no sangue periférico e na medula óssea, e nas regiões de células T nos órgãos linfóides secundários. *In vivo*, o potencial tolerogênico das pDCs foi demonstrado pela sua administração em modelos experimentais de transplante cardíaco. Essas células induziram a geração de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ CCR4⁺, resultando na tolerância ao transplante (Ochando *et al.*, 2006).

Em resumo, há vários protocolos de indução de tolerância no transplante alogeneico em modelos animais, tanto através de terapias celulares usando células T com perfil regulador, ou outros tipos celulares como as células dendríticas, como através do uso de novos anticorpos monoclonais que podem regular a resposta imune no transplante. Porém, há uma grande dificuldade na tradução desses diferentes protocolos de indução de tolerância para a clínica devido a diversos fatores. Dentre eles, destacamos as diferenças moleculares existentes entre as espécies e a presença de um grande repertório de células T de memória, em humanos,

que podem reconhecer cruzadamente aloantígenos do enxerto, desencadeando uma resposta imune inflamatória. Além disso, muitos protocolos de indução de tolerância, em camundongos, são feitos através do bloqueio de moléculas coestimuladoras que não são necessárias na ativação de células T de memória, dificultando a reprodução desses protocolos na clínica. Outra questão potencialmente importante refere-se ao emprego, na clínica, de drogas imunossupressoras, interferindo nos mecanismos envolvidos na indução e na manutenção da tolerância imunológica, como é o caso das drogas inibidoras dos canais de cálcio (revisado por Elster *et al.*, 2004).

Tolerância operacional

Apesar do recorrente surgimento de casos de perda do enxerto, por rejeição crônica, entre os indivíduos transplantados, há um pequeno grupo de transplantados, chamado de tolerante operacional, que mantém boa função do enxerto a longo prazo, mesmo após a retirada total das drogas imunossupressoras.

Este grupo de indivíduos, que se encontra em estado chamado de “tolerância operacional”, contrasta com os indivíduos que evoluíram com rejeição crônica e que tiveram perda de função do enxerto. Este fenômeno foi observado em indivíduos transplantados hepáticos (Thomson *et al.*, 2001; Mazariegos *et al.*, 2005) e também em indivíduos transplantados renais (Strober *et al.*, 2000; Brouard *et al.*, 2005). Uma melhor compreensão das diferenças imunológicas observadas entre esses indivíduos poderá ajudar na

elucidação de mecanismos básicos que participam da regulação da resposta inflamatória ao enxerto, além de poder fornecer bases para novas intervenções terapêuticas para indução de respostas imunorreguladoras, assim como para o estabelecimento de critérios de diagnóstico sobre este estado de não agressão ao órgão transplantado.

Define-se tolerância operacional como sendo um estado estável de sobrevida do aloenxerto, por um período ≥ 1 ano, com características funcionais normais em um receptor não imunossuprimido (Roussey-Kesler *et al.*, 2006). Outro estado considerado importante é o do “quase” tolerante, no qual indivíduos transplantados estáveis com longo tempo de transplante requerem o uso de baixas doses de imunossupressores (Ashton-Chess *et al.*, 2006).

Como não são conhecidos parâmetros preditivos confiáveis de tolerância no contexto clínico, a retirada de imunossupressão e a observação de tolerância operacional ocorrem principalmente em dois contextos. Uma situação é a retirada da imunossupressão devido aos efeitos colaterais causados por essas drogas, como nefrotoxicidade e surgimento de neoplasias. E em outras vezes, sendo essa a maioria dos casos, os indivíduos suspenderam o uso da imunossupressão por iniciativa própria. É descrito que após a retirada das drogas imunossupressoras, muitos indivíduos transplantados renais foram capazes de manter um funcionamento estável do aloenxerto por um período transitório, mas posteriormente perderam a função renal (revisado por Ashton-Chess *et al.*, 2006). No entanto, outros indivíduos transplantados renais mantiveram uma

função estável do aloenxerto por muitos anos após a retirada das drogas imunossupressoras, mostrando assim, que o estado de “tolerância operacional” pode ser mantido por longo tempo (revisado por Ashton-Chess *et al.*, 2006).

Estudos imunológicos neste grupo de indivíduos têm sido realizados visando a caracterização de mecanismos imunológicos envolvidos no estado de “tolerância operacional”. Em alguns estudos realizados com este grupo de transplantados, foram observadas uma hiporresponsividade específica ao doador através de reações leucocitárias mistas, juntamente, com a redução de citocinas do tipo Th1 e a presença de microquimerismo (Cai *et al.*, 2004) e a existência de anticorpos antidiotípicos capazes de inibir a resposta alogênica em cultura linfocitária mista (Miyajima *et al.*, 1989). Também foram relatadas uma diminuição da resposta DTH (do inglês, *Delayed Type Hypersensitivity*) contra antígenos do doador, mediada por TGF- β e IL-10 (VanBuskirk *et al.*, 2000). Porém, também é relatada a permanência de precursores citolíticos dirigidos a antígenos HLA do doador, indicando que a tolerância no transplante humano pode ocorrer sem a perda da memória imunológica para antígenos do doador (Vandekerckhove *et al.*, 1990).

Sabendo da importância das células T reguladoras na tolerância periférica, alguns grupos de pesquisa, inclusive o nosso, avaliaram a frequência desta população celular em indivíduos tolerantes operacionais. Li e colaboradores (2004) não observaram diferença no número absoluto de células T CD4+CD25+ entre os indivíduos transplantados hepáticos em estado de “tolerância operacional” e indivíduos saudáveis (Li *et al.*, 2004).

Recentemente, outro grupo de pesquisadores observou que o fenótipo das células do sangue periférico era semelhante em indivíduos transplantados renais em estado de “tolerância operacional” e indivíduos saudáveis. Entretanto, indivíduos com rejeição crônica tinham uma diminuição de células T CD4+CD25^{hi} e níveis menores de transcritos para Foxp3 quando comparados com os indivíduos clinicamente tolerantes. Em contraste, os indivíduos com rejeição crônica também apresentaram células T CD4+CD25⁻ expressando marcadores de citotoxicidade como: NKG2D+CD94+, CD57+CD27-CD28- (Louis *et al.*, 2006), sugerindo haver um desequilíbrio entre populações reguladoras e próinflamatórias. Em outro estudo desenvolvido por Tokita e colaboradores (2008) foi mostrado que a frequência de células T CD4+CD25^{hi} Foxp3+ (Treg) circulantes de indivíduos tolerantes operacionais era significativamente maior quando comparados com o grupo com uso habitual de imunossupressores (Tokita *et al.*, 2008). Em nosso grupo observamos que os indivíduos transplantados renais em estado de tolerância operacional, não apresentaram diferença significativa tanto do número absoluto quanto da porcentagem de células T CD4+CD25^{hi}Foxp3+ e CD4+CD25^{Low}Foxp3+ em relação aos indivíduos transplantados com função estável do enxerto com uso de baixa imunossupressão e aos indivíduos saudáveis. No entanto, encontramos uma diminuição dessa população celular com fenótipo regulador nos indivíduos transplantados com rejeição crônica e nos indivíduos estáveis com doses habituais de drogas imunossupressoras (Moraes-Vieira *et al.*, 2010). Nossos resultados corroboram os achados da literatura, sugerindo que a

preservação desta população celular com perfil regulador seja importante na manutenção da tolerância ao aloenxerto nos transplantes renal e hepático. Além disso, em estudo prospectivo de retirada das drogas imunossupressoras, em indivíduos transplantados hepáticos com função estável do enxerto, mostrou-se haver uma maior frequência de células T CD4+CD25^{hi} Foxp3+ nos indivíduos que evoluíram para um estado de tolerância operacional, em comparação aqueles indivíduos transplantados que tiveram episódios de rejeição durante o protocolo de retirada do tratamento com os imunossupressores (Pons *et al.*, 2008), sugerindo que essa população de células T tem um papel importante na indução de tolerância no transplante humano. Assim, acredita-se, hoje, que a análise das células T CD4+CD25^{hi} Foxp3+ possa servir, futuramente, como um parâmetro para identificarmos potenciais indivíduos transplantados que possam evoluir para um estado de tolerância operacional.

Outros mecanismos de regulação da resposta imune, na periferia, são a apresentação de antígenos por células dendríticas com perfil tolerogênico e a inibição da coestimulação através de moléculas reguladoras. Neste sentido, Mazariegos e colaboradores (2003) observaram, no contexto de transplante hepático, um maior número de precursores de células dendríticas plasmocitóides 2 (pDC2) no sangue periférico de indivíduos que estavam clinicamente em estado de “tolerância operacional” em relação aos indivíduos que faziam uso de baixas doses de drogas imunossupressoras (Mazariegos *et al.*, 2003). Posteriormente, este mesmo grupo de pesquisadores mostrou que o uso de drogas imunossupressoras como,

corticosteróides, tacrolimus ou de ambas, não afetou, significativamente, a frequência de subtipos de células dendríticas no sangue periférico de indivíduos que estavam em estado de “tolerância operacional” comparado com os indivíduos que usavam baixas doses de drogas imunossupressoras (Mazariegos *et al.*, 2005). Esses resultados sugerem que as drogas imunossupressoras, neste contexto, não interferem na expressão diferencial de subtipos de células dendríticas entre os grupos de indivíduos transplantados estudados. Recentemente, Tokita e colaboradores (2008) mostraram que indivíduos transplantados hepáticos tolerantes operacionais e indivíduos transplantados com uso de baixas doses de imunossupressores apresentam uma maior porcentagem de pDCs em relação às células dendríticas mielóides (mDCs) no sangue periférico em relação aos indivíduos transplantados com uso habituais de imunossupressores e aos indivíduos saudáveis. Além disso, observaram que as pDCs dos indivíduos tolerantes expressavam uma maior quantidade de moléculas inibidoras PD-1L em relação às moléculas coestimuladoras CD86 quando comparadas com aqueles do grupo de indivíduos com uso habitual de imunossupressores. Os pesquisadores observaram uma significativa correlação direta entre pDC1 e células Treg apenas no grupo de indivíduos tolerantes operacionais (Tokita *et al.*, 2008). Esses resultados sugerem que pDCs e células Treg podem participar no processo de tolerância nos indivíduos tolerantes operacionais. Uma hipótese é que as células pDCs participem da geração de células Treg na periferia, contribuindo para a manutenção do aloenxerto.

Além desses estudos, também foi relatado o estudo do repertório de linfócitos T, através da análise da região CDR3 do receptor de célula T por *immunoscope*, em indivíduos com tolerância operacional (Brouard *et al.*, 2005). A comparação de diferentes grupos clínicos (rejeição crônica, tolerância operacional e indivíduos com baixas doses de imunossupressores) e indivíduos saudáveis mostrou que os indivíduos com tolerância operacional, ou aqueles que usam baixas doses de imunossupressores, apresentaram um repertório com perfil de oligoclonalidade para diversas famílias V β (beta). Esses dados sugerem a ocorrência de deleção clonal, exaustão de células T alorreativas, ou ainda a expansão de células Treg neste grupo de indivíduos (Brouard *et al.*, 2005).

Ainda no contexto de tolerância operacional em indivíduos transplantados renais, o mesmo grupo de pesquisadores em 2007, identificou, por *microarray*, 49 genes associados ao estado de tolerância operacional no sangue periférico, quando comparados com indivíduos com rejeição crônica e indivíduos sadios (Brouard *et al.*, 2007). A partir desses resultados, os pesquisadores sugerem um painel de expressão gênica com potencial para identificar indivíduos transplantados renais que possam desenvolver tolerância, assim como identificar indivíduos em tolerância operacional que podem evoluir com rejeição e, conseqüentemente, levando a perda do enxerto. Desses 49 genes identificados, 27 deles são regulados pelo TGF- β , sugerindo que esta citocina desempenhe um papel importante na indução e/ ou manutenção do estado de tolerância operacional. No entanto, não observaram diferença nos níveis séricos de TGF- β entre os

indivíduos transplantados renais com tolerância operacional e os indivíduos com rejeição crônica (Brouard *et al.*, 2007).

A análise de padrões de expressão gênica específicos para o estado de tolerância operacional, por *microarray* em células do sangue periférico, também foi estudado entre indivíduos transplantados hepáticos tolerantes operacionais e aqueles não tolerantes que necessitavam de tratamento com drogas imunossupressoras. Neste estudo, os autores identificaram e validaram um pequeno número de genes capazes de discriminar os indivíduos transplantados em tolerantes operacionais ou não tolerantes. Os autores observaram que assinatura específica para tolerantes hepáticos é caracterizada principalmente pela maior expressão de genes codificando uma variedade receptores de superfície expressos por células NK, CD8⁺ e células T $\gamma\delta$ (Martinez-Llordella *et al.*, 2008).

Considerando a relevância da ativação das vias de sinalização que participam da diferenciação das células T em diferentes subtipos funcionais de células T CD4⁺ efectoras, nosso grupo analisou a fosforilação das vias IL-6/STAT3 e IL-4/STAT6 nas populações de células mononucleares do sangue periférico dos indivíduos transplantados renais em estado de tolerância operacional comparados com outros grupos clínicos de transplantados renais e indivíduos saudáveis. Nossos resultados mostram que os tolerantes operacionais apresentam uma redução na ativação da via IL-4/STAT6 na região de monócitos em relação aos demais grupos estudados, sugerindo que a alteração da via de sinalização STAT6 pode ser importante no estado de tolerância operacional (Moraes-Vieira *et al.*, 2010).

Sabendo que os receptores do tipo *Toll* (TLR, do inglês, *Toll like receptors*) são moléculas intimamente relacionadas com a resposta imune inata (Palm e Medzhitov, 2009), Braudeau e colaboradores (2008) propuseram-se avaliar a diferença de transcritos de DNA para o gene TLR4 entre indivíduos tolerantes operacionais, indivíduos com diagnóstico de rejeição crônica e indivíduos saudáveis. Neste estudo eles observaram que os indivíduos com rejeição crônica apresentaram uma maior quantidade de mRNA para TLR4 em relação aos demais grupos da pesquisa, enquanto que indivíduos tolerantes operacionais e indivíduos saudáveis não apresentaram diferenças significativas. Esses resultados corroboram os dados da literatura, nos quais se sugere a participação do TLR4 no processo de rejeição crônica (Braudeau *et al.*, 2008).

Recentemente, foi realizado um estudo histológico de biópsias entre indivíduos tolerantes operacionais hepáticos, indivíduos transplantados hepáticos com uso habitual de imunossupressores e indivíduos saudáveis. Neste estudo não foi observada qualquer característica histológica de rejeição aguda ou crônica no grupo de tolerantes operacionais (Yoshitomi *et al.*, 2009). No entanto, os indivíduos tolerantes operacionais apresentaram uma frequência maior de células T CD4+Foxp3+ *in situ*, assim como um elevado grau de fibrose em relação ao grupo de transplantados com uso de imunossupressores. Não foi observada correlação entre o grau de fibrose e os seguintes parâmetros: número de células T CD4+Foxp3+, idade do receptor no momento do transplante hepático e intervalo entre o transplante de fígado e a biópsia, conjuntamente com a idade do doador.

Interessantemente, a reintrodução do tratamento com imunossupressor nos indivíduos tolerantes operacionais resultou na melhora do grau de fibrose na maioria dos indivíduos tolerantes, sugerindo que a fibrose no grupo com tolerância operacional possa ser decorrente de um processo imunológico dependente de antígeno ou, ainda, mediado por TGF- β , uma vez que essa citocina está associada com reparo tecidual (fibrose) e é produzida por células Treg (Yoshitomi *et al.*, 2009).

Apesar de existirem várias informações a respeito do estado imunológico de “tolerância operacional” em indivíduos com longo tempo de transplante de órgãos sólidos, indicando que esses indivíduos possuem um repertório imunorregulador distinto, o número de indivíduos analisados ainda é limitado. Além disso, há resultados controversos entre os diversos trabalhos, nos levando a questionar sobre que parâmetros são confiáveis em relação à estabilidade do enxerto (Steinman *et al.*, 1994; revisado por Mathew *et al.*, 2003; Fehr e Sykes, 2004). Atualmente, há algumas propostas para se estabelecer parâmetros imunológicos que possam ser úteis para a retirada de imunossupressão de indivíduos transplantados. Essas propostas envolvem a análise conjunta de parâmetros como: ensaio de ELISPOT em indivíduos transplantados para quantificar a frequência de células T ativadas e de memória frente a antígenos do doador pela produção de determinadas citocinas, análise dos subtipos de células dendríticas (pDC2 e pDC1) circulantes nos indivíduos transplantados, caracterização do fenótipo de células T reguladoras, titulação de aloanticorpo, entre outros (revisado por Thomson *et al.*, 2001; revisado por Newell e Larsen, 2006).

Ressaltamos também que no contexto do renal, a análise de moléculas presentes na urina pode também trazer informações relevantes sobre o estado de tolerância operacional, e isto ainda não foi explorado na comunidade científica.

Avaliação da função renal do aloenxerto

Na avaliação da função renal do aloenxerto, a dosagem de creatinina sérica é um parâmetro importante, porém não específico. Assim, o padrão ouro para o diagnóstico de rejeição de aloenxertos e perda da função renal continua sendo a biópsia renal. Entretanto, este é um método invasivo que pode resultar em algumas complicações, tais como: hematúria, anúria, hematoma perirenal, sangramento e choque, fístulas arteriovenosas e, às vezes, até perda do enxerto (Beckingham *et al.*, 1994; Benfield *et al.*, 1999). Por esses motivos, é importante a pesquisa de novas abordagens não invasivas tanto para o diagnóstico de rejeição como para o monitoramento da evolução do aloenxerto.

Muitos grupos de pesquisa têm avaliado, através de metodologias como: citometria de fluxo, RT-PCR e análise proteômica, a urina de indivíduos transplantados renais como uma medida de inflamação dos compartimentos dentro do enxerto renal, com o objetivo de obter informações e identificar potenciais biomarcadores importantes na discriminação de indivíduos transplantados renais estáveis dos indivíduos com episódios de rejeição aguda. Em vários estudos, nos quais foram analisadas células urinárias por RT-PCR, foi observada uma maior

quantidade de mRNA para granzima B, perforina (Li *et al.*, 2001), granulinsina (Kotsch *et al.*, 2004) e CD103 (integrina alpha E) (Ding *et al.*, 2003) em indivíduos transplantados renais com rejeição aguda em relação aos indivíduos transplantados renais estáveis. É discutido que a expressão diferenciada dessas moléculas poderia ser utilizada como biomarcadores na identificação de episódios de rejeição aguda em indivíduos transplantados renais. No entanto, esses marcadores não são específicos para a rejeição, uma vez que também podem estar presentes em outras situações, como na infecção do trato urinário.

Recentemente, em outro estudo no qual foram analisadas células urinárias por RT-PCR, foram observados níveis mais elevados de mRNA para Foxp3 nas células urinárias de indivíduos com rejeição aguda, mas que evoluíram bem, em relação aos indivíduos com rejeição aguda que posteriormente desenvolveram outros episódios de rejeição (Muthukumar *et al.*, 2005). Estes resultados nos mostram que a quantificação de mRNA para Foxp3 em células encontradas na urina de indivíduos transplantados renais poderia ser um parâmetro de reversibilidade da rejeição aguda e, desta forma, um possível biomarcador.

Embora esses estudos sejam promissores para a identificação de possíveis biomarcadores de rejeição aguda, ainda são necessários estudos mais direcionados na determinação do valor preditivo desses biomarcadores urinários nos diferentes estados imunológicos do transplante. Além disso, é importante ressaltar que não há relatos de estudos semelhantes em indivíduos que desenvolveram um estado de “tolerância operacional”.

Outra abordagem técnica que tem sido explorada na busca de biomarcadores não invasivos associados ao estado de rejeição é a análise proteômica. Essa abordagem tem sido utilizada na caracterização e identificação simultânea de um vasto número de proteínas em diferentes materiais biológicos (células, tecidos e fluídos) (revisado por O’Riordan e Goligorsky, 2005). Esta ferramenta tem se mostrado muito poderosa na comparação de diferentes estados fisiopatológicos de um sistema biológico, como por exemplo, num estado de homeostase *versus* doença, assim como na discriminação de um estado de susceptibilidade *versus* resistência. Uma explicação mais detalhada sobre a análise proteômica encontra-se em “Material e Métodos”.

Análise proteômica e função renal

A análise proteômica da urina tem sido objeto de estudo para a caracterização e identificação de proteínas relevantes tanto no diagnóstico como no prognóstico, seja no transplante renal ou em outras doenças renais como, nefropatias, diabetes do tipo I, câncer renal e de bexiga (revisado por O’Riordan e Goligorsky, 2005). Esses estudos têm fornecido importantes informações sobre os mecanismos envolvidos na evolução dessas doenças e também abrem caminhos para a descoberta de novos marcadores tanto de diagnóstico como de prognóstico de doenças renais.

No contexto da fisiologia renal, estudos proteômicos, nos quais foi utilizado extrato de tecido renal para a análise em géis bidimensionais (2-D),

mostraram que o rim humano normal é constituído de mais de 2000 proteínas, das quais foram identificadas 43 (Sarto *et al.*, 1997). Posteriormente, outros grupos também mostraram através de técnicas proteômicas, que há uma expressão distinta de proteínas entre o cortex renal e a medula renal (Witzmann *et al.*, 1998; Arthur *et al.*, 2002). No entanto, são necessários estudos funcionais dessas diferentes proteínas.

Em relação à análise proteômica da urina, Adachi e colaboradores identificaram por LTQ-FT (do inglês, *linear ion trap-Fourier transform*) e LTQ-Orbitrap (do inglês, *a linear ion trap-orbitrap*) que a urina de indivíduos saudáveis é composta de 1543 proteínas, das quais aproximadamente a metade são proteínas de membrana. Em relação à massa molecular, foi observado que a maioria das proteínas tinham entre 10–60 kDa (Adachi *et al.*, 2006). Quanto à análise dos peptídeos na urina de indivíduos sadios por CE-MS (do inglês, *Capillary electrophoresis coupled mass spectrometry*) entre todos os peptídeos identificados, os autores consideraram como um “padrão normal de peptídeos na urina”, 247 peptídeos que estavam presentes na urina em mais que 50% dos indivíduos saudáveis analisados (Wittke *et al.*, 2003). No entanto, utilizando-se outra abordagem proteômica com separação por *beads* e espectrometria de massa MALDI-TOF, foram identificados 427 espectros de massa entre 1.000–10.000 m/z na urina (Fiedler *et al.*, 2007). Conjuntamente, esses resultados mostram que tanto a análise das proteínas como dos peptídeos da urina podem trazer informações sobre o estado fisiológico do indivíduo. Outro fator muito importante na análise proteômica ou peptidômica é a escolha da abordagem

metodológica. No estudo de Adachi e colaboradores (2006), foi utilizada uma abordagem proteômica com alta sensibilidade (análise por nano-HPLC-MS), resultando em um maior número de proteínas identificadas na urina.

No contexto do transplante renal, os primeiros estudos proteômicos da urina por espectrometria de massa, mostraram diferenças no padrão de proteínas entre indivíduos transplantados renais com rejeição aguda e indivíduos transplantados renais estáveis que tomaram drogas imunossupressoras (Clarke *et al.*, 2003; O’Riordan *et al.*, 2004; Schaub *et al.*, 2004). O’Riordan e colaboradores (2004), utilizando a espectrometria de massa SELDI (do inglês, *Surface-enhanced laser desorption/ ionization*), identificaram proteínas consideradas importantes para distinguir indivíduos com rejeição aguda de indivíduos transplantados renais estáveis. Esses pesquisadores identificaram a β -defensina (4756.3 Da) como um potencial biomarcador de rejeição, com sensibilidade de 91,3% e especificidade de 83,3% (O’Riordan *et al.*, 2004). Estes resultados diferem dos observados por Clarke e colaboradores que, utilizando a mesma metodologia, identificaram 5 potenciais biomarcadores de rejeição aguda (massa das proteínas: 6.5, 6.6, 6.7, 7.1 e 13.4 kDa) quando analisados pelo programa UMSA (do inglês, *Unified Maximum Separability Analysis*). Entretanto, quando esses pesquisadores analisaram pelo programa CART (do inglês, *Classification and Regression Tree*), identificaram como potenciais biomarcadores de rejeição duas proteínas com massas de 3.4kDa e 10.0kDa, ambas com 83% de sensibilidade e 100% de especificidade (Clarke *et al.*, 2003).

Schaub e colaboradores (2004), utilizando a espectrometria de massa SELDI-TOF-MS (do inglês, *Surface-enhanced laser desorption/ ionization-Time of Flight-Mass spectrometry*), observaram diferenças no padrão de proteínas na urina de indivíduos com rejeição aguda e de indivíduos com função do aloenxerto estável sob o uso de imunossupressores. No entanto, estes autores não observaram diferenças do perfil de proteínas na urina dos indivíduos sadios em relação aos indivíduos transplantados com função estável sob o uso de imunossupressores (Schaub *et al.*, 2004). Eles apontaram como interessantes biomarcadores de rejeição aguda, 3 proteínas com massas que variavam entre 5270-5550, 7050-7360 e 10 530-11000 Da. Entretanto, a β_2 -microglobulina (~5.5kDa), potencial biomarcador de rejeição aguda, mostrou uma sensibilidade de 80,9% e especificidade de 94,7% (Schaub *et al.*, 2004).

Em conjunto, estes resultados mostram que, apesar das diferentes metodologias de análise proteômica, todas apresentaram potencial de aplicação clínica, uma vez que em todos os estudos foi identificado um potencial biomarcador para diagnosticar episódios de rejeição aguda. É importante salientar que, embora diferentes biomarcadores tenham sido identificados por grupos de pesquisa usando a mesma metodologia, isso é esperado, uma vez que foram usados nestes estudos diferentes *chips* de superfícies e diferentes abordagens de bioinformática. No caso do uso dessa metodologia para a aplicação clínica, um padrão de *chips* de superfície e de abordagem bioinformática seria necessário. A análise proteômica pode ser uma interessante ferramenta não apenas para compreendermos melhor a

fisiopatologia da resposta imune ao aloenxerto, mas também para a busca de novos biomarcadores não invasivos capazes de discriminar indivíduos transplantados com rejeição dos indivíduos transplantados com função estável do enxerto. É importante ressaltar que não encontramos estudos publicados com a análise proteômica em indivíduos com “tolerância operacional” após a retirada de drogas imunossupressoras ou em indivíduos transplantados com uso de baixas doses de drogas imunossupressoras.

Recentemente, foi publicado o primeiro trabalho envolvendo análise proteômica em um grupo de indivíduos com rejeição crônica (Quintana *et al.*, 2009). Neste trabalho, os autores identificaram, pela espectrometria de massa, padrões de peptídeos que distinguiam os indivíduos com rejeição crônica mediada por células T daqueles indivíduos com rejeição crônica mediada por anticorpos. (Quintana *et al.*, 2009). Ainda no contexto de transplante renal, foram identificados, por SELDI-TOF-MS, 4 potenciais biomarcadores na urina que distinguiam indivíduos transplantados renais estáveis daqueles indivíduos transplantados com achados histológicos de rejeição, porém sem manifestações clínicas e laboratoriais, definidos como rejeição subclínica (Mao *et al.*, 2008).

Considerando que o perfil molecular da urina pode trazer informações importantes, propusemo-nos a investigar se indivíduos em estado de tolerância operacional apresentam um perfil peptidômico diferencial daqueles com rejeição crônica e de outros grupos clínicos através da análise de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS).

Este estudo poderá fornecer informações importantes sobre

moléculas potencialmente relevantes para a manutenção do estado de “tolerância operacional”. Ademais, poderá contribuir para a definição de novos potenciais biomarcadores relevantes para a avaliação do prognóstico da evolução do aloenxerto e também na conduta terapêutica.

2. Objetivo

Neste projeto, tivemos como objetivo determinar o perfil peptidômico diferencial na urina do estado de tolerância operacional no transplante renal, em relação aos grupos com diferentes evoluções clínicas e a indivíduos saudáveis. Visamos contribuir para a compreensão de possíveis mecanismos envolvidos no estado de tolerância ao aloenxerto renal e propor potenciais biomarcadores para este estado imunológico.

3. Material e Métodos

3.1. Delineamento experimental

3.2. Sujeitos de pesquisa

Neste estudo foi realizada uma análise pontual da expressão diferencial dos peptídeos urinários de 3 grupos de indivíduos transplantados renais classificados de acordo com a evolução clínica e 1 grupo de indivíduos saudáveis. Os participantes do estudo provêm de dois centros integrantes do projeto multicêntrico “Estudo do perfil imunológico regulador em pacientes com longo tempo de transplante de órgãos sólidos, em estado de tolerância operacional: bases para novas estratégias terapêuticas imunomoduladoras na clínica” – Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia, CNPq (573879-2008-7). Dos indivíduos transplantados renais, 2 são provenientes do Hospital São Lucas da PUC do Rio Grande do Sul e o restante do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os indivíduos saudáveis eram provenientes do Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração de São Paulo. As amostras de urina e de soro dos integrantes do estudo foram coletadas, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A), aprovado pela comissão de ética (CAPPesp n0475/08, Anexo A).

Os indivíduos transplantados renais foram divididos em 3 grupos de acordo com a evolução clínica, sendo eles:

Grupo tolerante operacional (TO) (n = 5): indivíduos estáveis com longo tempo de transplante (> 1 ano de transplante), sem uso de drogas imunossupressoras há pelo menos 1 ano,

Grupo rejeição Crônica (RC) (n = 8): indivíduos com longo tempo de transplante (>1 ano de transplante) com diagnóstico por biópsia de rejeição crônica de acordo com os critérios de Banff.

Grupo estável (EST) (n = 5): indivíduos estáveis com longo tempo de transplante (>1 ano de transplante) com doses habituais de imunossupressores.

Grupo de indivíduos saudáveis (n = 6): indivíduos saudáveis.

A seleção e o recrutamento dos indivíduos transplantados renais foram realizados pelo corpo clínico do projeto multicêntrico, baseado principalmente na evolução clínica e no diagnóstico da biópsia renal.

Os critérios de seleção do grupo SA foram: **(i)** indivíduos com a idade semelhante aos demais grupos de estudo, **(ii)** indivíduos que não fizeram uso de qualquer medicamento por pelo menos 1 mês antes da coleta e **(ii)** indivíduos saudáveis no momento da coleta e que não possuem doenças crônicas. Adotamos como critério de exclusão do estudo os indivíduos com qualquer tipo de neoplasia prévia e aqueles com diagnóstico de infecção urinária no momento da coleta de urina.

3.3. Recrutamento e coleta das amostras de urina

A coleta da urina dos sujeitos da pesquisa foi feita com coletor estéril para urocultura, seguindo os critérios utilizados para o exame de urocultura. Todos os sujeitos de pesquisa estavam sem urinar por pelo menos 2 horas.

As amostras foram coletadas em pelo menos 2 coletores estéreis para urocultura. Imediatamente após a coleta foi adicionado 1 comprimido contendo um coquetel de inibidores de proteases (Complete TM, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) em um dos coletores, e a amostra encaminhada ao laboratório de pesquisa. A outra amostra foi encaminhada para o Laboratório de Análises Clínicas do hospital responsável pela coleta da amostra biológica, para a realização do exame de urina do tipo I, análise da proteinúria isolada e creatinina na urina. Além disso, foi coletada amostra de sangue para dosagem de creatinina sérica, também realizada no laboratório de análises clínicas do hospital responsável pela coleta da amostra biológica.

As amostras de urina que não foram coletadas em nossa instituição foram processadas de acordo com o protocolo baixo, congeladas a -80°C e enviadas ao nosso laboratório em gelo seco.

3.4. Processamento e armazenamento das amostras de urina

Imediatamente após a chegada da amostra de urina ao laboratório de pesquisa, a mesma foi centrifugada a 600g por 8 minutos em 4°C , para a separação do sedimento celular. O sobrenadante foi filtrado em filtro 0,22 μm (Millex – GS, Millipore, Bedford, MA, USA) para remoção das impurezas, alíquotado em um volume de 25ml em tubos de 50ml estéreis e armazenado em freezer a -80°C .

O sedimento celular foi ressuspendido em 1 ml de solução salina e centrifugado a 12.000g por 5 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado

e a etapa anterior foi repetida 3 vezes. Após as lavagens, o sobrenadante foi descartado e ao sedimento celular foram adicionados 800µl de solução de trizol (Life Technologies, Grand Island, NY). A amostra foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e armazenada em freezer a -80°C para futuras análises.

3.5. Etapa I - Extração dos peptídeos da urina

A primeira etapa para a análise do perfil peptidômico da urina foi separar as frações protéica e peptídica da urina. Para tanto, foram utilizados 2 protocolos de precipitação por componentes orgânicos para cada amostra de urina, sendo eles: acetona pura (Merck, Darmstadt, Germany), e acetonitrila (HPLC gradient grade, Merck, Darmstadt, Germany) 20% (v/v) em água deionizada. Para tanto, cerca de 15 a 25 ml de urina por amostra foram descongeladas, em gelo, homogeneizadas e divididas com volume igual em 2 tubos estéreis de 50 ml. Em seguida, para cada tubo contendo a urina foi realizado um protocolo de extração de peptídeos diferente.

3.5.1. Protocolo A: Precipitação com acetona 100%

Para reduzir totalmente o volume das amostras, que variou entre 7,5 e 12,5 ml de urina, as mesmas foram congeladas em nitrogênio líquido e, imediatamente, foram colocadas no liofilizador por 24 horas. Posteriormente, as amostras de urina liofilizadas foram ressuspendidas em 2,5 ml de água deionizada e, em seguida, foram adicionados 5 ml de acetona pura (Merck) bem gelada. As soluções foram homogeneizadas, distribuídas em tubos *LoBind* de 1,5ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e incubadas por 12 horas em freezer a -20°C, para a precipitação total das proteínas. As amostras foram, então, centrifugadas em microcentrífuga refrigerada a 4°C por 20 minutos a 12.000 x g. Em seguida, a fração solúvel, de cada amostra, que contém os peptídeos foi transferida para outro tubo *LoBind* de 1,5ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e levada para um concentrador de amostras do tipo *Speedvac* (Savant, Holbrook, NY). Os precipitados, contendo os extrato protéicos da urina, foram armazenados em freezer – 80°C para futuros estudos. Após a redução total do volume das amostras de peptídeos da urina, as mesmas foram ressuspendidas em 5 ml de solução (v/v) de acetonitrila 20% / água deionizada (MiliQ) para, em seguida, realizarmos o protocolo de dessalinização e concentração dos peptídeos usando a coluna Sep-Pak® C₁₈ (Waters Corporation, Milford, MA), como descrito abaixo.

3.5.2. Protocolo B: Precipitação com solução de acetonitrila 20% em água deionizada

Primeiramente, para a redução total do volume das amostras, que variou entre 7,5 e 12,5 ml de urina, as mesmas foram congeladas em nitrogênio líquido e, imediatamente, foram colocadas no liofilizador por 24 horas. As amostras de urina liofilizadas foram ressuspensas em 5 ml de solução de acetonitrila 20% em água deionizada e transferidas para tubos *LoBind* de 1,5 ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) que, em seguida, foram centrifugadas em microcentrífuga refrigerada a 4° C por 20 minutos a 8.000g. Após a etapa de precipitação das proteínas, os precipitados contendo as proteínas da urina foram armazenados em freezer – 80° C para futuros estudos. A fração solúvel, contendo os peptídeos da urina, foi usada para o protocolo de dessalinização e concentração dos peptídeos, usando a coluna a coluna Sep-Pak® C₁₈ (Waters Corporation, Milford, MA), como descrito abaixo.

3.6. Etapa II - Dessalinização e concentração dos peptídeos da urina usando coluna Sep-Pak® C₁₈ (Waters Corporation, Milford, MA)

Após protocolos de extração de peptídeos com solventes orgânicos, as amostras contendo a fração peptídica da urina ressuspensas em solução de acetonitrila 20% em água deionizada foram submetidas à coluna

Sep-Pak® C₁₈ (Waters Corporation, Milford, MA), para a dessalinização e concentração das amostras contendo peptídeos da urina.

Foi usada uma coluna Sep-Pak® C₁₈ (Waters Corporation, Milford, MA) por amostra de cada protocolo de extração de peptídeos. O protocolo utilizado foi de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, antes do uso de cada coluna Sep-Pak® C₁₈ (Waters Corporation, Milford, MA) com a amostra, a mesma passou por uma etapa de equilíbrio utilizando-se 20 ml de solução de acetonitrila 20% em água deionizada. Em seguida, cada amostra contendo peptídeos da urina ressuspensa em 5 ml de solução de acetonitrila 20% em água deionizada foi passada na coluna Sep-Pak® C₁₈ (Waters Corporation, Milford, MA). Os peptídeos e as proteínas restantes presente na amostra ligaram-se na coluna Sep-Pak® C₁₈ (Waters Corporation, Milford, MA) por afinidade. Posteriormente, a coluna Sep-Pak® C₁₈ (Waters Corporation, Milford, MA) foi lavada com 20 ml de solução de acetonitrila 20% em água deionizada. Os peptídeos foram eluídos com 5 ml de solução de acetonitrila 80% em água deionizada. As amostras foram levadas para o concentrador de amostras *Speedvac* (Savant, Holbrook, NY), até secarem completamente. Em seguida, foram pesadas e armazenadas no freezer -20°C até o momento da digestão com tripsina.

3.7. Etapa III - Digestão proteolítica com a enzima tripsina

Após a dessalinização e concentração dos peptídeos da urina, as amostras foram submetidas à digestão proteolítica usando-se a enzima tripsina (Sequencing Grade Modified Trypsin - Promega, Madison, WI, EUA).

O protocolo utilizado foi de acordo com as instruções do fabricante. Para tanto, utilizamos uma relação proteína/ tripsina de 1/ 25. Dessa forma, 100µg de cada amostra, provenientes dos 2 protocolos de precipitação, foram solubilizados em solução de bicarbonato de amônio a 25 mM, pH entre 7 -9, sendo adicionados 4µg de tripsina por amostra. A digestão foi realizada a 37° C por 18 horas e a reação foi parada adicionando-se, em cada amostra, 1 µl de ácido fórmico. Em seguida, juntamos as amostras dos respectivos protocolos de precipitação. O produto da digestão tríptica foi levado para o concentrador de amostras *Speedvac* (Savant, Holbrook, NY) até secar completamente a amostra, que foi armazenada no freezer -20°C até o momento da análise no equipamento LC-MS–IT–ToF (Shimadzu, Kyoto).

3.8. Shotgun Proteomics

Em nosso estudo, utilizamos a abordagem de *Shotgun Proteomics*, um método de identificação de proteínas em amostras complexas, usando-se uma combinação da cromatografia líquida ultra rápida (UFLC) integrada a um espectrômetro de massa. Na análise *Shotgun*, as proteínas e/ou peptídeos presentes na amostra são digeridos por uma enzima proteolítica, geralmente tripsina. Os fragmentos de peptídeos, produtos da digestão, são submetidos à cromatografia líquida que separa as frações peptídicas. Posteriormente, os peptídeos são submetidos à análise por espectrometria de massas, pelo método de ionização por *Electrospray* e geram um espectro acompanhado da lista de valores massa/carga (m/z) destes peptídeos que permite um sequenciamento. Esta lista é submetida a uma comparação com

valores teóricos em diversos bancos de dados, o que permite identificar a proteína em questão.

3.9. Etapa IV - Análise dos peptídeos da urina pela abordagem *Shotgun Proteomics* usando o equipamento LC-MS-IT-ToF (Shimadzu, Kyoto)

Todas as análises de espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica (LBEZ) na UNESP – Rio Claro, sob orientação do Prof. Mario Sergio Palma.

As amostras foram solubilizadas em acetonitrila/H₂O 50% (v/v), centrifugadas a 15.700 x g por 5 minutos em uma centrífuga eppendorf 5415D a 25 °C. As amostras foram então solubilizadas em 110 µl e foram aplicados 105 µl por injeção. Os sobrenadantes foram transferidos para micro tubos apropriados para o equipamento LC-MS-IT-ToF (Shimadzu, Kyoto).

As análises qualitativas dos peptídeos presentes na urina dos grupos de estudo foram realizadas em um equipamento semi-micro LC-MS-IT-ToF (Shimadzu, Kyoto) que consiste de um sistema Prominence de Cromatografia Líquida Ultra Rápida (UFLC) constituído de 2 bombas LC20 AD, um injetor automático SIL 20 AHT, um detector de arranjo de diodo SPD M20A e um forno de coluna CTO 20A (Shimadzu, Kyoto) conectado a um espectrômetro de massas do tipo LC-MS-IT-ToF (Shimadzu, Kyoto).

A separação dos produtos peptídicos oriundos da digestão triptica foi realizada pelo sistema de UFLC, utilizando uma coluna C-18 Shim-Pack XR-ODS (3x100 mm) (Shimadzu, Kyoto), com poros de 120 Å e partículas de 2,2 µm. A temperatura da coluna foi mantida constante a 40°C. O fracionamento dos produtos peptídicos foi realizado sob gradiente de acetonitrila/ água de 5 a 95% (v/v) por 90 minutos, monitorada a 214nm, com fluxo de 0,2 ml/min.

Posteriormente, a obtenção dos espectros de massas foi realizada em um espectrômetro de massas com fonte ESI, do tipo *Ion Trap – Time of fly* (IT–TOF) (Shimadzu, Kyoto). A detecção no espectrômetro de massas foi realizada com varreduras feitas no intervalo de m/z 50 a 2000, com uma resolução de aproximadamente 15.000 o sistema de aquisição de dados foi operado em modo positivo contínuo, por cerca de 2 minutos. Durante todas as análises a temperatura do CDL, da interface e do bloco de aquecimento (*block heater*) foi mantida a 200°C, o tempo de acumulação de *íon* foi de 50 msec, a voltagem na agulha foi 4,5kV e a voltagem no cone foi 3,5V. O fluxo de gás secante (Nitrogênio) e de gás nebulizador (Nitrogênio) foi de 100 l/h e 1,5 l/h, respectivamente.

Para os experimentos de espectrometria de massas seqüenciais MS2 foram realizados utilizando-se os mesmos parâmetros dos experimentos de MS. Foi utilizado Argônio como gás de colisão a uma pressão de 100 kPa. Os íons produzidos através dos experimentos MS/MS foram aprisionados e acumulados durante 50 msec no *íon trap*, utilizando-se uma energia de

colisão de 50% e frequência de 30 kHz. A aquisição dos dados foi realizada utilizando o software Protein Layer versão 3.0 (Shimadzu, Kyoto).

Os dados de MS/MS gerados a partir das análises, baseados nos experimentos de LC/ESI e gerenciados pelo programa *LCMS Solution* (Shimadzu, Kyoto) foram submetidos ao Mascot 2.1 para busca nos banco de dados, utilizando-se a versão gratuita, livre disponível na internet (www.matrixscience.com). A busca foi realizada contra os bancos de dados SwissProt e contaminantes (espécie: *Homo Sapiens*), considerando o tempo de cromatograma entre 10 e 85 minutos, estado do precursor de carga: carga mínima 2+ e carga máxima 3+, massa do precursor mínimo (m/z): 400 e massa do precursor máximo (m/z): 1600; máximo de 50 scans intermediários e mínimo de 1 scan por grupo, estado de carga mínima esperada do íon igual a 1 e máxima igual a 5; com a admissão de até três clivagens perdidas; a tolerância de massa do peptídeo foi 0,5 Da e a tolerância admitida nos ensaios de MS/MS foi de 0,5 Da. Foram consideradas para a identificação de proteínas as 50 primeiras posições, independentemente do scores significativos para os peptídeos definidos pela análise de probabilidade do Mascot (www.matrixscience.com/help/scoring_help.html#PBM).

3.10 Critérios da seleção das proteínas

Em todos os indivíduos de estudo foram identificadas 50 sugestões de proteínas pelo Mascot. Entretanto, consideramos para as análises apenas as proteínas que continha dentro as suas sequências pelo menos uma contendo 10 resíduos de aminoácidos, com o intuito de evitarmos a identificação de proteínas falso positivas.

3.11 Análise funcional das proteínas

A análise funcional das proteínas identificadas a partir dos fragmentos peptídicos da urina foi realizada utilizando-se a ferramenta de bioinformática *Ingenuity Pathway Analysis* (www.ingenuity.com) e com o auxílio da classificação gene ontology. Os nomes e siglas, assim como o número de acesso das proteínas foram obtidas pela ferramenta Uniprot (www.uniprot.org).

3.12 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad prism 4.0 for Windows (GraphPad Software Inc.).

4. Resultados

4.1. Sujeitos de pesquisa

Neste estudo, foram utilizadas amostras de urina de 6 indivíduos saudáveis (SA) e de 18 indivíduos transplantados renais classificados de acordo com suas evoluções clínicas em 3 grupos: Tolerância Operacional (TO) (n = 5), Rejeição Crônica (RC) (n = 8) e Estável (EST) (n = 5). No grupo RC, todos os indivíduos tiveram diagnóstico por biópsia, sendo 2 indivíduos diagnosticados com rejeição crônica mediada por anticorpos (RCA) e 6 indivíduos com rejeição crônica mediada por células (RCC) (Tabela 1).

Os dados demográficos dos indivíduos transplantados renais estão descritos na Tabela 1. Não encontramos diferenças significativas entre os diferentes grupos de transplantados renais em relação ao sexo, idade, doença de base, função retardada do enxerto, tipo de doador, infecções virais, tempo de transplante, episódios de rejeição aguda, vias de sensibilização aos aloantígenos (transfusões sanguíneas, transplante prévio e gestações) e à terapia de imunossupressão inicial.

A doença de base mais frequente entre os indivíduos transplantados renais estudados, foi a glomerulonefrite crônica (7 de 18 indivíduos transplantados renais) embora, outras doenças de bases tenham sido observadas, como nefrosclerose hipertensiva, nefropatia diabética, entre outras (Tabela 1).

Em relação ao tipo de doador (vivo ou falecido), foi observado que 50% dos indivíduos do grupo RC receberam enxertos de doadores falecidos,

enquanto que 80% dos indivíduos dos grupos EST e TO receberam o enxertos de doadores vivos (Tabela 1). O grupo com rejeição crônica mostrou também uma maior frequência (60%) de indivíduos com episódios de rejeição aguda em relação aos demais grupos de indivíduos transplantados (20%) (RC=5/8, EST=1/5, TO=1/5 indivíduos) (Tabela 1).

Em relação à imunossupressão, o tratamento inicial mais frequente entre os grupos RC (50%) e TO (40%) foi a combinação de ciclosporina (CSA), prednisona (Pred) e azatioprina (Aza), enquanto no grupo EST, todos os indivíduos foram tratados inicialmente com prednisona (Pred), tacrolimus (Tacro), micofenolato Mofetil (MMF) (Tabela 1). Além disso, todos os indivíduos do grupo EST receberam terapia de indução com os anticorpos daclizumab (anticorpo humanizado anti-CD25) ou Basiliximab (anticorpo quimérico anti-CD25), enquanto apenas 2 indivíduos do grupo RC e 1 indivíduo do grupo TO foram submetidos à terapia de indução, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 6. História clínica dos diferentes grupos de indivíduos transplantados renais

Grupos de Estudo	Sexo	Média da Idade (min - max)	Doença de Base	Nº de Gestações	Nº de Transfusões	Nº de Transplantes	Tempo de Transplante (anos)	Tipo de Doador	Nº de disparidades HLA	
Rejeição Crônica (n = 08)	RCC 01	F	41 (20 - 64)	Glomerulonefrite Crônica	3	0	1	11	Falecido	NC
	RCC 04	M		Glomerulonefrite Crônica	NA	8	1	4	Falecido	6
	RCC 06	M		Insuficiência Renal Sem Causa Definida	NA	20	1	9	Vivo Aparentado	3
	RCC 24	M		Insuficiência Renal Sem Causa Definida	NA	2	1	6	Falecido	5
	RCC 32	M		Nefropatia de Refluxo	NA	NC	1	11	Falecido	4
	RCC 67	F		Glomerulonefrite Crônica	0	NC	1	11	Vivo Aparentado	0
	RCA 13	F		Glomerulonefrite Crônica	0	1	1	10	Vivo Aparentado	2
	RCA 26	M		Nefroesclerose Hipertensiva	NA	0	1	4	Vivo Não Aparentado	5
Tolerante Operacional (n = 05)	TO 03	M	43 (31 - 54)	Gromerulonefrite Membrano Proliferativo	NA	NC	1	23	Vivo Não Aparentado	3
	TO 08	M		Glomerulonefrite Crônica	NA	2	2	5	Falecido	4
	TO 10	F		Nefropatia Diabética	2	0	1	7	Vivo Aparentado	0
	TO 16	F		Glomerulonefrite Crônica	NC	> 50	1	23	Vivo Aparentado	0
	TO 62	M		Glomerulonefrite Esclerose Segmentar Focal	NA	NC	1	12	Vivo Aparentado	3
Estável (n = 05)	EST 09	M	47 (33 - 58)	Insuficiência Renal Sem Causa Definida	NA	NC	1	4	Falecido	3
	EST 11	M		Nefroesclerose Hipertensiva	NA	NC	1	4	Vivo Aparentado	6
	EST 14	F		Nefropatia Diabética	2	0	1	2	Vivo Aparentado	3
	EST 20	M		Nefroesclerose Hipertensiva	NA	0	1	2	Vivo Aparentado	5
	EST 22	F		Glomerulonefrite Crônica	2	4	1	2	Vivo Aparentado	3

RCC: indivíduos com rejeição crônica mediada por células (n=6); **RCA:** indivíduos com rejeição crônica mediada por anticorpos (n=2); **TO:** indivíduos com Tolerância Operacional (n=5); **EST:** indivíduos com função estável do enxerto e imunossupressão convencional (n=5). **NA:** Não se aplica. **NC:** Não consta. **F/M:** feminino/masculino. Idade está representada com média do grupo, idade mínima e máxima. **HLA:** antígeno leucocitário humano. **Nº de disparidades HLA:** números de alelos HLA diferentes entre o doador e o receptor.

Tabela 1. Continuação:História clínica dos diferentes grupos de indivíduos transplantados renais

Grupos de Estudo	Função Retardada do Enxerto	Terapia de Indução	Rejeição Aguda	Rejeição Crônica	Última Biópsia (anos)	Histologia	Terapia IS Inicial	Terapia IS Atual	Tempo sem IS (anos)	Comorbidades
Rejeição Crônica (n = 08)	RCC 01	NC	NC	Não	Sim	NC	Ciclo, Pred, Aza	Ciclo, Pred, Rapa, MPS, Tacro	NA	Anemia, Hipertensão Arterial, Cisto no Ovário, Mioma, HPV
	RCC 04	Sim	NC	Sim	Sim	3 Nefropatia Crônica do Enxerto Banff II, Fibrose Focal	NC	Pred, MMF, Tacro	NA	NC
	RCC 06	Não	NC	Sim	Sim	2 Nefropatia Crônica do Enxerto Banff I, Fibrose Focal	NC	Ciclo, Pred, MMF	NA	NC
	RCC 24	Não	Sim Daclizumab	Sim	Sim	2 Nefropatia Crônica do Enxerto Banff I, Fibrose Focal, Atrofia Tubular	Pred, Tacro, MMF	Pred, Tacro, MPS	NA	NC
	RCC 32	Sim	Não	Sim	Sim	6 Nefropatia Crônica do Enxerto, Banff 2A e Nefrotoxicidade por Ciclosporina	Ciclo, Pred, Aza	Pred, MPS	NA	HCV, Tuberculose
	RCC 67	Não	Não	NC	Sim	4 Nefropatia Crônica do Enxerto Banff II	Ciclo, Pred, Aza	Ciclo, Pred, MPS	NA	ITU de repetição, Cisto no Ovário, Endometriose, Mioma, Hipertensão Arterial, Dislipidemia, Gota, Hernia de Disco, Herpes Zoster Cutâneo
	RCA 13	Sim	Não	Sim	Sim	2 Nefropatia Crônica com Glomerulopatia do Transplante, C4d +	Ciclo, Pred, Aza	Pred, MMF, Tacro	NA	Condiloma Acuminado, Pneumonia, Herpes Simples, CMV
	RCA 26	Não	Sim Daclizumab	Não	Sim	2 Nefropatia Crônica, Atrofia e Fibrose Focais, Capilarite dos Capilares Peritubulares, C4d +	Ciclo, Pred, MMF	Ciclo, Pred, MMF	NA	Apendicite com Choque Séptico, Herpes Zoster Cutâneo
Tolerante Operacional (n = 05)	TO 03	NC	NC	Não	Não	NA	Pred, Aza	NA	6	Hipertensão Arterial, Obesidade, Linfadenectomia Inguinal
	TO 08	Sim	Sim Basilixmab	Sim	Não	NC	Pred, Tacro, MMF	NA	1,5	HBV, HCV
	TO 10	Não	Não	Não	Não	NC	Ciclo, Pred, Aza	NA	4,1	Múltiplos Abscessos Perianal, Abscesso de Mama, Infarto Agudo Miocárdio
	TO 16	Não	Não	Não	Não	NC	Pred, Aza	NA	8	NC
	TO 62	Não	Não	Não	Não	NC	Ciclo, Pred, Aza	NA	4	Recidiva da Doença de Base
Estável (n = 05)	EST 09	NC	Sim Basilixmab	Não	Não	NC	Pred,Tacro, MMF	Pred, MMF, Tacro	NA	Blastocitose
	EST 11	Sim	Sim Daclizumab	Sim	Não	NC	Pred,Tacro, MMF	Pred, Tacro, MPS	NA	ITU, Micose Superficial
	EST 14	Não	Sim Basilixmab	Não	Não	NC	Pred, Tacro, MMF	Pred, MMF, Tacro	NA	NC
	EST 20	Não	Sim Basilixmab	Não	Não	NC	Pred,Tacro, MMF	Pred, Tacro, MMF	NA	NC
	EST 22	Não	Sim Basilixmab	Não	Não	NC	Pred, Tacro, MMF	Pred, Tacro, MPS	NA	NC

RCC: indivíduos com rejeição crônica mediada por células (n=6); **RCA:** indivíduos com rejeição crônica mediada por anticorpos (n=2); **TO:** indivíduos com Tolerância operacional (n=5); **EST:** indivíduos com função estável do enxerto e imunossupressão convencional (n=5). **NA:** Não se aplica. **NC:** Não consta. **F/M:** feminino/masculino. **HPV:** infecção com vírus do papiloma humano. **HBV:** hepatite B. **HCV:** hepatite C. **CMV:** infecção pelo citomegalovírus. **ITU:** infecção no trato urinário.. **Basiliximab:** anticorpo humanizado anti-CD25. **Daclizumab:** anticorpo quimérico anti-CD25. **Pred:** prednisona. **Tacro:** tacrolimus. **MMF:** micofenolato mofetil. **MPS:** micofenolato sódico. **Rapa:** rapamicina.

4.1.2. Avaliação urinária e da função renal nos grupos de estudo

A função renal nos indivíduos do estudo foi avaliada pelo nível de creatinina sérica no momento da coleta de urina. Além disso, para os indivíduos transplantados, foi avaliada a taxa de filtração glomerular usando a equação de Cockcroft-Gault (Tabela 2). Os grupos TO, EST e SA apresentaram níveis de creatinina sérica semelhantes, como mostrado pelas medianas de 1,1; 1,0 e 0,9 mg/dl, respectivamente (Figura 1). No entanto, no grupo RC, a mediana dos níveis de creatinina sérica foi de 1,7 mg/dl, significativamente maior em comparação àquela do grupo SA ($p<0,01$) (Figura 1).

A análise da filtração glomerular pela equação de Cockcroft–Gault entre os grupos transplantados renais, mostrou uma taxa menor de filtração glomerular no grupo RC quando comparada à do grupo EST ($p<0,05$) (Figura 2). No grupo TO, a taxa de filtração glomerular foi semelhante a do grupo EST (Figura 2).

No momento da coleta da urina, foi realizado o exame de urina tipo I para verificar a presença ou não de proteinúria e para excluir infecção urinária. Nenhum dos indivíduos estudados apresentou alterações significativas para infecção urinária (Tabela 2). Em relação à proteinúria, 5 de 8 indivíduos com RC e 1 de 5 indivíduos TO apresentaram proteinúria (Tabela 2). No grupo RC, a mediana de proteinúria foi de 0,3g/l, maior que às observadas nos grupos EST e SA ($p<0,05$) (Figura 3). Não foi observada

proteinúria nos grupos EST e SA (Tabela 2). Alguns indivíduos realizaram exames de dosagem de proteinúria isolada e de creatinina na urina. Entretanto, devido ao baixo número de indivíduos, não foi realizada análise comparativa desses dados entre os diferentes grupos de estudo.

Figura 2. Dosagem de creatinina sérica dos indivíduos transplantados renais e indivíduos saudáveis, no momento da coleta da amostra de urina. O gráfico mostra o valor da creatinina sérica individual no momento da coleta de urina e a mediana da creatinina sérica por grupo. **RC:** indivíduos com rejeição crônica diagnosticada por biópsia (n=8); **TO:** indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=5); **EST:** indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=5), **SA:** indivíduos saudáveis (n=6). A análise estatística foi feita utilizando o teste não paramétrico Kruskal – Wallis. ** p=0.01

Figura 2. Taxa de filtração glomerular calculada pela equação de Crockroft–Gault dos indivíduos transplantados renais no momento da coleta da amostra de urina. O gráfico mostra a mediana do *clearance* de creatinina calculado pela equação de Crockroft–Gault (ml/min) dos grupos de indivíduos transplantados renais no momento da coleta urina. **RC:** indivíduos com rejeição crônica diagnosticada por biópsia (n=7); **TO:** indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=3); **EST:** indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=5). A análise estatística foi feita utilizando o teste não paramétrico Kruskal – Wallis. * $p < 0,05$.

Figura 3. Níveis de proteinúria entre os grupos de estudo no momento da coleta da amostra de urina. No gráfico mostramos o valor individual de proteinúria pelo exame de urina do tipo I e a mediana da proteinúria por grupo de estudo. **RC:** indivíduos com rejeição crônica diagnosticada por biópsia (n=7); **TO:** indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=5); **EST:** indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=5); **SA:** indivíduos saudáveis. A análise estatística foi feita utilizando o teste não paramétrico Kruskal – Wallis. * $p < 0,05$.

Tabela 2. Caracterização da função renal dos indivíduos estudados no momento da coleta de urina

Grupos de Estudo	Sexo	Idade	Média da Idade (min - max)	Creatinina Sérica (mg/dL)	Creatinina Urina (g/L)	Proteinúria (g/L)	Proteinúria Urina Tipo I (g/L)	Urina Tipo I (físico - químico)	Urina Tipo I (Sedimento)	TFG Cockcroft - Gault (ml/min)	
Rejeição Crônica (n = 08)	RCC 01	F	49	41 (20 - 64)	5,20	NR	NR	NR	NR	NC	
	RCC 04	M	45		1,32	NR	NR	Neg	Normal	46,71	
	RCC 06	M	64		1,02	0,29	0,1	Neg	Normal	50,25	
	RCC 24	M	20		1,51	1,39	0,2	0,3	Traços de Sangue	Raros Cilindros Granulosos	70,44
	RCC 32	M	28		1,84	NR	NR	1,0	Normal	Raros Cilindros Hialinos	59,74
	RCC 67	F	41		2,06	0,61	0,4	1	Densidade < 1.005	Normal	24,67
	RCA 13	F	27		1,83	NR	NR	0,3	Traços de Sangue	Raros Cristais de Urato Amorfo	50,17
	RCA 26	M	55		1,61	0,60	0,6	0,9	Normal	Normal	54,73
Tolerante Operacional (n = 05)	TO 03	M	54	43 (31 - 54)	1,10	0,92	0,1	Neg	Normal	Normal	NC
	TO 08	M	41		1,62	NR	NR	0,3	Presença de Sangue	Eritrócitos = 14/campo	43,2
	TO 10	F	42		0,89	NR	NR	Neg	Presença de Glicose, Traços de Sangue	Eritrócitos = 8/campo	102,69
	TO 16	F	48		0,74	NR	NR	Neg	pH = 6,5, Densidade = 1.010, Traços de Sangue	Eritrócitos = 8/campo	85,05
	TO 62	M	31		2,08	0,88	0,2	Neg	Normal	presença de leucócitos	NC
Estável (n = 05)	EST 09	M	47	47 (33 - 58)	0,76	NR	NR	Neg	Normal	Normal	101,29
	EST 11	M	54		1,51	NR	NR	Neg	Normal	Normal	75,85
	EST 14	F	45		0,91	NR	NR	Neg	Normal	Normal	93,41
	EST 20	M	58		1,01	NR	NR	Neg	Presença de Sangue	Eritrócitos = 10/campo	98,72
	EST 22	F	33		1,04	NR	NR	Neg	Presença de Sangue	Eritrócitos = 10/campo	80,95
Saudável (n = 06)	SA 63	F	53	44 (36 - 55)	0,83	0,32	0,0	Neg	Densidade < 1.005	Normal	NR
	SA 64	F	41		0,82	0,21	0,0	Neg	Densidade < 1.005	Normal	NR
	SA 65	M	41		1,01	0,83	0,1	Neg	Traços de Sangue	Normal	NR
	SA 66	M	55		0,99	2,46	0,1	Neg	Densidade > 1.030	Numerosos Cristais de Urato Amorfo	NR
	SA 73	M	36		0,90	1,67	0,1	Neg	Normal	Normal	NR
	SA 74	F	39		0,74	0,98	0,1	Neg	Normal	Eritrócitos = 5/campo	NR

RCC: indivíduos com rejeição crônica mediada por células (n=6); **RCA:** indivíduos com rejeição crônica mediada por anticorpos (n=2); **TO:** indivíduos com Tolerância Operacional (n=5); **EST:** indivíduos com função estável do enxerto e imunossupressão convencional (n=5); **SA:** indivíduos saudáveis (n=6). **NR:** Não realizado. **Neg:** Negativo. Dados representados como média e desvio padrão. **>:** maior. **<:** menor. Os exames de creatinina sérica, creatinina na urina, proteinúria isolada e urina do tipo I foram realizados no momento da coleta de urina pelos laboratórios de análises clínicas do Hospital aonde os indivíduos são atendidos.

4.2. Análise comparativa do perfil de peptídeos urinários

Após a extração e digestão trípica dos peptídeos da urina, os fragmentos dos peptídeos urinários foram submetidos à separação por cromatografia líquida de fase reversa e analisados por espectrometria de massa através do equipamento LC-MS-IT-ToF (do inglês, *Liquid Chromatography Mass Spectrometry Ion Trap Time of Flight*) (Shimadzu, Kyoto).

Considerando a análise do tempo de retenção dos fragmentos de peptídeos digeridos pelo perfil cromatográfica, observamos que todos os indivíduos, independentemente do grupo de estudo avaliado, apresentaram eluição dos fragmentos de peptídeos com tempo de retenção e intensidade variáveis, com predomínio de eluição dos peptídeos entre o tempo de 20-38 minutos, de peptídeos hidrofílicos, e de 50-80 minutos, de peptídeos hidrofóbicos (Figura 4-7). Dentre os 24 indivíduos estudados, apenas o indivíduo EST 14 não apresentou pico com tempo de retenção entre 52-54 minutos, de peptídeos hidrofóbicos (Figura 6).

Figura 4. Cromatograma dos fragmentos de peptídeos da urina dos indivíduos transplantados renais com rejeição crônica. Foram analisados 200 µg do extrato de peptídeos da urina de cada indivíduo, digeridos com tripsina e submetidos à análise do tipo *Shotgun*, utilizando-se o equipamento LC-MS-IT-ToF. Os fragmentos peptídicos foram separados por cromatografia líquida de fase reversa usando-se uma coluna C18 e foram analisados por espectrometria de massas MS/MS. Cada cromatograma mostra a eluição dos peptídeos derivados da fragmentação triptica detectadas por espectrometria de massa sequenciados (ms/ms) para posterior identificação pelo mascot. RCA: indivíduos com rejeição crônica mediada por anticorpos (n=2); RCC: indivíduos com rejeição crônica mediada por células (n=6).

Continuação da Figura 4. Cromatograma dos fragmentos de peptídeos da urina dos indivíduos transplantados renais com rejeição crônica. Foram analisados 200 µg do extrato de peptídeos da urina de cada indivíduo, digeridos com tripsina e submetidos à análise do tipo *Shotgun*, utilizando-se o equipamento LC-MS-IT-ToF. Os fragmentos peptídicos foram separados por cromatografia líquida de fase reversa usando-se uma coluna C18 e foram analisados por espectrometria de massas MS/MS. Cada cromatograma mostra a eluição dos peptídeos derivados da fragmentação triptica detectadas por espectrometria de massa seqüenciados (ms/ms) para posterior identificação pelo mascot. RCA: indivíduos com rejeição crônica mediada por anticorpos (n=2); RCC: indivíduos com rejeição crônica mediada por células (n=6).

Figura 5. Cromatograma dos fragmentos de peptídeos da urina dos indivíduos transplantados renais tolerantes operacionais. Foram analisados 200 µg do extrato de peptídeos da urina de cada indivíduo, digeridos com tripsina e submetidos à análise do tipo *Shotgun*, utilizando-se o equipamento LC-MS-IT-ToF. Os fragmentos peptídicos foram separados por cromatografia líquida de fase reversa usando-se uma coluna C18 e foram analisados por espectrometria de massas MS/MS. Cada cromatograma mostra a eluição dos peptídeos derivados da fragmentação triptica detectadas por espectrometria de massa seqüenciados (ms/ms) para posterior identificação pelo mascot TO: indivíduos com tolerância operacional (n=5).

Figura 6. Cromatograma dos fragmentos de peptídeos da urina dos indivíduos transplantados renais estáveis com uso habitual de drogas imunossupressoras. Foram analisados 200 μg do extrato de peptídeos da urina de cada indivíduo, digeridos com tripsina e submetidos à análise do tipo *Shotgun*, utilizando-se o equipamento LC-MS-IT-ToF. Os fragmentos peptídicos foram separados por cromatografia líquida de fase reversa usando-se uma coluna C18 e foram analisados por espectrometria de massas MS/MS. Cada cromatograma mostra a eluição dos peptídeos derivados da fragmentação triptica detectadas por espectrometria de massa sequenciados (ms/ms) para posterior identificação pelo mascot. EST: indivíduos com função estável do enxerto e imunossupressão convencional ($n=5$).

Figura 7. Cromatograma dos fragmentos de peptídeos da urina dos indivíduos saudáveis. Foram analisados 200 µg do extrato de peptídeos da urina de cada indivíduo, digeridos com tripsina e submetidos à análise do tipo *Shotgun*, utilizando-se o equipamento LC-MS-IT-ToF. Os fragmentos peptídicos foram separados por cromatografia líquida de fase reversa usando-se uma coluna C18 e foram analisados por espectrometria de massas MS/MS. Cada cromatograma mostra a eluição dos peptídeos derivados da fragmentação triptica detectadas por espectrometria de massa sequenciados (ms/ms) para posterior identificação pelo mascot. SA: indivíduos saudáveis (n=6).

Continuação da Figura 7. Cromatograma dos fragmentos de peptídeos da urina dos indivíduos saudáveis.

Foram analisados 200 µg do extrato de peptídeos da urina de cada indivíduo, digeridos com tripsina e submetidos à análise do tipo *Shotgun*, utilizando-se o equipamento LC-MS-IT-ToF. Os fragmentos peptídicos foram separados por cromatografia líquida de fase reversa usando-se uma coluna C18 e foram analisados por espectrometria de massas MS/MS. Cada cromatograma mostra a eluição dos peptídeos derivados da fragmentação triptica detectadas por espectrometria de massa seqüenciados (ms/ms) para posterior identificação pelo mascot. SA: indivíduos saudáveis (n=6).

4.3 Repertório diferencial dos peptídeos urinários e suas proteínas correspondentes, nos diferentes grupos do estudo

A identificação das proteínas a partir das sequências de peptídeos, derivados da fragmentação tríptica, detectadas em cada indivíduo foi realizada com auxílio do banco de dado swissprot usando-se a ferramenta MASCOT, disponível na internet, gratuitamente (<http://www.matrixscience.com>). Para cada indivíduo estudado, o MASCOT identificou um total de 50 proteínas, independentemente do *score* (cálculo indicativo de probabilidade das proteínas identificadas não serem oriundas de um evento randômico). Visto que uma única proteína identificada apresentou um número diferente de sequências de peptídeos, analisamos também o número total de diferentes sequências de peptídeos por indivíduo e por grupo de estudo (RC, EST, TO e SA) (Tabela 3). Além disso, foi avaliada a média do número de sequências diferentes de peptídeos em cada grupo, separadamente (Figura 8).

Nossos resultados mostraram uma grande variabilidade no número de sequências de peptídeos entre os indivíduos estudados, independentemente do grupo de estudo (RC, EST, TO e SA) (Tabela 3). Porém, a média do número de sequências diferentes de peptídeos em cada grupo de estudo, não apresentou diferença entre os grupos RC (633 ± 130), SA (678 ± 229) e TO (657 ± 169) (Figura 9). No grupo EST, a média do número de sequências diferentes de peptídeos (494 ± 229) foi menor quando comparada às demais dos demais grupos (Figura 8).

Visando diminuir possíveis proteínas falso-positivas (proteínas identificadas a partir de sequências de peptídeos muito pequenas e, portanto, com alta frequência de promiscuidade na sugestão de uma provável proteína), foram consideradas para as posteriores análises, apenas as proteínas que continham pelo menos uma sequência de peptídeos com mais de 10 resíduos de aminoácidos.

Devido à limitação de 50 identificações de proteínas por análise, na versão do MASCOT utilizada, não foi possível verificar se houve diferença no número de proteínas identificadas entre os indivíduos e entre os diferentes grupos. Porém, quando comparamos o número de proteínas com *score* significativo > 56 ($p < 0,05$) (ver Material e métodos) entre os diferentes grupos de estudo, observamos que o número de proteínas identificadas com *score* significativo variou entre os 24 indivíduos transplantados e que somente o indivíduo TO 03 não teve qualquer proteína identificada com *score* > 56 (Tabela 3). O grupo RC apresentou o maior número de proteínas com *score* significativo (40 proteínas), seguido dos grupos SA (37 proteínas), TO (33 proteínas) e EST (28 proteínas) (Tabela 3).

Tabela 3. Total de sequências de peptídeos e de proteínas identificados por indivíduo de estudo, utilizando-se a ferramenta MASCOT.

Grupos de estudo	Indivíduos	Nº de sequências de peptídeos	Nº de sequências diferentes de peptídeos	Nº de proteínas identificadas pelo Mascot	Nº de proteínas com pelo menos 1 sequência contendo 10 resíduos de aminoácidos	Nº total de proteínas com score > 56
Rejeição Crônica (n=8)	RCC01	860	828	50	48	10
	RCC04	732	692	50	47	2
	RCC06	702	623	50	50	8
	RCC24	439	439	50	48	2
	RCC32	741	716	50	46	8
	RCC67	645	630	50	50	5
	RCA13	477	458	50	49	1
	RCA26	719	681	50	48	4
Tolerante Operacional (n=5)	TO03	412	391	50	37	0
	TO08	777	735	50	47	11
	TO10	959	904	50	50	11
	TO16	907	872	50	49	10
	TO62	506	488	50	49	1
Estável (n=5)	EST09	769	681	50	49	10
	EST11	775	757	50	45	14
	EST14	495	469	50	47	2
	EST20	386	369	50	48	1
	EST22	226	196	50	46	1
Saudável (n=6)	SA63	782	769	50	46	11
	SA64	672	646	50	49	5
	SA65	703	637	50	49	7
	SA66	902	897	50	50	10
	SA73	398	398	50	47	1
	SA74	645	592	50	48	3

Nesta tabela mostramos o número de identificações das sequências de peptídeos e das proteínas por indivíduo de estudo, utilizando-se a ferramenta Mascot. Além disso, discriminamos, individualmente, o número de sequências diferentes de peptídeos, o número de proteínas identificadas contendo pelo menos 1 sequência de peptídeos com mais de 10 resíduos de aminoácidos e o total de proteínas identificadas com *score* > 56 ($p < 0,05$). **RCC**: indivíduos com rejeição crônica mediada por células (n=6); **RCA**: indivíduos com rejeição crônica mediada por anticorpos (n=2); **TO**: indivíduos com Tolerância operacional (n=5); **EST**: indivíduos com função estável do enxerto e imunossupressão convencional (n=5); **SA**: indivíduos saudáveis (n=6).

Figura 8. Média do número de sequências diferentes de peptídeos identificadas por grupo de estudo. No gráfico mostramos a média e o desvio padrão do número de sequências diferentes de peptídeos identificadas pelo Mascot entre os diferentes grupos de estudo. RC: indivíduos com rejeição crônica diagnosticada por biópsia (n=8); TO: indivíduos com tolerância operacional (n=5); EST: indivíduos com função estável do enxerto e imunossupressão convencional (n=5); SA: indivíduos saudáveis (n=6). A análise estatística foi feita utilizando o teste não paramétrico Kruskal – Wallis. Não significativo.

O número total de proteínas identificadas, a partir da fragmentação trípica dos peptídeos presentes na urina, entre os 24 indivíduos estudados foi de 1142 proteínas, das quais 646 eram proteínas diferentes (Tabela 4). O número de diferentes proteínas identificadas, por grupo, foram RC= 296, TO= 189, EST= 219 e SA= 205 (Tabela 4).

Tabela 4. Total de proteínas identificadas pelo Mascot por grupo de estudo

Grupos de estudo	Nº de proteínas identificadas	Nº de proteínas diferentes identificadas
RC	386	296
TO	232	189
EST	235	205
SA	289	219
Entre os 24 indivíduos do estudo	1142	646

A tabela mostra o número total de proteínas e o número de proteínas diferentes identificadas por grupo e entre os 24 indivíduos de estudo. Todas as proteínas apresentaram pelo menos 1 sequência de peptídeo com mais de 10 resíduos de aminoácidos. **RCC**: indivíduos com rejeição crônica mediada por células (n=6); **RCA**: indivíduos com rejeição crônica mediada por anticorpos (n=2), **TO**: indivíduos com Tolerância operacional (n=5); **EST**: indivíduos com função estável do enxerto e imunossupressão convencional (n=5); **SA**: indivíduos saudáveis (n=6).

Avaliamos, ainda, a relação das proteínas identificadas com o sexo dos indivíduos. Não verificamos qualquer proteína presente em todos os 14 indivíduos do sexo masculino ou presente em todos os 10 indivíduos do sexo feminino dos 24 indivíduos estudados. Entretanto, quando analisamos o número de proteínas identificadas apenas por indivíduos do mesmo sexo, em pelo menos 2 indivíduos, observamos que das 646 proteínas identificadas entre todos os indivíduos estudados, 44 estavam presentes somente entre os indivíduos do sexo masculino e 17 proteínas estavam presentes entre os indivíduos do sexo feminino, independente do grupo de estudo. Das 44 proteínas encontradas nos indivíduos do sexo masculino, 4 proteínas foram identificadas em 4 dos 14 indivíduos, 8 proteínas foram identificadas em 3 dos 14 indivíduos e 32 proteínas estavam presentes em 2 dos 14 indivíduos do sexo masculino. Entre as 17 proteínas encontradas nos indivíduos do sexo feminino, apenas 1 proteína foi identificada em 3 dos 10

indivíduos do sexo feminino. As demais proteínas foram identificadas em 2 dos 10 indivíduos do sexo feminino.

Finalmente, verificamos as proteínas que foram identificadas exclusivamente nos grupos TO, RC, EST ou SA ou que foram compartilhadas por 2 ou mais grupos. Das 646 proteínas identificadas, independentemente do *score* gerado pelo Mascot, observamos proteínas exclusivas nos grupos TO (87 proteínas), RC (168 proteínas), EST (106 proteínas) e SA (108 proteínas), essas proteínas estão detalhadas no Anexo B. Observamos também 26 proteínas que foram compartilhadas nos 4 grupos de estudo e apenas 5 proteínas que foram comuns entre os grupos de indivíduos transplantados renais (Tabela 5). O grupo TO e o grupo EST apresentaram mais proteínas em comum com o grupo RC (66 proteínas) que entre si e com o grupo SA. Por outro lado, o grupo RC apresentou mais proteínas compartilhadas com o grupo SA (74 proteínas) que com os demais grupos de estudo.

Tabela 5. Distribuição do número de proteínas identificadas nos diferentes grupos de estudo

Distribuição das proteínas	nº proteínas
Grupo TO	87
Grupo RC	168
Grupo EST	106
Grupo SA	108
Todos os grupos de estudo	26
Todos os grupos de transplantados	5
Grupos TO, RC e SA	11
Grupos TO, EST e SA	8
Grupos TO e EST	12
Grupos TO e RC	24
Grupos TO e SA	16
Grupos RC, EST e SA	10
Grupos RC e EST	25
Grupos RC e SA	27
Grupos EST e SA	13
Total de proteínas	646

RC: indivíduos com rejeição crônica diagnosticado por biópsia (n=8); **TO:** indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=5); **EST:** indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=5); **SA:** indivíduos saudáveis (n=6).

4.4. Frequência das proteínas identificadas a partir da fragmentação trípica dos peptídeos presentes na urina entre os grupos de estudo.

Primeiramente, a análise da frequência das 646 proteínas entre todos os indivíduos estudados, mostrou que nenhuma proteína foi identificada por todos os indivíduos. Além disso, 439 das 646 proteínas (67,9%) foram identificadas em apenas 1 indivíduo, 181 das 646 proteínas (28%) foram

identificadas entre 3 a 5 indivíduos, 19 das 646 proteínas (3%) foram identificadas entre 6 a 11 indivíduos e apenas 5 das 646 das proteínas (0,9%) foram identificadas em pelo menos 50% de todos os indivíduos do estudo (Figura 9).

As proteínas frequentes na maioria dos indivíduos analisados foram: **(i)** a *Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein*, **(ii)** a *Bcl-2-associated transcription factor 1*, **(iii)** a *Serine/arginine repetitive matrix protein 1*, **(iv)** a *DNA topoisomerase 1* e **(v)** a *Zinc finger CCCH domain-containing protein 13* (Tabela 6).

Total de Proteínas Identificadas na Urina

Figura 9. Relação entre a frequência de proteínas diferentes identificadas e dos indivíduos em que foram detectadas. Este gráfico mostra a porcentagem de proteínas identificadas nos 24 indivíduos, independentemente do grupo de estudo. No total de 646 proteínas foram identificadas através de fragmentos de peptídeos urinários digeridos com tripsina utilizando-se o LC-MS-IT-ToF.

Tabela 6. Proteínas identificadas com maior frequência entre os indivíduos transplantados renais e saudáveis

Acesso	Nome de entrada	Nome da proteína	Componente celular	Função	Tecido específico
Q8IZT6	ASPM_HUMAN	Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein (Abnormal spindle protein homolog)	Citoplasma e Núcleo	Ligante da calmodulina, Mitose	NC
Q9NYF8	BCLF1_HUMAN	Bcl-2-associated transcription factor 1	Citoplasma e Núcleo	Ligante de DNA, Indução de apoptose, Atividade repressora da transcrição	NC
Q8IYB3	SRRM1_HUMAN	Serine/arginine repetitive matrix protein 1 (Ser/Arg-related nuclear matrix protein)	Núcleo	Ligante de DNA, RNA e proteína, RNA splicing, processamento de mRNA	NC
P11387	TOP1_HUMAN	DNA topoisomerase 1 (DNA topoisomerase I)	Núcleo	Ligante de ATP e de proteína, Fosforilação, Morte programada da célula, Resposta a drogas	NC
Q5T200	ZC3HD_HUMAN	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	NC	Ligante de ácidos nucleicos e de íon zinco	NC

Nesta tabela descrevemos as 5 proteínas identificadas em pelo menos 50% dos indivíduos de todos os grupos de estudo. As proteínas foram classificadas pelo *Gene Ontology* para componente celular e processo biológico **NC**: Não consta.

4.4.1. Relação entre a frequência das Proteínas Identificadas e frequência dos indivíduos nos Diferentes Grupos de Estudo

Em todos os grupos de estudo, a frequência de indivíduos do mesmo grupo que compartilhavam as mesmas proteínas foi baixa. Menos que 10% das proteínas identificadas em cada grupo de estudo foram identificadas em pelo menos 50% dos indivíduos do grupo. Seguem abaixo as tabelas, por grupo de estudo, com as proteínas identificadas na maioria dos indivíduos de cada grupo.

As frequências de proteínas identificadas em pelo menos 50% dos indivíduos em cada grupo foram: RC 9 das 296 proteínas (3%) (Tabela 7), TO 11 das 189 das proteínas (4,7%) (Tabela 8), EST 3 de 205 proteínas (1,5%) (Tabela 9) e SA 18 das 219 proteínas (8,2%) (Tabela 10). Além disso, foi observado que o grupo SA foi o único que apresentou uma proteína (*Serine/arginine repetitive matrix protein 1*) identificada em todos os indivíduos saudáveis (Tabela 10). Essa proteína foi, também, a mais frequente entre os indivíduos dos grupos RC (7/8 indivíduos com rejeição crônica) (Tabela 7), TO (4/5 indivíduos tolerantes (Tabela 8) e EST (3/6 indivíduos estáveis) (Tabela 9). O grupo SA apresentou um maior número de proteínas compartilhadas entre os indivíduos do seu grupo. Em relação aos 3 grupos de transplantados renais, os grupos RC e TO apresentaram um número parecido de proteínas frequentes em pelo menos 50% dos indivíduos do grupo, enquanto o grupo EST apresentou o menor número de proteínas frequentes nos indivíduos do grupo.

Mesmo não sendo das proteínas mais frequentes entre o grupo RC, a proteína vimentina foi identificada em 2 indivíduos do grupo RC, sendo 1 indivíduo (RCC1) com diagnóstico de rejeição crônica mediada por células que perdeu o enxerto e o outro com rejeição crônica mediada por anticorpos (RCA 13) (Anexo B).

Tabela 7. Proteínas identificadas na dos maioria indivíduos do grupo RC

Acesso	Nome de Entrada	Nome da Proteína	Localização Celular	Processo Biológico	Indivíduos do grupo RC							
					RCA13	RCA26	RCC01	RCC04	RCC06	RCC24	RCC32	RCC67
Q6UB99	ANR11_HUMAN	Ankyrin repeat domain-containing protein 11	Núcleo	NC								
Q8IYB3	SRRM1_HUMAN	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	Núcleo	Ligante de DNA, RNA e proteína, RNA splicing, processamento de mRNA								
P11387	TOP1_HUMAN	DNA topoisomerase 1 (DNA topoisomerase I)	Núcleo	Ligante de ATP e de proteína, fosforilação, morte programada da célula, resposta à drogas								
Q8IZT6	ASPM_HUMAN	Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein (Abnormal spindle protein homolog)	Citoplasma e Núcleo	Mitose								
Q9NYF8	BCLF1_HUMAN	Bcl-2-associated transcription factor 1	Citoplasma e Núcleo	Apoptose, regulação da transcrição								
Q14152	EIF3A_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A (eIF3a)	Citoplasma	Síntese de proteínas								
A6NNA2	SRRM3_HUMAN	Serine/arginine repetitive matrix protein 3	NC	NC								
Q9H0G5	CCD55_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 55	NC	NC								
Q5T200	ZC3HD_HUMAN	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	NC	NC								

Descrição das 9 proteínas identificadas em pelo menos 50% dos indivíduos do grupo de indivíduos transplantados renais com rejeição crônica. O total de proteínas diferentes identificadas nesse grupo de estudo foi de 296 proteínas. As proteínas foram classificadas pelo *Gene Ontology* para componente celular e processo biológico **NC**: Não consta.

Tabela 8. Proteínas identificadas na maioria dos indivíduos do grupo TO

Nome de Entrada	Nome da Proteína	Localização Celular	Processo Biológico	Indivíduos do grupo TO				
				TO03	TO08	TO10	TO16	TO62
PRP4B_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog	Núcleo	Regulação da transcrição					
SRRM1_HUMAN	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	Núcleo	Ligante de DNA, RNA e proteína, transcrição					
SRRM4_HUMAN	Serine/arginine repetitive matrix protein 4	Núcleo	Diferenciação celular, transcrição, desenvolvimento do sistema nervoso					
TOP1_HUMAN	DNA topoisomerase 1 (DNA topoisomerase I)	Núcleo	Ligante de ATP e de proteína, fosforilação, morte programada da célula, resposta à drogas					
TR150_HUMAN	Thyroid hormone receptor-associated protein 3	Núcleo	Regulação da transcrição, ligante do receptor do hormônio da tireóide, ligante do receptor da vitamina D					
ASPM_HUMAN	Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein (Abnormal spindle protein homolog)	Citoplasma e Núcleo	Mitose, ligante da calmodulina					
BCLF1_HUMAN	Bcl-2-associated transcription factor 1	Citoplasma e Núcleo	Apoptose, regulação da transcrição					
EIF3A_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A (eIF3a)	Citoplasma	Síntese de proteínas					
GOGA4_HUMAN	Golgin subfamily A member 4 (Trans-Golgi p230)	Citoplasma	Transporte mediado por vesículas					
NKTR_HUMAN	NK-tumor recognition protein (NK-TR protein) (Natural-killer cells cyclophilin-related protein)	Membrana	Ligante de ciclosporina A, proteína de enovelamento					
ZC3HD_HUMAN	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	NC	Ligante de zinco e ácidos nucleicos					

Descrição das 11 proteínas identificadas em pelo menos 50% dos indivíduos do grupo saudável e os indivíduos que apresentaram as proteínas. O total de proteínas diferentes identificadas nesse grupo de estudo foi de 189 proteínas. As proteínas foram classificadas pelo *Gene Ontology* para componente celular e processo biológico **NC**: Não consta.

Tabela 9. Proteínas identificadas na maioria dos indivíduos do grupo EST

Acesso	Nome de Entrada	Nome da Proteína	Localização Celular	Processo Biológico	Indivíduos do grupo EST				
					EST09	EST11	EST14	EST20	EST22
Q8IZT6	ASPM_HUMAN	Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein (Abnormal spindle protein homolog)	Citoplasma e Núcleo	Mitose					
Q9NYF8	BCLF1_HUMAN	Bcl-2-associated transcription factor 1	Citoplasma e Núcleo	Apoptose, regulação da transcrição					
Q5T200	ZC3HD_HUMAN	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	NC	NC					

Descrição das 03 proteínas identificadas em pelo menos 50% dos indivíduos do grupo saudável e os indivíduos que apresentaram as proteínas. O total de proteínas diferentes identificadas nesse grupo de estudo foi de 205 proteínas. As proteínas foram classificadas pelo *Gene Ontology* para componente celular e processo biológico **NC**: Não consta.

Tabela 10. Proteínas identificadas na maioria dos indivíduos do grupo SA.

Nome de Entrada	Nome da Proteína	Localização Celular	Processo Biológico	Indivíduos do grupo SA					
				SA63	SA64	SA65	SA66	SA73	SA74
ANR11_HUMAN	Ankyrin repeat domain-containing protein 11	Núcleo	NC						
PPIG_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G (Cyclophilin G)	Núcleo	Dobramento de proteínas, transcrição, ligante de ciclosporina A						
PRP4B_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog	Núcleo	Regulação da transcrição						
SLTM_HUMAN	SAFB-like transcription modulator (Modulator of estrogen-induced transcription)	Núcleo	Apoptose, regulação da transcrição						
SRRM1_HUMAN	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	Núcleo	Ligante de DNA, RNA e proteína, transcrição						
SRRM2_HUMAN	Serine/arginine repetitive matrix protein 2 (Serine/arginine-rich splicing factor-related nuclear matrix protein of 300 kDa)	Núcleo	Regulação da transcrição						
TOP1_HUMAN	DNA topoisomerase 1 (DNA topoisomerase I)	Núcleo	Ligante de ATP e de proteína, fosforilação, morte programada da célula, resposta à drogas						
TR150_HUMAN	Thyroid hormone receptor-associated protein 3 (Thyroid hormone receptor-associated protein complex 150 kDa component)	Núcleo	Regulação da transcrição, ligante do receptor do hormônio da tireóide, ligante do receptor da vitamina D						
UBF1_HUMAN	Nucleolar transcription factor 1 (Autoantígeno NOR-90)	Núcleo	Regulação da transcrição						
ASPM_HUMAN	Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein (Abnormal spindle protein homolog)	Citoplasma e Núcleo	Mitose, ligante da calmodulina						
CE290_HUMAN	Centrosomal protein of 290 kDa (Nephrocystin-6) (Cancer/testis antigen 87)	Citoplasma e Núcleo	Organização da projeção celular, transporte de proteínas, desenvolvimento dos pró néfrons						
H1FOO_HUMAN	Histone H1oo (Oocyte-specific histone H1) (osH1)	Citoplasma e Núcleo	Meiose, formação do nucleossoma						
SSX1_HUMAN	Protein SSX1 (Cancer/testis antigen 5.1)	NC	Regulação da transcrição, ligante de cálcio						
TRHY_HUMAN	Trichohyalin	NC	Queratinização						
CCD55_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 55	NC	NC						
CCD71_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 71	NC	NC						
RSRC2_HUMAN	Arginine/serine-rich coiled-coil protein 2	NC	NC						
SRRM3_HUMAN	Serine/arginine repetitive matrix protein 3	NC	NC						

Descrição das 18 proteínas identificadas em pelo menos 50% dos indivíduos do grupo saudável. O total de proteínas diferentes identificadas nesse grupo de estudo foi de 219 proteínas. As proteínas foram classificadas pelo *Gene Ontology* para componente celular e processo biológico **NC**: Não consta.

4.5. Localização celular das proteínas identificadas entre os diferentes grupos de estudo

As proteínas foram classificadas, com auxílio do programa IPA (do inglês, *Ingenuity Pathways Analysis*), quanto a sua localização na célula. Foram classificadas para análise pelo programa 185 de 296 proteínas do grupo RC, 125 de 189 do grupo TO, 119 de 205 do grupo EST e 139 de 219 do grupo SA (Figura 10). A análise global das proteínas identificadas revelou que tanto os grupos de transplantados renais quanto o grupo de indivíduos saudáveis apresentaram uma maior prevalência de peptídeos oriundos de proteínas nucleares, seguidas de proteínas citoplasmáticas, proteínas de membrana plasmática e, por fim, proteínas secretadas (Figura 10). Dessa forma, não conseguimos diferenciar os diferentes grupos de estudo pela localização celular das proteínas.

Figura 10. Localização celular das proteínas identificadas entre os grupos de transplantados renais e o grupo de indivíduos saudáveis. Este gráfico mostra o número de proteínas identificadas por cada grupo de estudo em relação a localização celular. A análise foi realizada pelo programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA). RC: Grupo RC. TO: Grupo TO; EST: Grupo EST. SA: Grupo SA. MP: membrana plasmática.

A análise comparativa das funções celulares e moleculares das proteínas identificadas nos diferentes grupos de estudo, mostrou que os 4 grupos de estudo apresentaram proteínas relacionadas com a maioria das funções, no entanto, o grupo EST mostrou proteínas com um menor número de funções biológicas (20 categorias funcionais) em relação aos demais grupos de estudo (RC=27, TO=31 e SA=29 categorias funcionais) (Figura 11). De forma semelhante à classificação funcional do perfil global das proteínas, o maior número de proteínas identificadas nos grupos de estudo estão envolvidas com o processo de transcrição celular, síntese de proteínas e organização celular (Figura 11). O grupo SA apresentou um maior número de proteínas relacionadas com processos metabólicos quando comparado com os 3 grupos de transplantados renais. Além disso, pelo IPA, apenas o grupo RC, TO e SA tiveram proteínas relacionadas à resposta imune (Figura 11). Contudo, podemos concluir que dos 4 grupos de estudo, o grupo EST apresentou um repertório de peptídeos com menor número de funções celulares e que o grupo de indivíduos saudáveis apresentou um maior número de peptídeos na urina oriundas de proteínas envolvidas com processos metabólicos quando comparados com os grupos de transplantados renais, independentemente da evolução clínica.

Figura 11. Caracterização funcional das proteínas identificadas nos diferentes grupos de estudo. Este gráfico mostra o número de proteínas identificadas por cada grupo de estudo em relação à função molecular e celular. A análise foi realizada pelo programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA). Rejeição crônica (RC); Tolerância operacional (TO); Estável (EST); Saudável (SA).

Continuação da Figura 11. Caracterização funcional das proteínas identificadas nos diferentes grupos de estudo. Este gráfico mostra o número de proteínas identificadas por cada grupo de estudo em relação a função molecular e celular. A análise foi realizada pelo programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA). Rejeição crônica (RC); Tolerância operacional (TO); Estável (EST); Saudável (SA).

4.6. Distribuição das Proteínas Associadas ao Sistema Imune entre os Diferentes Grupos

Foram classificadas 15 proteínas relacionadas com a resposta imune (Tabela 11). A distribuição das proteínas da resposta imune entre os diferentes grupos de estudo, independentemente do número de indivíduos do grupo que tiveram essas proteínas foi: **(i)** grupo RC, 9 das 15 proteínas, das quais 3 proteínas foram identificadas exclusivamente por esse grupo, **(ii)** grupo SA, 7 proteínas, sendo 2 delas exclusivas deste grupo, **(iii)** o grupo TO, 6 proteínas, sendo todas exclusivas desse grupo clínico, **(iv)** o grupo EST apresentou o menor número de proteínas envolvidas com a resposta imune, 3 das 15 proteínas, das quais todas foram exclusivas deste grupo de estudo (Tabela 11).

Tabela 11. Proteínas relacionadas a resposta imune identificadas entre os 24 indivíduos do estudo

Proteína	Nome da Proteína	Localização Celular	Processo Biológico	Grupos de estudo			
				RC	TO	EST	SA
ACINU_HUMAN	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus	Núcleo	Apoptose, diferenciação de eritrócitos, regulação positiva na diferenciação de monócitos	2			1
MLL1_HUMAN	Histone-lysine N-methyltransferase MLL (Zinc finger protein HRX)	Núcleo	Apoptose, regulação da transcrição			1	
SF17A_HUMAN	Splicing factor, arginine/serine-rich 17A (Protein XE7) (B-lymphocyte antigen)	Núcleo	Ativação de células B, regulação da transcrição, transdução de sinais	1	1	1	2
SP100_HUMAN	Nuclear autoantigen Sp-100	Núcleo	Reparo ao DNA, resposta para interferon-gamma, resposta vírus - hospedeiro, regulação da transcrição, sinalização via receptor de ácido retinóico	1			1
NEMO_HUMAN	NF-kappa-B essential modulator (NEMO) (Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit gamma)	Citoplasma	Resposta imune, indução de apoptose, transcrição			1	
PRLD1_HUMAN	PRELI domain-containing protein 1, mitochondrial	Citoplasma	Resposta imune, desenvolvimento multicelular				1
ROCK1_HUMAN	Rho-associated protein kinase 1 (Renal carcinoma antigen NY-REN-35)	Citoplasma	Apoptose, rolling dos leucócitos	2	1		
BAP31_HUMAN	B-cell receptor-associated protein 31	Citoplasma	Apoptose, resposta imune, transporte mediado por vesículas	1			
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV (Apolipoprotein A4)	Secretada	Processo metabólico, atividade antioxidante, homeostase do colesterol, resposta imune de mucosa, adesão de leucócitos, transporte de colesterol				1
B2MG_HUMAN	Beta-2-microglobulin	Secretada	Resposta Imune, apresentação de antígenos	1			
CCL24_HUMAN	C-C motif chemokine 24 (Eotaxin-2)	Secretada	Resposta imune, quimiotaxia de células do sistema imune		1		
EDN1_HUMAN	Endothelin-1 (Preproendothelin-1) (PPET1)	Secretada	Ativação de leucócitos, regulação positiva da migração da célula endotelial, regulação positiva da mitose		1		
GEM_HUMAN	GTP-binding protein GEM (RAS-like protein KIR)	Membrana	Resposta imune, sinalização celular via receptor de membrana	1			
MBP_HUMAN	Myelin basic protein (MBP) (Myelin A1 protein)	Membrana	Desenvolvimento do sistema nervoso central, reposta imune	1	1		
NKTR_HUMAN	NK-tumor recognition protein (NK-TR protein) (Natural-killer cells cyclophilin-related protein)	Membrana	Ligante de ciclosporina A, proteína de enovelamento	2	3		2

Utilizando a classificação do *Gene Ontology*, 15 das 646 proteínas diferentes identificadas nos 24 indivíduos estudados foram relacionadas com a resposta imune. Na tabela descrevemos o nome, a localização celular e a função biológica das proteínas, e mostramos o número de indivíduos por grupo de estudo que identificaram cada proteína. **TO**: indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=5); **RC**: indivíduos com rejeição crônica diagnosticado por biópsia (n=7); **EST**: indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=5); **SA**: indivíduos saudáveis.

As proteínas exclusivas dos 4 grupos de estudo foram: **RC (i)** a *B-cell receptor-associated protein 31* encontrada no indivíduo RCC06, **(ii)** a *Beta-2-microglobulin* encontrada no indivíduo RCA13 e **(iii)** a *GTP-binding protein GEM* também encontrada no indivíduo RCC06; **TO (i)** a *C-C motif chemokine 24* encontrada apenas no indivíduo TO03 e **(ii)** a *Endothelin-1* identificada pelo indivíduo TO16; **EST (i)** a *Histone-lysine N-methyltransferase MLL* e **(ii)** *NF-kappa-B essential modulator*, ambas identificadas apenas no indivíduo EST20, e **SA (i)** a *PRELI domain-containing protein 1, mitochondrial* encontrada apenas no indivíduo SA63 e **(ii)** a *Apolipoprotein A-IV* identificada no indivíduo SA74 (Tabela 11).

Apenas a proteína *Splicing factor, arginine/serine-rich 17A* foi encontrada em todos os grupos de estudo (Tabela 11). Esta proteína nuclear está expressa em células B ativadas e em vários órgãos (coração, cérebro, pulmão, fígado, rins, pâncreas, músculo esquelético, placenta). O grupo RC apresentou 2 proteínas relacionadas à resposta imune distintas das do grupo SA e com o grupo TO (Tabela 11). A proteína *NK-tumor recognition protein*, localizada na membrana plasmática das células NK, foi identificada com maior frequência no grupo indivíduos dos grupos TO (60%), RC (25%) e SA (33%) (Tabela 11).

Conjuntamente, foi observado que, tanto nos grupos de transplantados renais quanto no grupo de indivíduos saudáveis, identificamos proteínas na urina relacionadas com o sistema imune, sendo algumas exclusivas nos diferentes grupos e outras comuns entre 2 ou mais grupos. Nenhuma das proteínas foram identificadas por todos os indivíduos

do mesmo grupo. Entre os 4 grupos, o RC foi o que teve um maior número de proteínas envolvidos na resposta imune (9 das 15 proteínas). Já, os grupos TO e SA foram semelhantes, com 6 proteínas. Por outro lado, o grupo EST apresentou o menor número de proteínas (3 das 15 proteínas) envolvidas com a resposta imune em relação aos demais grupos de estudo.

4.7. Proteínas compartilhadas com o grupo Tolerância Operacional

Entre as 646 proteínas diferentes identificadas entre os 24 indivíduos estudados, 5 proteínas foram identificadas em todos os grupos de transplantados renais, mas não nos indivíduos saudáveis. Nenhuma dessas proteínas foi encontrada em todos os indivíduos dos diferentes grupos transplantados TO, RC e EST (Tabela 12). Porém, estavam presentes em pelo menos 1 indivíduo de cada grupo transplantado.

Dentre as 5 proteínas exclusivamente detectadas nos transplantados, 2 foram encontradas apenas entre os indivíduos do sexo masculino, sendo elas: **(i)** *caldesmon* identificada nos indivíduos TO08, RCC32, EST09 e EST11, e a **(ii)** *envoplakin*, identificada nos indivíduos TO03, RCA26, RCC24 e EST09 (Tabela 12). Pela classificação no Gene Ontology, usando a ferramenta Uniprot, 3 das 5 proteínas são citoplasmáticas e 2 proteínas são nucleares. Funcionalmente, a maioria está envolvida com o processo metabólico celular (3 proteínas) ou são proteínas estruturais (2 proteínas) (Tabela 12). Nenhuma dessas proteínas foi classificada como sendo envolvida na resposta imune (Tabela12).

Tabela 12. Proteínas identificadas apenas nos grupos de transplantados renais

Nome de Entrada	Nome da Proteína	Localização Celular	Processo Biológico	Indivíduos do grupo TO			Indivíduos do grupo RC					Indivíduos do grupo EST			
				TO03	TO08	TO62	RCA13	RCA26	RCC04	RCC24	RCC32	EST09	EST11	EST14	EST22
CALD1_HUMAN	Caldesmon (CDM)	Citoplasma	Contração muscular, movimentação celular												
CROCC_HUMAN	Rootletin (Ciliary rootlet coiled-coil protein)	Citoplasma	Ciclo celular, organização da projeção celular, proteína estrutural												
EVPL_HUMAN	Envoplakin (210 kDa paraneoplastic pemphigus antigen)	Citoplasma	Queratinização, cross-linking de peptídeos, processo metabólico, proteína estrutural												
PR38B_HUMAN	Pre-mRNA-splicing factor 38B (Sarcoma antigen NY-SAR-27)	Núcleo	Regulação da transcrição, processo metabólico												
RBBP6_HUMAN	Retinoblastoma-binding protein 6 (p53-associated cellular protein of testis) (Proliferation potential-related protein)	Núcleo	Ubiquitinação de proteínas, processo metabólico												

Na tabela descrevemos as proteínas identificadas apenas nos grupos de transplantados renais e ilustramos em quais indivíduos de cada grupo elas foram identificadas. As proteínas foram classificadas de acordo com o *Gene Ontology* para localização celular e o processo biológico, usando a ferramenta Uniprot disponível na internet (<http://www.uniprot.org>). **RC**: indivíduos com rejeição crônica diagnosticada por biópsia (n=7); **TO**: indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=5); **EST**: indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=5).

4.7.1. Compartilhamento de proteínas entre os grupos TO e RC

Os grupos TO e RC compartilharam 24 proteínas exclusivas desses 2 grupos, das quais pelo menos 1 dessas proteínas foi identificada em todos os indivíduos dos grupos TO e RC (Figura 12 e Tabela 13). A proteína *Nucleolar GTP-binding protein 1* foi identificada em 2 indivíduos de cada grupo (RCA13, RCC32, TO16, TO62).

Analisando a relação com proteinúria, observamos que 5 das 24 proteínas foram identificadas apenas em indivíduos dos grupos RC e TO que apresentaram proteinúria no momento da coleta de urina. Dessas proteínas a maioria está localizada no núcleo das células e apenas 2 das 5 proteínas foram classificadas na categoria de função biológica, sendo envolvidas no transporte e na transcrição celular.

Pela classificação no *Gene Ontology*, usando a ferramenta Uniprot, foi observado que a maioria das proteínas compartilhadas apenas pelos grupos TO e RC eram nucleares (50%) e citoplasmáticas (33%), e apenas 4% eram proteínas de membrana (Figura 13). Funcionalmente, estas proteínas foram classificadas como envolvidas no processo metabólico celular (10 proteínas), proteínas de transcrição (6 proteínas) ou relacionadas à, sinalização celular e síntese de proteínas (4 proteínas para cada função) (Figura 14). Apenas 2 das 24 proteínas foram classificadas como relacionadas à resposta imune: a *Rho-associated protein kinase 1*, envolvida no rolamento de leucócitos e a *Myelin basic protein (MBP)*, envolvida na sinalização e indução de proliferação de células T (Tabela 13 e Figura 14).

Figura 12. Frequência de proteínas identificadas exclusivamente nos indivíduos dos grupos TO e RC. Das 646 proteína diferentes identificadas, 24 estavam presentes apenas nos grupos TO e RC. O gráfico mostra o número de proteínas identificadas em cada indivíduo dos grupos TO e RC. TO: indivíduos com tolerância operacional (n=5); RC: indivíduos com rejeição crônica diagnosticada por biópsia (n=8)

Tabela 13. Proteínas identificadas apenas nos grupos TO e RC

Nome de Entrada	Nome da Proteína	Localização Celular	Processo Biológico	Indivíduos do grupo RC								Indivíduos do grupo TO				
				RCA13	RCA26	RCC01	RCC04	RCC06	RCC24	RCC32	RCC67	TO03	TO08	TO10	TO16	TO62
CHD2_HUMAN	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 2	Núcleo	Regulação da transcrição													
DDX23_HUMAN	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23	Núcleo	Transcrição, processo metabólico													
H10_HUMAN	Histone H1.0 (Histone H1')	Núcleo	Formação do nucleossoma													
HMGB2_HUMAN	High mobility group protein B2 (HMG-2)	Núcleo	regulação da transcrição, sinalização celular, processo metabólico, resposta para estímulos													
HNRGT_HUMAN	RNA-binding motif protein, X-linked-like-2 (Testis-specific heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G-T)	Núcleo	NC													
NOC3L_HUMAN	Nucleolar complex protein 3 homolog (NOC3 protein homolog) (Factor for adipocyte differentiation 24)	Núcleo	NC													
NOG1_HUMAN	Nucleolar GTP-binding protein 1 (Chronic renal failure gene protein)	Núcleo	Síntese do ribossomo, regulação negativa da migração celular, da adesão celular e de ubiquitinação de proteínas													
BNC1_HUMAN	Zinc finger protein basonuclin-1	Núcleo	Desenvolvimento da epiderme, regulação da transcrição, regulação positiva de proliferação celular, processo metabólico													
SFR18_HUMAN	Splicing factor, arginine/serine-rich 18 (Splicing factor, arginine/serine-rich 130)	Núcleo	NC													
SSF1_HUMAN	Suppressor of SWI4 1 homolog (Ssf-1) (Brix domain-containing protein 3)	Núcleo	Transcrição, processo metabólico													
SURF6_HUMAN	Surfeit locus protein 6	Núcleo	NC													
ZN800_HUMAN	Zinc finger protein 800	Núcleo	Regulação da transcrição, processo metabólico													
FIL1L_HUMAN	Filamin A-interacting protein 1-like	Citoplasma	NC													
JKIP1_HUMAN	Janus kinase and microtubule-interacting protein 1 (GABA-B receptor-binding protein)	Citoplasma	Transporte de proteínas													
RT15_HUMAN	28S ribosomal protein S15, mitochondrial	Citoplasma	Tradução de proteínas, processo metabólico													
MYH7_HUMAN	Myosin-7 (Myosin heavy chain 7) (Myosin heavy chain, cardiac muscle beta isoform)	Citoplasma	Contração muscular, processo metabólico													
RM51_HUMAN	39S ribosomal protein L51, mitochondrial (MRP-L51)	Citoplasma	Tradução de proteínas, processo metabólico													
HAP28_HUMAN	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein (PDGF-associated protein)	Citoplasma	Proliferação celular, transdução de sinais													
ROCK1_HUMAN	Rho-associated protein kinase 1 (Renal carcinoma antigen NY-REN-35)	Citoplasma	Apoptose, rolling dos leucócitos, sinalização celular, processo metabólico													
RL19_HUMAN	60S ribosomal protein L19	Citoplasma	Tradução de proteínas, processo metabólico													
MBP_HUMAN	Myelin basic protein (MBP) (Myelin membrane encephalitogenic protein)	Membrana	Desenvolvimento do sistema nervoso central, reposta imune, sinalização celular, resposta para estímulos													
CCD49_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 49	NC	NC													
FA43B_HUMAN	Protein FAM43B	NC	NC													
L10K_HUMAN	Leydig cell tumor 10 kDa protein homolog	NC	NC													

Na tabela descrevemos as 24 proteínas identificadas apenas nos grupos TO e RC, e mostramos em quais indivíduos de cada grupo elas foram identificadas. As proteínas foram classificadas de acordo com o *Gene Ontology* para localização celular e o processo biológico, usando a ferramenta Uniprot disponível na internet (<http://www.uniprot.org>). **RC**: indivíduos com rejeição crônica diagnosticado por biópsia (n=8); **TO**: indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=5)

Figura 13. Frequência de proteínas identificadas exclusivamente nos grupos TO e RC, de acordo com a localização celular. No gráfico mostramos a porcentagem do número de proteínas classificadas para localização celular, de acordo com a classificação no *Gene Ontology*, usando a ferramenta Uniprot (<http://www.uniprot.org>). As proteínas foram classificadas como: núcleo, citoplasma membrana ou não conhecida (NC). A frequência de proteínas classificadas pela localização celular foi calculada baseada nas 24 de proteínas identificadas apenas nos grupos TO e RC. RC: indivíduos com rejeição crônica diagnosticada por biópsia (n=8); TO: indivíduos com tolerância operacional (n=5). NC: origem não conhecida.

Figura 14. Classificação funcional das proteínas diferentes identificadas somente nos grupos TO e RC. Neste gráfico mostramos a classificação de acordo com o *Gene Ontology* para função biológica, das 24 proteínas compartilhadas apenas entre os grupos TO e RC. A análise foi realizada usando a ferramenta Uniprot (<http://www.uniprot.org>). RC: indivíduos com rejeição crônica diagnosticada por biópsia (n=8); TO: indivíduos com tolerância operacional (n=5).

4.7.2. Compartilhamento de proteínas entre os grupos TO e EST

Das 189 proteínas diferentes identificadas no grupo TO e das 205 proteínas diferentes identificadas no grupo EST, 12 proteínas foram comuns entre os dois grupos. Todos os indivíduos em ambos os grupos apresentaram pelo menos 1 das 12 proteínas (Figura 15 e Tabela 14). A proteína *ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1* foi identificada em 2

indivíduos tolerantes (TO16 e TO62) e em 1 indivíduo estável (EST 14). As demais proteínas estavam presentes em apenas 1 indivíduo de cada grupo.

Nenhuma das 12 proteínas foi encontrada apenas em indivíduos do sexo feminino, no entanto, 5 das 12 proteínas estavam presentes somente em indivíduos do sexo masculino.

Usando a ferramenta Uniprot, pelo *Gene Ontology*, a maioria das proteínas compartilhadas entre os grupos TO e EST são de localização no núcleo celular e nenhuma proteína foi classificada como secretada (Figura 16). Pelo processo biológico, observamos que a maioria das proteínas estavam relacionadas com o processo metabólico celular (8 proteínas) e de transcrição (6 proteínas) (Figura 17). Nenhuma das proteínas comuns nos grupos TO e EST foi classificada como envolvida na resposta imune (Figura 17 e Tabela 14).

Tabela 14. Proteínas presentes apenas nos grupos TO e EST

Nome de Entrada	Nome da Proteína	Localização Celular	Processo Biológico	Indivíduos do grupo TO					Indivíduos do grupo EST				
				TO03	TO08	TO10	TO16	TO62	EST09	EST11	EST14	EST20	EST22
H11_HUMAN	Histone H1.1	Núcleo	Formação do nucleossoma, espermatogênese										
ATRX_HUMAN	Transcriptional regulator ATRX	Núcleo	Regulação da transcrição, processo metabólico										
PR38A_HUMAN	Pre-mRNA-splicing factor 38A	Núcleo	Regulação da transcrição, processo metabólico										
SFRS6_HUMAN	Splicing factor, arginine/serine-rich 6 (Pre-mRNA-splicing factor SRP55)	Núcleo	Regulação da transcrição, processo metabólico										
TOPRS_HUMAN	E3 ubiquitin-protein ligase Topors(SUMO1-protein E3 ligase Topors)	Núcleo	Resposta ao DNA danificado, atividade ligase, ligante de antígenos, transcrição, processo metabólico										
BRWD1_HUMAN	Bromodomain and WD repeat-containing protein 1	Núcleo	Transcrição, processo metabólico										
RB6I2_HUMAN	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1 (ERC-1) (RAB6-interacting protein 2)	Citoplasma	Transporte de proteínas, regulação da transcrição, fosforilação do I-kappaB, atividade de fator de transcrição na regulação positiva de NF-kappaB, regulação positiva de anti-apoptose, processo metabólico										
CAN6_HUMAN	Calpain-6 (Calpamodulin)	Citoplasma	Proteólise, processo metabólico										
RIMS1_HUMAN	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1 (Rab-3-interacting molecule 1)	Membrana	Exocitose dependente de cálcio, transporte de proteínas intracelular, percepção visual										
AN18B_HUMAN	Ankyrin repeat domain-containing protein 18B	NC	NC										
RL3L_HUMAN	60S ribosomal protein L3-like	NC	Síntese de proteínas, processo metabólico										
CT117_HUMAN	Uncharacterized protein C20orf117	NC	NC										

Na tabela descrevemos as 12 proteínas identificadas apenas nos grupos TO e EST, e mostramos em quais indivíduos de cada grupo elas foram identificadas. As proteínas foram classificadas de acordo com o *Gene Ontology* para localização celular e o processo biológico, usando a ferramenta Uniprot (<http://www.uniprot.org>). **TO**: indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=5), **EST**: indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=5).

Figura 15. Frequência de proteínas identificadas exclusivamente nos indivíduos dos grupos TO e EST. Das 646 proteínas diferentes identificadas, 12 estavam presentes apenas nos grupos TO e EST. O gráfico mostra o número de proteínas identificadas por cada indivíduo dos grupos TO e EST. TO: indivíduos com tolerância operacional (n=5); EST: indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=5).

Figura 16. Frequência de proteínas identificadas exclusivamente nos grupos TO e EST de acordo com a localização celular. No gráfico mostramos a porcentagem do número de proteínas classificadas para localização celular de acordo com a classificação no *Gene Ontology*, usando a ferramenta Uniprot (<http://www.uniprot.org>). As proteínas foram classificadas como: núcleo, citoplasma membrana ou não conhecida (NC). A frequência do número de proteínas classificadas pela localização celular foi calculada baseada nas 12 proteínas identificadas apenas nos grupos TO e EST. TO: indivíduos com tolerância operacional (n=5), EST: indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=5). NC: origem não conhecida.

Figura 17. Caracterização funcional das proteínas diferentes identificadas somente nos grupos TO e EST. Este gráfico mostra a classificação de acordo com o *Gene Ontology* para função biológica das 12 proteínas compartilhadas apenas entre os grupos TO e EST. A análise foi realizada usando a ferramenta Uniprot (<http://www.uniprot.org>). TO: indivíduos com tolerância operacional (n=5), EST: indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=5).

4.7.3. Compartilhamento de proteínas entre os grupos TO e

SA

Foram identificadas 16 proteínas que estavam presentes apenas nos indivíduos dos grupos TO e SA. Somente os indivíduos TO16 e SA73 não apresentaram qualquer das 16 proteínas compartilhadas entre os grupos TO e SA (Figura 18). Apenas 1 das 16 proteínas foi identificada em 2 indivíduos de cada grupo (TO03, TO10, SA64, SA65) (Tabela 15), e 2 das 16 proteínas foram identificadas em 1 indivíduo tolerante e 2 indivíduos saudáveis (Tabela

15). As demais proteínas foram identificadas em 1 indivíduo de cada grupo (Tabela 15).

As proteínas *Myosin-2* e *Pre-mRNA-splicing factor SYF2* foram identificadas em 2 indivíduos do sexo feminino, enquanto que as proteínas *Myeloid cell nuclear differentiation antigen* e *Splicing factor, arginine/serine-rich 7* foram identificadas apenas nos indivíduos do sexo masculino.

Figura 18. Frequência de proteínas identificadas exclusivamente nos grupos TO e SA. Das 646 proteínas diferentes identificadas, 16 estavam presentes apenas nos grupos TO e SA. O gráfico mostra o número de proteínas identificadas em cada indivíduo dos grupos TO e SA. TO: indivíduos com tolerância operacional (n=5); SA: indivíduos saudáveis (n=6).

Tabela 15. Proteínas identificadas apenas nos grupos TO e SA

Nome de Entrada	Nome da Proteína	Localização Celular	Processo Biológico	Indivíduos do grupo TO					Indivíduos do grupo SA					
				TO03	TO08	TO10	TO16	TO62	SA63	SA64	SA65	SA66	SA73	SA74
HPC14_HUMAN	Homeobox protein C14	Núcleo	Regulação da transcrição											
CENPW_HUMAN	Centromere protein W (Cancer-up-regulated gene 2 protein)	Núcleo	NC											
RBM15_HUMAN	Putative RNA-binding protein 15 (RNA-binding motif protein 15)	Núcleo	Interação vírus - hospedeiro											
SFR12_HUMAN	Splicing factor, arginine/serine-rich 12 (Serine/arginine-rich-splicing regulatory protein 86)	Núcleo	Regulação da transcrição, processo metabólico											
SFRS7_HUMAN	Splicing factor, arginine/serine-rich 7 (Splicing factor 9G8)	Núcleo	Regulação da transcrição, processo metabólico											
MNDA_HUMAN	Myeloid cell nuclear differentiation antigen	Núcleo	Regulação da transcrição, resposta de defesa celular, processo metabólico											
SYF2_HUMAN	Pre-mRNA-splicing factor SYF2 (CCNBP1-interactor)	Núcleo	Regulação da transcrição, processo metabólico											
MYH2_HUMAN	Myosin-2 (Myosin heavy chain 2) (Myosin heavy chain, skeletal muscle, adult 2)	Citoplasma	Contração muscular, organização do citoesqueleto											
GKAP1_HUMAN	G kinase-anchoring protein 1 (cGMP-dependent protein kinase-anchoring protein of 42 kDa)	Citoplasma	Transdução de sinais											
MYH1_HUMAN	Myosin-1 (Myosin heavy chain 1) (Myosin heavy chain, skeletal muscle, adult 1)	Citoplasma	Contração muscular											
SNIP_HUMAN	p130Cas-associated protein (p140Cap) (SNAP-25-interacting protein) (SNIP)	Citoplasma	Exocitose											
WHAMM_HUMAN	WASP homolog-associated protein with actin, membranes and microtubules	Citoplasma	Transporte mediado por vesículas											
MYH14_HUMAN	Myosin-14 (Myosin heavy chain 14) (Myosin heavy chain, non-muscle IIc)	Secretada	Regulação da forma celular											
YA046_HUMAN	Uncharacterized protein ENSP00000361571	NC	NC											
BUD13_HUMAN	BUD13 homolog	NC	NC											
RL6_HUMAN	60S ribosomal protein L6 (Tax-responsive enhancer element-binding protein 107)	NC	Síntese de proteínas, processo metabólico											

Na tabela descrevemos as 16 proteínas identificadas apenas nos grupos TO e SA, e ilustramos em quais indivíduos de cada grupo elas foram identificadas. As proteínas foram classificadas de acordo com o *Gene Ontology* para localização celular e o processo biológico, usando a ferramenta Uniprot (<http://www.uniprot.org>). **TO**: indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=5), **SA**: indivíduos estáveis saudáveis (n=6).

Pela classificação do *Gene Ontology*, através da ferramenta Uniprot, observamos que 44% das proteínas compartilhadas entre os grupos TO e SA eram proteínas nucleares e 31% eram proteínas citoplasmáticas. Nenhuma das 16 proteínas foi classificada como proteína de membrana (Figura 19). Funcionalmente, 5 das 16 proteínas foram classificadas como envolvidas no processo de transcrição celular e processo metabólico (Figura 20). A proteína *p130Cas-associated protein*, identificada pelos indivíduos TO03 e SA74, foi classificada como relacionada a exocitose (Figura 20 e Tabela 15). Nenhuma das 16 proteínas compartilhadas entre os indivíduos dos grupos TO e SA foi classificada como de resposta imune (Figura 20 e Tabela 15).

Figura 19. Frequência de proteínas identificadas exclusivamente nos grupos TO e SA de acordo com a localização celular. No gráfico mostramos a porcentagem do número de proteínas classificadas para localização celular de acordo com a classificação no *Gene Ontology*, usando a ferramenta Uniprot (<http://www.uniprot.org>). As proteínas foram classificadas como: núcleo, citoplasma membrana ou NC. A frequência do número de proteínas classificadas pela localização celular foi calculada baseada nas 16 de proteínas identificadas apenas nos grupos TO e SA. TO: indivíduos com tolerância operacional (n=5), SA: indivíduos saudáveis (n=6). NC: origem não conhecida.

Figura 20. Caracterização funcional das proteínas diferentes identificadas somente nos grupos TO e SA. Este gráfico mostra a classificação de acordo com o *Gene Ontology* para função biológica das 16 proteínas compartilhadas apenas entre os grupos TO e SA. A análise foi realizada usando a ferramenta Uniprot (<http://www.uniprot.org>). TO: indivíduos com tolerância operacional (n=5), SA: saudáveis (n=6).

4.8. Proteínas exclusivas dos diferentes grupos do estudo

Foram classificadas, pelo programa IPA, 81 das 87 proteínas identificadas no grupo TO, 160 das 168 proteínas do grupo RC, 100 das 106 proteínas do grupo EST e 96 das 108 proteínas do grupo SA (Tabela 16).

Tabela 16. Localização celular das proteínas identificadas exclusivamente nos diferentes grupos de estudo

Localização celular	Grupos de estudo			
	RC	TO	EST	SA
Núcleo	52	31	33	36
Citoplasma	40	13	24	22
Membrana	6	2	1	4
Secretada	2	4	1	2
NC	60	31	41	32

A tabela mostra o número de proteínas identificadas exclusivamente nos grupos de estudo que foram classificadas para localização celular, pelo programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA). As proteínas foram classificadas como: núcleo, citoplasma, membrana, secretada ou não conhecida (NC). Total de proteínas classificadas pelo IPA nos grupos foram: RC=160/168 proteínas, TO=81/87 proteínas, EST=100/106 proteínas e SA=96/108 proteínas. **RC**: indivíduos com rejeição crônica diagnosticado por biópsia (n=7); **TO**: indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=5); **EST**: indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=5); **SA**: indivíduos saudáveis.

Das proteínas classificadas pelo IPA, a frequência de proteínas nucleares e de proteínas classificadas como não conhecidas foram semelhantes em todos os grupos de estudo, em torno de 30% (Figura 21). O grupo TO apresentou uma frequência menor (16%) de proteínas citoplasmáticas quando comparado com os grupos RC (25%), EST (24%) e SA (22,9%) (Figura 21). Em contraste, o grupo TO apresentou uma frequência maior de proteínas secretadas (5%) em relação aos demais

grupos de estudo (Figura 21). Em relação às proteínas de membrana, o grupo EST foi o que menos apresentou essa categoria de proteínas, apenas 1% comparado aos grupos TO (2,5%), RC (3,8%) e SA (2,1%) (Figura 21).

Figura 21. Frequência de proteínas exclusivas de cada grupo de estudo de acordo com a localização celular. No gráfico mostramos a porcentagem de proteínas classificadas para localização celular usando o programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA). As proteínas foram classificadas como: núcleo, citoplasma, membrana ou não conhecida (NC). A frequência de proteínas classificadas pela localização celular foi calculada baseada no número total de proteínas classificadas pelo IPA. Foram classificadas no grupo RC= 160 proteínas, TO=81 proteínas, EST=100 proteínas e SA=96 proteínas. RC: indivíduos com rejeição crônica diagnosticada por biópsia (n=8); TO: indivíduos com tolerância operacional (n=5); EST: indivíduos com função estável do enxerto e imunossupressão convencional (n=5); SA: indivíduos saudáveis (n=6). NC: origem não conhecida.

Dentre as diferentes funções classificadas pelo IPA, foi observado que o número de proteínas relacionadas com a bioquímica de pequenas moléculas e com o processo metabólico, tais como metabolismo de lipídios, vitaminas, carboidratos e outros, foram encontradas com maior frequência

no grupo SA (apresentando de 1 a 6 proteínas), seguido do grupo TO (que apresentou em média de 1 a 2 proteínas, com exceção do metabolismo de ácidos nucleicos, minerais e vitaminas), do grupo RC (que apresentou em média de 1 a 2 proteínas, com exceção do metabolismo de ácidos nucleicos, drogas e carboidratos). O grupo EST que não apresentou proteínas envolvidas com processos metabólicos. Nos demais grupos, ou o número dessas proteínas foi baixo (menos de uma proteína no grupo RC) ou ausente (grupo EST) (Figura 22). Em contraste, os indivíduos do grupo RC e EST exibiram um número maior de proteínas associadas com ciclo celular, síntese de proteínas e com a replicação, recombinação e reparação de DNA, uma média de 8 proteínas, em relação aos grupos TO e SA (menos de 2 proteínas) (Figura 22).

Também foi observado um número maior de proteínas relacionadas com a proliferação celular no grupo RC comparado com os demais grupos. Embora também tenham sido identificadas nos grupos TO e SA, o número dessas proteínas foi em torno de 2 vezes menor do que no grupo RC (Figura 22). Nos grupos TO e SA também foi identificado um número maior de proteínas associadas com morte celular (3 proteínas) do que nos grupos RC e EST (1 proteína) (Figura 22).

Dentre as 87 proteínas exclusivas do grupo TO, 2 proteínas foram identificadas, sendo elas: a *C-C motif chemokine 24* (CCL24), identificada no indivíduo TO 03, e a *Endothelin-1*, identificada no indivíduo TO 16, ambas relacionadas com quimiotaxia de células do sistema imune. Essas proteínas já tinham sido identificadas anteriormente, porém não como exclusivas do

grupo TO. No grupo RC foi identificada apenas a proteína *Beta-2-microglobulin* que está envolvida com a apresentação de antígenos, identificada pelo indivíduo RCA26 (Figura 22).

Figura 22. Classificação funcional das proteínas exclusivas nos diferentes grupos de estudo. Este gráfico mostra o número de proteínas identificadas exclusivamente por cada grupo de estudo em relação a função molecular e celular. A análise foi realizada pelo programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA). Foram classificados pelo IPA. RC= 160 proteínas, TO=81 proteínas, EST=100 proteínas e SA=96 proteínas. RC: indivíduos com rejeição crônica diagnosticada por biópsia (n=8); TO: indivíduos com tolerância operacional (n=5); EST: indivíduos com função estável do enxerto e imunossupressão convencional (n=5); SA: indivíduos sadios (n=6).

4.9. Frequência das Proteínas Exclusivas nos Diferentes Grupos de Estudo

Na análise da distribuição das proteínas exclusivas de cada grupo foi observado que todos os indivíduos de cada grupo apresentaram pelo menos 1 das proteínas que discriminavam aquele grupo específico. Apesar das proteínas exclusivas não terem sido compartilhadas por todos os indivíduos do mesmo grupo, a totalidade dos indivíduos de cada grupo apresentou várias dessas proteínas (cada indivíduo apresentou em média 15% das proteínas exclusivas de seu grupo) (Figura 23).

Figura 23. Frequência de proteínas identificadas exclusivamente nos indivíduos dos grupos de estudo. O gráfico mostra porcentagem de proteínas identificadas em cada indivíduo dos grupos TO, RC, EST e SA. Foram identificadas 87 proteínas exclusivas no grupo TO, 168 no grupo RC, 106 no grupo EST e 108 no grupo SA. TO: indivíduos com tolerância operacional (n=5); RC: indivíduos com rejeição crônica diagnosticado por biópsia (n=8), EST: indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=5); SA: indivíduos saudáveis (n=6).

4.10 Painei de proteínas relacionadas com uma possível assinatura molecular urinária do grupo de tolerantes operacionais

Diante das análises realizadas nesse trabalho propõe-se uma possível assinatura molecular urinária do grupo de indivíduos no estado de tolerância operacional que o diferencie dos demais grupos de estudo. Nesse sentido, propomos inicialmente um painel contendo 10 proteínas associadas exclusivamente a esse estado. Para isso, selecionamos primeiramente as 3 proteínas exclusivas do grupo TO compartilhadas por mais de um indivíduo do grupo, sendo elas: Kinetochore-associated protein KNL-2 homolog (TO16 e TO62), Lebercilin (TO10 e TO62) e Rho-associated protein kinase 2 (TO10 e TO62). Foram também selecionadas para esse painel as proteínas classificadas como envolvidas na resposta imune exclusivas desse grupo, sendo elas: C-C motif chemokine 24 (TO03) e Endothelin 1 (TO16). As demais proteínas incluídas no painel foram: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5 (TO03), Triple functional domain protein (TO03), Protein Jumonji (TO08), Structural maintenance of chromosomes protein 1A (TO08) e Early endosome antigen 1 (TO16). Este painel foi composto por 10 proteínas com o intuito de possuir uma maior abrangência dos indivíduos do grupo TO (ANEXO B).

5. Discussão

Neste trabalho, nosso principal objetivo foi investigar se os indivíduos em estado de *tolerância operacional* apresentam um perfil diferencial de peptídeos urinários, potencialmente, relevante para diagnóstico deste estado imunológico, assim como para a compreensão de seus mecanismos. A abordagem proteômica que utilizamos nos permitiu identificar, a partir dos peptídeos urinários, perfis diferenciais de proteínas no grupo de tolerância operacional e também nos diferentes grupos do estudo, indicando que o compartimento peptídico urinário pode ser informativo para discriminar diferentes estados imunológicos no transplante renal humano.

Analisando as principais características clínicas e de função renal nos diferentes grupos, observamos que o grupo de rejeição crônica (RC) apresentou níveis de proteinúria elevados e baixa taxa de filtração glomerular em relação aos grupos de tolerância operacional (TO) e estáveis com imunossupressão (EST), porém sem aumento dos níveis de creatinina sérica. Isto contrasta com os dados da literatura, nos quais é bem documentado que a rejeição crônica é, geralmente, caracterizada por uma lenta disfunção renal, resultando em um aumento progressivo da creatinina sérica e, geralmente, também acompanhada de proteinúria e hipertensão arterial (Kasiske *et al.*, 2002, Joosten *et al.*, 2005). Destacamos porém, que apesar de não termos detectado alteração nos níveis de creatinina sérica no grupo RC, a taxa de filtração glomerular, que é a medida mais sensível da função renal, estava diminuída neste grupo. Além disso, todos os indivíduos do grupo RC tinham diagnóstico por biópsia de rejeição crônica. Dessa

forma, nossos resultados mostram que o grupo RC apresenta maior disfunção renal em relação aos demais grupos. É provável que não tenhamos detectado diferença estatística dos níveis séricos de creatinina no grupo RC em relação aos demais grupos devido ao baixo número de indivíduos estudados, uma vez que observamos diferença estatística deste mesmo parâmetro quando os mesmos grupos clínicos, porém com um número maior de indivíduos, foram avaliados em trabalho publicado pelo nosso grupo (Moraes-Vieira *et al.*, 2010).

Há dados na literatura nos quais é mostrado que a evolução clínica do indivíduo transplantado renal para rejeição crônica está associada com diversos fatores, como o tipo de doador (falecido/vivo) (Terasaki *et al.*, 1995, Knight *et al.*, 2001), episódios de rejeição aguda (Humar *et al.*, 2000) e sensibilização prévia do receptor a aloantígenos (transfusões sanguíneas, gestações e número de transplantes) (Piazza *et al.*, 2001). Apesar de não termos detectado uma associação entre os fatores de risco com a evolução clínica para rejeição crônica, nós observamos que o grupo RC apresentou uma maior frequência de doador falecido em relação aos grupos TO e EST, assim como um maior frequência de episódios de rejeição aguda em relação aos demais grupos de transplantados renais com função estável do enxerto. Novamente, não observamos associação dos fatores de risco com a evolução clínica para rejeição crônica, provavelmente devido ao pequeno número de indivíduos por grupo de estudo.

Após a caracterização clínica dos diferentes grupos de estudo nós avaliamos se havia um perfil diferencial de peptídeos urinários entre o grupo

TO, os demais grupos de transplantados renais e o grupo de indivíduos saudáveis. Para tanto, utilizamos a abordagem proteômica de *shotgun*, que se baseia na análise de fragmentos de peptídeos de misturas complexas de proteínas, usando-se a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Apesar da abordagem *shotgun* não ter sido descrita antes para analisar a fração peptídica, ela nos permitiu detectar um número expressivo de peptídeos, um total de 15283 diferentes sequências peptídicas em todos os grupos, correspondentes a 646 proteínas distintas na urina, algumas das quais já haviam sido descritas como presentes na urina (Oetting, *et al.* 2006; HUPO, 2010). Deste modo, interpretamos que esta abordagem tenha sido válida para o nosso objetivo e avaliamos que ela poderá ser mais explorada em futuros estudos. Não obstante, observamos que peptídeos da albumina não foram detectados em nossas amostras, apesar desta proteína ser, geralmente, observada em análises da fração protéica e peptídica da urina (Strong *et al*, 2005).

Nesse trabalho, centramos as nossas análises no repertório de proteínas identificadas a partir dos peptídeos urinários e discutiremos os nossos resultados nesta perspectiva. Optamos por esta análise visando trazer informações também sobre potenciais mecanismos envolvidos nos processos biológicos em estudo, relacionados às proteínas dos peptídeos urinários. No entanto, é importante apontar que futuras análises considerando apenas sequências de peptídeos como potenciais biomarcadores podem ser feitas, mesmo de peptídeos derivados de proteínas não identificadas. Como relatado na literatura, análises envolvendo

peptídeos identificados podem auxiliar a discriminar processos patológicos, mesmo sem a identificação da proteína correspondente (Bongartz, *et al.* 2009)

Quando avaliamos pelo *Gene Ontology* a localização celular das proteínas correspondentes aos peptídeos urinários detectados nos 4 grupos de estudo, observamos que todos os grupos apresentaram maior número de proteínas nucleares e citoplasmáticas, indicando que a maioria dos peptídeos encontrados na urina fazem parte dos processos de *clearance* urinário, tanto no transplante quanto fisiologicamente. Em contraste com nossos dados, em um estudo realizado em indivíduos saudáveis, com o extrato protéico da urina, foi relatado que a maioria das proteínas urinárias é proveniente da membrana e do citoplasma das células (Adachi *et al.*, 2006), enquanto que, em indivíduos transplantados renais com função estável, a maioria das proteínas urinárias é secretada e de membrana celular (Bañón-Maneus *et al.* 2010). As diferenças entre os nossos dados e os da literatura podem ser explicadas, em parte, pelas diferentes abordagens metodológicas utilizadas. Ainda tem sido pouco estudado, do ponto de vista funcional, se essas proteínas são provenientes de processo de morte celular, ou se têm algum papel fisiológico ou fisiopatológico. A maioria dos grupos de pesquisa busca nos peptídeos/proteínas urinárias mais biomarcadores. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade dessas proteínas/peptídeos terem alguma atividade funcional. Nesse sentido, vale apontar que o compartimento urinário reflete não apenas o estado fisiológico ou patológico renal, como também o estado sistêmico do indivíduo em relação à ingesta

de alimentos, exercício físico e processos metabólicos, estados hormonais, idade e outros.

Quando analisamos as proteínas relacionadas com a resposta imune, observamos que apenas um pequeno número das proteínas totais identificadas (2,3%) foi classificado pelo *Gene Ontology* para esta categoria. A frequência dessas proteínas entre os diferentes grupos de estudo foi diferente nos diferentes grupos, sendo maior no grupo RC (3% das proteínas eram relacionadas com a resposta imune) e TO (3,2%), depois no grupo SA (2,7%), e menor no grupo EST (1,5%). Com esses resultados, podemos dizer que componentes da resposta imune fazem parte do compartimento peptídico urinário, como já descrito em outros processos e em saudáveis (Muthukumar, *et al.* 2005; Moraes-Vieira PM, *et al.* 2010; Schaub, *et al.* 2009; Brouard, *et al.* 2007). Levantamos a hipótese de que a menor frequência de proteínas relacionadas à resposta imune, no grupo EST, esteja relacionada ao menor processo inflamatório e/ou à menor ativação de mecanismos imunorreguladores, ou mesmo ao uso de imunossupressores. Como as proteínas relacionadas ao sistema imune foram diferentes nos diferentes grupos interpretamos que esses diferentes estados clínicos e fisiológicos mobilizam e permitem o acesso de diferentes moléculas imunológicas ao compartimento urinário, que podem ter um papel funcional nos mecanismos operantes. Vale mencionar que infecções do trato urinário são frequentes nos transplantados renais, ativando a resposta imune, com repercussão no compartimento urinário.

Dentre as proteínas identificadas relacionadas à resposta imune,

destacamos a proteína *NK-tumor recognition protein*, um receptor expresso pelas células NK, presentes com uma maior frequência no grupo TO (em 60% dos indivíduos). Interessantemente, observamos que todos os indivíduos tolerantes operacionais que apresentaram esta proteína tiveram exatamente a mesma sequência de peptídeo em comum, contendo 15 resíduos de aminoácidos. Essa sequência foi identificada exclusivamente nos indivíduos do grupo TO. Outros grupos, como RC (25% dos indivíduos) e saudáveis (33% dos indivíduos), também apresentaram a proteína *NK-tumor recognition protein*, porém com menor frequência em relação ao grupo TO. Acreditamos que as células NK possam desempenhar um papel na manutenção homeostática na mucosa, assim como desempenhar um papel no transplante. Segundo Martinez-Llordella e colaboradores (2008), indivíduos tolerantes operacionais hepáticos exibem em células do sangue periférico, uma maior expressão de genes codificando uma variedade de receptores de superfície expressos por células NK, sugerindo que estas células podem ter um papel no estado de tolerância (Martinez-Llordella *et al.*, 2008).

Outra proteína de destaque no sistema imune encontrada apenas em um indivíduo com rejeição crônica (RCA26) foi a $\beta 2$ microglobulina, já descrita como sendo um potencial biomarcador de rejeição no transplante renal tanto na urina (Oetting, *et al.* 2006;) como no soro (Câmara *et al.*, 1998).

A proteína secretada C-C *motif chemokine 24* (CCL24) foi identificada apenas em um indivíduo tolerante operacional (TO03). Esta quimiocina está

envolvida principalmente em processos alérgicos por recrutar para o local inflamado células do sistema imune, principalmente eosinófilos e células Th2 (Rothenberg, 1999). É possível que a CCL24 (eotaxina) tenha papel funcional no transplante renal, possivelmente recrutando células do tipo Th2 para o enxerto. No contexto de transplante, as células Th2 têm, geralmente, um papel imunorregulador, provavelmente pela alta produção de IL-4 e IL-10. Por outro lado, esta quimiocina pode recrutar também para o enxerto eosinófilos, podendo levar ao dano tecidual. Como a CCL24 foi identificada exclusivamente em um indivíduo do grupo TO, é mais provável que ela exerça um papel imunorregulador, no transplante, antagonizando uma resposta próinflamatória dependente de IFN- γ . No entanto, ainda não há nada descrito na literatura sobre o papel da CCL24 no transplante e nem na tolerância operacional.

Finalmente, a endotelina, assim como a CCL24, foi identificada apenas no indivíduo TO03. Essa proteína secretada pelo endotélio vascular está associada com a vasoconstrição (Naicker, *et al.* 2001). Em estudo realizado em transplante renal mostrou-se que esta proteína está aumentada durante a rejeição aguda, sugerindo que a endotelina 1 possa exercer um papel importante na inflamação renal (Naicker, *et al.* 2001). Em nosso contexto, pode ser que o indivíduo em tolerância operacional, TO03, tenha algum grau de inflamação no enxerto, porém, neste caso, com um perfil mais do tipo Th2.

Apesar das proteínas relacionadas ao sistema imune terem sido pouco frequentes na urina, ressaltamos que pode haver um viés de

classificação pelo *Gene Ontology*, uma vez que algumas proteínas sabidamente envolvidas com processos imunológicos, como por exemplo, a vimentina, relatada como alvo molecular na rejeição mediada por anticorpos (Jonker, *et al.* 2005) e em doenças autoimunes (Feitsma, *et al.* 2010), não foi classificada como relacionada ao sistema imune. Assim, acreditamos que uma análise mais minuciosa levando em conta outras fontes de informação imunológica, pode enriquecer esta análise, trazendo talvez novas informações de potencial relevância funcional.

Em nosso estudo, encontramos a vimentina apenas no grupo RC, nos indivíduos RCA26 e RCC01. Estudos mostram que autoanticorpos antivimentina e células T CD8+ específicas para esta proteína podem participar no processo de rejeição no transplante cardíaco (Mahesh *et al.*, 2007, Barber *et al.*, 2004). Em rins normais, a vimentina é expressa nos glomérulos, arteríolas e nos fibroblastos intersticiais, e sua expressão é aumentada na injúria renal, sendo um marcador de injúria túbulo intersticial (Gröne, *et al.* 1987). Além disso, macrófagos também podem secretar a vimentina (Mor-Vaknin, *et al.* 2003). Esses dados corroboram nossos achados, uma vez que esta proteína foi identificada em 1 de 2 indivíduos com diagnóstico, por biópsia, de rejeição crônica mediada por anticorpos (RCA26). Em outro indivíduo em que identificamos esta proteína (RCC1) tinha diagnóstico de rejeição crônica mediada por células, porém o mesmo evoluiu para perda do enxerto pouco tempo depois da coleta da urina. Acreditamos que no ápice do processo de rejeição ambos os mecanismos, celular e humoral, contribuam para a perda do enxerto.

Apesar das proteínas exclusivas serem mais relevantes para o nosso objetivo de determinar um perfil diferencial de peptídeos na urina no grupo de tolerância operacional, com potencial para diagnóstico, a análise do repertório de proteínas compartilhadas entre diferentes grupos, pode trazer informações relevantes sobre como os processos fisiológicos e ou patológicos têm repercussão no compartimento urinário. Por exemplo, as proteínas mais frequentes de cada grupo foram compartilhadas com indivíduos de outros grupos e podem refletir mecanismos comuns, sejam eles inflamatórios, de remodelamento/manutenção ou metabólicos. Um exemplo foi a *Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein*, relacionada com mitose, presente na maioria dos indivíduos de todos os grupos de estudo. Uma explicação é que esta proteína possa ser proveniente de células que estão em constante regeneração, como no trato urogenital.

Como nosso objeto de estudo principal é o grupo de tolerância operacional, procuramos focar nossa análise de compartilhamento de proteínas com o grupo TO. Este grupo clínico teve compartilhamento de proteínas com todos os grupos, principalmente de proteínas relacionadas a processos metabólicos. O total de compartilhamento foi de 54 % (102 proteínas) das proteínas detectadas em TO (189 proteínas), a partir de peptídeos urinários. Os compartilhamentos mais frequentes no TO foram com todos os grupos simultaneamente (25,5%) e com RRC (23%). Como apontamos anteriormente, interpretamos que essas proteínas, podem refletir mecanismos comuns, sejam eles inflamatórios, de

remodelamento/manutenção ou metabólicos, mas que não discriminam o estado de tolerância operacional. Também é interessante observar que o compartilhamento entre todos os grupos de transplantados foi de apenas 5 proteínas (mais citoplasmáticas e estruturais), sugerindo que os peptídeos do compartimento urinário sejam mais informativos em relação aos diferentes estados clínicos no transplante, refletindo pouco sobre componentes comuns ao transplante em si.

Considerando que o grupo TO tem em comum com o grupo de indivíduos saudáveis um estado de homeostase, é interessante dar uma atenção especial a essas proteínas compartilhadas apenas por esses dois grupos de estudo, uma vez que elas também podem ser úteis para diferenciar o estado de TO em relação a outros transplantados renais. Um exemplo disso é a proteína *Myeloid cell nuclear differentiation antigen*, expressa principalmente por células mielóides (Briggs, *et AL.* 1994). Recentemente, foi descrito que esta proteína tem um papel importante na resposta imune em indivíduos com sepse, induzindo apoptose de neutrófilos quando expressa em altos níveis no citoplasma dessas células (Fotouhi-Ardakani *et al.*, 2010). De fato, nossos resultados mostram um maior número de proteínas exclusivas nos grupos TO e SA relacionadas com morte celular em relação aos grupos RC e EST. Esses dados nos levam a pensar que essa proteína pode ter um papel na regulação da resposta imune. Além disso, observamos que a maioria das proteínas compartilhadas somente entre os grupos TO e SA foram classificadas como envolvidas em processos metabólicos. Isso pode ser visto como um diferencial entre o grupo TO e os

demais grupos transplantados renais.

A nossa abordagem quanto à análise de peptídeos urinários e suas proteínas correspondentes permitiu discriminar cada grupo do estudo por um conjunto de proteínas, que foram exclusivas em cada grupo. De modo geral, as proteínas exclusivas de cada grupo apresentaram um perfil diferencial em relação aos diferentes compartimentos celulares. Por exemplo, no grupo de indivíduos saudáveis, as proteínas exclusivas foram principalmente de metabolismo celular, sugerindo que o compartimento urinário na homeostase se diferencia do transplante nos processos metabólicos. Nos grupos RC e EST, observamos um número maior de proteínas associadas com ciclo celular, síntese de proteínas e com a replicação, recombinação e reparação de DNA. Além disso, o grupo RC apresentou mais proteínas relacionadas à proliferação celular. Em contraste, os grupos RC e EST tiveram menos proteínas de morte celular. Conjuntamente, com esses dados, podemos sugerir sugerem que os indivíduos dos grupos RC e EST podem estar em processo de resposta celular e ou reparo tecidual. Por fim, no grupo TO destacamos proteínas relacionadas à quimiotaxia, como a CCL24, discutido anteriormente.

Apesar de termos encontrado um perfil diferencial de proteínas exclusivas de cada grupo, elas não foram detectadas em todos os indivíduos daquele grupo, indicando haver uma variabilidade individual mesmo dentro do conjunto de proteínas que discriminam aquele grupo. No grupo TO, dentre as proteínas identificadas exclusivamente nesse grupo de estudo, encontramos apenas 3 proteínas que foram compartilhadas entre 2

indivíduos tolerantes, envolvidas na sinalização (*Rho-associated protein kinase 2*), mitose (*Kinetochore-associated protein KNL-2 homolog*) e transporte celular (*Lebercilin*). Se essas proteínas estiverem relacionadas aos mecanismos envolvidos na TO, podemos interpretar que esses achados refletem os diferentes caminhos deste estado de tolerância.

No entanto, consideramos importante enfatizar que apesar da variabilidade individual, foi possível identificar um grupo de proteínas que discriminam o grupo de TO e os outros grupos de estudo. Considerando que alguns indivíduos dentro do grupo TO tiveram as mesmas proteínas exclusivas, podemos propor um painel de proteínas da urina, como “assinatura molecular urinária” do estado de tolerância operacional, assim como “assinaturas” semelhantes para os outros grupos. Para o grupo TO, com um painel de 10 proteínas das 87 exclusivas deste grupo, cobrimos todos os indivíduos deste grupo, com sensibilidade e especificidade de 100%. Deste modo, podemos levantar como discussão que este painel, assim como outros painéis derivados das 87 proteínas exclusivas, ou ainda com uma combinação de algumas proteínas compartilhadas pelos saudáveis, possam ser futuramente testados para especificidade e sensibilidade em novos estudos com maior tamanho amostral. Vale lembrar que nossos dados foram baseados em uma análise qualitativa, sendo necessária, futuramente, também uma análise quantitativa das proteínas relevantes.

Considerando a complexidade da amostra biológica e dos dados gerados neste tipo de análise, também consideramos importante apontar

futuras análises que poderão permitir maior aproveitamento das informações contidas nesses resultados, como a análise das sequências de peptídeos e verificar se as proteínas identificadas através dos peptídeos urinários têm relação com outras patologias.

6. Conclusões

1. A análise da fração peptídica da urina, pela abordagem proteômica de *shotgun*, permitiu a identificação de diversas proteínas correspondentes aos peptídeos e sequências de peptídeos idênticas àquelas depositadas em bancos de dados, descritas como presentes na urina. Identificamos, também, um perfil diferencial de proteínas no grupo de tolerância operacional e em cada grupo do estudo. Isto indica que esta abordagem proteômica foi válida para os nossos objetivos e poderá ser refinada para futuros estudos em outros contextos patológicos.
2. A identificação de proteínas exclusivas de cada grupo do estudo indica que nas diferentes evoluções clínicas no transplante, assim como na condição fisiológica, proteínas diferentes têm acesso ao compartimento urinário peptídico e podem ter relação funcional com o estado de homeostase e com os diferentes estados imunológicos no transplante renal humano.

3. Apesar de peptídeos de proteínas relacionadas ao sistema imune terem sido pouco encontrados na urina (por volta de 3% das proteínas identificadas), observamos um perfil diferencial dessas proteínas nos diferentes grupos do estudo. Isto indica que componentes da resposta imune também fazem parte do compartimento peptídico urinário e que essas proteínas e seus peptídeos podem ter papel nos mecanismos imunológicos operantes.
4. O grupo de tolerância operacional (TO) apresentou um repertório de peptídeos urinários correspondentes a 87 proteínas exclusivas deste estado imunológico, indicando que o estado de TO tenha uma “assinatura molecular” no compartimento urinário.
5. Apesar de termos identificado perfis diferenciais em todos os grupos do estudo, observamos também variabilidade individual dentro de cada grupo, não sendo possível identificar uma única proteína exclusiva do grupo e presente em todos os indivíduos do grupo. Esses achados são compatíveis com a diversidade e a dinâmica de mecanismos descritos para rejeição e para tolerância. Interpretamos que esta variabilidade do compartimento urinário – mesmo dentro das proteínas exclusivas - reflita os diferentes mecanismos operantes, imunológicos e de outra natureza, nos diferentes indivíduos, naquele momento do estudo.

6. Considerando as proteínas exclusivas do grupo de tolerância operacional (TO), propomos a elaboração de um painel contendo 10 dessas proteínas - incluindo as três proteínas cujos peptídeos foram encontrados em mais de 1 indivíduo - para ser testado para “assinatura molecular urinária” do estado de TO. Este painel que tem sensibilidade e especificidade de 100%, neste estudo, uma vez que cada indivíduo TO apresenta pelo menos uma de suas proteínas, deverá ser testado em novos estudos com maior tamanho amostral.

ANEXOS

ANEXO A

Termo de consentimento livre esclarecido e
aprovação do projeto pelo comitê de ética.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE CEP:

TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DOCUMENTO IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO: .../.../....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE: CEP: TELEFONE:

DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Estudo do Perfil imunológico transcricional em pacientes transplantes com tolerância operacional. Este projeto faz parte do projeto multicêntrico: Estudo do perfil imunológico regulador em pacientes com longo tempo de transplante de órgãos sólidos, em estado de *tolerância operacional*: bases para novas estratégias terapêuticas imunomoduladoras na clínica.**

PESQUISADOR: Verônica Coelho (coordenadora e gerente do projeto)

CARGO/FUNÇÃO: Médica Pesquisadora do Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração - Professora Colaboradora da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das

Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 45907

.....

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO **RISCO MÍNIMO X** RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa ;

Neste projeto de pesquisa, estudaremos algumas diferenças no comportamento imunológico entre as pessoas que foram transplantadas e que, com o tempo, ficaram muito bem (com seu órgão transplantado funcionando bem), e aquelas que não evoluíram tão bem e rejeitaram o enxerto, desenvolvendo rejeição crônica. Em todo mundo, médicos e pesquisadores que trabalham com transplante estão estudando para tentar compreender as diferenças nesses dois tipos de situação. Algumas pessoas que foram transplantadas conseguem chegar a um melhor equilíbrio, precisando de apenas pequenas doses de drogas imunossupressoras, que são os remédios que previnem a rejeição. Quase todos os pacientes que param de tomar as os remédios imunossupressores perdem o órgão transplantado rapidamente, porém, existem alguns casos raros de pessoas que precisaram suspender todas os remédios imunossupressores e que não perderam o enxerto. Nós acreditamos que se conseguirmos compreender melhor essas diferenças, e saber como as pessoas transplantadas que estão bem chegaram a este estado de equilíbrio, nós possamos usar este conhecimento em benefício de novos pacientes. Poderemos usar os novos conhecimentos para identificar melhor (diagnosticar) o estado de equilíbrio no transplante e, desta forma, oferecer outras opções para diminuir os remédios para rejeição de quem não precisa de tanto, e também para criar novos tratamentos para a rejeição no futuro, que possam ajudar ao organismo da pessoa transplantada a desenvolver o estado de melhor equilíbrio. Desta forma, esperamos que os conhecimentos conseguidos nessa pesquisa possam ajudar pacientes no futuro. Este projeto de pesquisa conta com a participação de vários centros de transplante no Brasil (estudo multicêntrico) e estudaremos pacientes de transplante de rim, de coração e de fígado. Também teremos um grupo de indivíduos sadios, não transplantados, como um grupo comparativo dos padrões imunológicos.

2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais;

Os nossos estudos serão feitos utilizando um pouco de sua urina e de seu sangue que será colhido de uma veia do seu braço. Usaremos a sua urina para analisar proteínas e o seu sangue para obter umas células chamadas linfócitos e também soro, e com esse material faremos nossos estudos, analisando anticorpos e substâncias produzidas pelas células. Também, se o seu médico, em algum momento, achar necessário fazer uma biópsia do seu órgão transplantado para orientá-lo no seu tratamento (não por causa da pesquisa) poderemos utilizar um fragmento do material retirado do enxerto para fazer a pesquisa. Mas, a biópsia não será realizada por causa da pesquisa. Caso aceite participar deste

estudo, você deverá assinar este documento concordando que seja colhido o seu sangue para este propósito, de acordo com o seguinte roteiro:

- Coleta de 20 ml de urina estéril.
- Coleta de 65 ml de sangue a ser feita de uma veia do seu braço, a cada 4 meses (3 coletas) e, mais uma (01) coleta se, em algum momento do estudo, você tiver rejeição ou infecção. A coleta seqüencial programada será previamente agendada no momento do seu ingresso na pesquisa.

3. desconfortos e riscos esperados;

O desconforto será de uma picada da agulha para a retirada do sangue. É importante ressaltar que o você não é obrigado a participar desta pesquisa e que, se não quiser participar, nada afetará o seu tratamento e acompanhamento neste hospital.

4. benefícios que poderão ser obtidos;

É importante dizer que esta pesquisa não prevê qualquer benefício direto para o seu tratamento mas, poderá ajudar outros pacientes no futuro.

5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Não se aplica.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas. Os riscos desta pesquisa para o Sr ou Sra são mínimos, e estão relacionados à coleta de sangue. A coleta de sangue será semelhante à coleta de exames, feita habitualmente pelo paciente no laboratório, para os exames de rotina. O local da picada no seu braço pode ficar roxo no após a punção, chamado hematoma, que desaparece com o passar dos dias. A coleta do sangue necessária para a pesquisa vai sempre ser acompanhada pelo exame de hemograma e não será colhido sangue do paciente que estiver com anemia que contra indique a retirada de sangue. O pesquisador se responsabiliza por esclarecer os riscos e benefícios relacionados a esta pesquisa e quaisquer outras dúvidas que o paciente tenha sobre a pesquisa.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. O sujeito de pesquisa está livre para retirar o seu consentimento a qualquer momento e desistir de participar desta

pesquisa. O fato de não querer participar desta pesquisa não vai trazer nenhum prejuízo para o seu tratamento. O paciente vai receber todos os tratamentos disponíveis e necessários para o seu caso.

3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. Todas informações obtidas dos pacientes serão confidenciais e sigilosas durante toda a pesquisa e no momento em que esta pesquisa for publicada nas revistas da área de saúde.

4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa. Se ocorrer algum dano causado por esta pesquisa o paciente terá toda assistência a sua saúde no hospital onde é acompanhado (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP).

5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa. Este estudo prevê apenas riscos mínimos para o paciente, sem risco de dano à saúde do paciente. Não existe remuneração ou indenização ao paciente que aceitar participar deste estudo.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

1. Coordenação do projeto

- Verônica Coelho - Laboratório de Imunologia – Instituto do Coração – Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 – 9º andar – bloco 2 -- cep: 05403-010 - fones: 3069-905 ou 3069 5180.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, _____ de _____ de 20____.

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador coordenador
(carimbo ou nome Legível)

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10/09/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0475/08**, intitulado: **"ESTUDO DO PERFIL PROTEÔMICO URINÁRIO EM INDIVÍDUOS COM "TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA OPERACIONAL" NO TRANSPLANTE RENAL HUMANO"** apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Dra. Verônica Porto ⁰Carreiro de Vasconcellos Coelho

Pesquisador (a) Executante: **Maisa Carla Silveira Takenaka**

CAPPesq, 11 de Setembro de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO

12/09/08
Heberta

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

ANEXO B

Descrição das proteínas identificadas
exclusivamente em cada grupo de estudo

Tabela 17. Relação de proteínas identificadas exclusivamente nos indivíduos do grupo RC

Nome de Entrada	Proteínas Identificadas exclusivamente no grupo RC	Localização Celular	Processo Biológico	Indivíduos do grupo RC							
				RCA13	RCA26	RCC01	RCC04	RCC06	RCC24	RCC32	RCC67
5NT3L_HUMAN	Cytosolic 5'-nucleotidase III-like protein	Citoplasma	Processo metabólico								
A20A4_HUMAN	Ankyrin repeat domain-containing protein 20A4	NC	NC								
ACYP2_HUMAN	Acylphosphatase-2	NC	Processo metabólico								
AMRP_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein	Membrana	Proliferação celular, dobramento de proteínas, transporte mediado por vesículas, processo metabólico, regulação negativa da ligação com proteínas								
AN20B_HUMAN	Ankyrin repeat domain-containing protein 20B	NC	NC								
ANR32_HUMAN	Ankyrin repeat domain-containing protein 32	NC	NC								
ARI4A_HUMAN	AT-rich interactive domain-containing protein 4A	Núcleo	Regulação da transcrição								
ATD3A_HUMAN	ATPase family AAA domain-containing protein 3A	NC	NC								
ATD3B_HUMAN	ATPase family AAA domain-containing protein 3B	NC	NC								
B2MG_HUMAN	Beta-2-microglobulin	Secretada	Resposta Imune								
BAP31_HUMAN	B-cell receptor-associated protein 31	Citoplasma	Apoptose, resposta imune, transporte mediado por vesículas								
BHA15_HUMAN	Class A basic helix-loop-helix protein 15	Núcleo	Transcrição								

BRE1A_HUMAN	E3 ubiquitin-protein ligase BRE1A	Núcleo	Regulação da transcrição								
C102A_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 102A	NC	NC								
CA113_HUMAN	SH3 domain-containing protein C1orf113	NC	NC								
CAR10_HUMAN	Caspase recruitment domain-containing protein 10	Citoplasma	Apoptose, atividade kinase induzida pela ativação de NF-kappaB								
CB016_HUMAN	Uncharacterized protein C2orf16	NC	NC								
CC121_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 121	NC	NC								
CC124_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 124	NC	NC								
CC137_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 137	NC	NC								
CC14B_HUMAN	Dual specificity protein phosphatase CDC14B	Núcleo	Desfosforilação de proteínas								
CC162_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 162	NC	NC								
CCD40_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 40	NC	NC								
CCD41_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 41	NC	NC								
CCD61_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 61	NC	NC								
CCD67_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 67	NC	NC								
CCD77_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 77	NC	NC								
CD043_HUMAN	UPF0534 protein C4orf43	NC	NC								

CD158_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 158	NC	NC								
CENPJ_HUMAN	Centromere protein J	Citoplasma	Divisão celular								
CENPX_HUMAN	Centromere protein X	Núcleo	NC								
CF203_HUMAN	Uncharacterized protein C6orf203	NC	NC								
CHD1L_HUMAN	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1-like	Núcleo	Reparo ao DNA								
CHD5_HUMAN	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 5	Núcleo	Regulação da transcrição								
CI025_HUMAN	Uncharacterized protein C9orf25	NC	NC								
CI134_HUMAN	Uncharacterized protein C9orf134	Membrana	NC								
CIRBP_HUMAN	Cold-inducible RNA-binding protein (Glycine-rich RNA-binding protein CIRP)	Citoplasma e Núcleo	Resposta ao estresse, regulação positiva na tradução								
CJ068_HUMAN	Uncharacterized protein C10orf68	NC	NC								
CLCB_HUMAN	Clathrin light chain B	Membrana	Transporte mediado por vesículas								
CLSPN_HUMAN	Claspin	Núcleo	Reparo ao DNA, ciclo celular								
CO6A5_HUMAN	Collagen alpha-5(VI) chain	Secretada	Adesão celular								
CP110_HUMAN	Centriolin	Citoplasma	Ciclo celular								
CS066_HUMAN	UPF0515 protein C19orf66	NC	NC								
CT199_HUMAN	Putative uncharacterized protein C20orf199	NC	NC								
CX023_HUMAN	Uncharacterized protein CXorf23	Citoplasma	NC								

CYLC2_HUMAN	Cylicin-2	Citoplasma	Diferenciação celular, espermatogênese								
DCDC1_HUMAN	Doublecortin domain-containing protein 1	NC	Sinalização intracelular								
DLGP5_HUMAN	Disks large-associated protein 5	Citoplasma e Núcleo	Ciclo celular, sinalização celular								
DYH10_HUMAN	Dynein heavy chain 10, axonemal	Citoplasma	Movimento baseado em microtúbulos								
EPHB4_HUMAN	Ephrin type-B receptor 4	Membrana	Proliferação celular, regulação da angiogênese, fosforilação de proteínas								
ERC2_HUMAN	ERC protein 2	Citoplasma	NC								
EXO1_HUMAN	Exonuclease 1	Núcleo	Reparo ao DNA, meiose, imunidade								
F184B_HUMAN	Protein FAM184B	NC	NC								
FBX16_HUMAN	F-box only protein 16	NC	Processo metabólico								
FCF1_HUMAN	rRNA-processing protein FCF1 homolog	Núcleo	Processamento do rRNA								
FHL1_HUMAN	Four and a half LIM domains protein 1	Citoplasma e Núcleo	Diferenciação celular, crescimento celular								
FLIP1_HUMAN	Filamin-A-interacting protein 1	NC	NC								
GALT3_HUMAN	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3	Citoplasma	Processo metabólico								
GEM_HUMAN	GTP-binding protein GEM	Membrana	Resposta imune, sinalização celular via receptor de membrana								
GSTO1_HUMAN	Glutathione S-transferase omega-1	Citoplasma	NC								

H1X_HUMAN	Histone H1x	Núcleo	Formação do nucleossoma								
H4_HUMAN	Histone H4	Núcleo	Formação do nucleossoma, regulação negativa da diferenciação dos megacariócitos								
HECD1_HUMAN	E3 ubiquitin-protein ligase HECTD1	NC	Ubiquitinação de proteínas								
HILS1_HUMAN	Spermatid-specific linker histone H1-like protein	Núcleo	Espermatogênese, regulação da transcrição								
HIPL2_HUMAN	HHIP-like protein 2	Secretada	NC								
HMN2L_HUMAN	Putative non-histone chromosomal protein HMG-17-like	Núcleo	NC								
HP1B3_HUMAN	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	Núcleo	Formação do nucleossoma								
HXB7_HUMAN	Homeobox protein Hox-B7	Núcleo	Regulação da transcrição								
ISK5_HUMAN	Serine protease inhibitor Kazal-type 5	Secretada	Diferenciação de células epiteliais, regulação negativa da angiogênese, regulação negativa da resposta imune, regulação da diferenciação dos linfócitos T								
JKIP3_HUMAN	Janus kinase and microtubule-interacting protein 3	Citoplasma	NC								
K0802_HUMAN	Uncharacterized protein KIAA0802	NC	NC								
K1704_HUMAN	Uncharacterized protein KIAA1704	NC	NC								
KC1A_HUMAN	Casein kinase I isoform alpha	Citoplasma	Ciclo celular, mitose								

KI18A_HUMAN	Kinesin-like protein KIF18A	Núcleo	Transporte de proteínas								
KI67_HUMAN	Antigen KI-67	Núcleo	Proliferação celular								
KIF1A_HUMAN	Kinesin-like protein KIF1A	NC	Movimento baseado em microtúbulos								
KLH24_HUMAN	Kelch-like protein 24	Citoplasma	NC								
KRCC1_HUMAN	Lysine-rich coiled-coil protein 1	NC	NC								
LC7L2_HUMAN	Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	NC	NC								
LCA5L_HUMAN	Lebercilin-like protein	NC	NC								
LMOD1_HUMAN	Leiomodin-1	Citoplasma	Contração muscular								
LUC7L_HUMAN	Putative RNA-binding protein Luc7-like 1	NC	NC								
MA7D3_HUMAN	MAP7 domain-containing protein 3	NC	NC								
MAP9_HUMAN	Microtubule-associated protein 9	Citoplasma	Divisão celular, mitose								
MD1L1_HUMAN	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD1	Núcleo	Divisão celular								
MINT_HUMAN	Msx2-interacting protein	Núcleo	Interação vírus - hospedeiro, regulação da transcrição								
MPPA_HUMAN	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha	Citoplasma	Proteólise								
MYO5A_HUMAN	Myosin-Va	NC	Movimento baseado nos filamentos de actina								
NARGL_HUMAN	NMDA receptor-regulated 1-like protein	NC	Regulação da transcrição								
NP1L3_HUMAN	Nucleosome assembly protein 1-like 3	Núcleo	Formação do nucleossoma								
NUF2_HUMAN	Kinetochore protein Nuf2	Núcleo	Divisão celular, mitose								

ODFP2_HUMAN	Outer dense fiber protein 2	Citoplasma	Diferenciação celular, espermatogênese							
PCNT_HUMAN	Pericentrin	Citoplasma	Formação dos cílios							
PCP4_HUMAN	Purkinje cell protein 4	NC	Desenvolvimento do sistema nervoso							
PDCD7_HUMAN	Programmed cell death protein 7	Núcleo	Apoptose, transcrição, resposta ao estímulo de glicocorticóides							
PEPL_HUMAN	Periplakin	Citoplasma	Queratinização							
PLCB4_HUMAN	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-4	NC	Processo metabólico, sinalização intracelular							
PRP8_HUMAN	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	Núcleo	Regulação da transcrição							
PSMD8_HUMAN	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	NC	Partícula reguladora do proteossoma							
RALB_HUMAN	Ras-related protein Ral-B	Membrana	Apoptose, ciclo celular							
RBGP1_HUMAN	Rab GTPase-activating protein 1	Citoplasma	Ciclo celular, regulação da atividade de Rab GTPase							
RBTN2_HUMAN	Rhombotin-2	Núcleo	NC							
REC15_HUMAN	HERV-K_3q21.2 provirus Rec protein	Citoplasma e Núcleo	Transporte de mRNA							
RHGXX_HUMAN	Putative Rho GTPase-activating protein FLJ46335	NC	Transdução de sinais							
RL13_HUMAN	60S ribosomal protein L13	NC	Tradução de proteínas							
RL17_HUMAN	60S ribosomal protein L17	NC	Tradução de proteínas							
RL27A_HUMAN	60S ribosomal protein L27a	NC	Tradução de proteínas							
RL35_HUMAN	60S ribosomal protein L35	NC	Tradução de proteínas							

RL36A_HUMAN	60S ribosomal protein L36a	Citoplasma	Tradução de proteínas								
RL36L_HUMAN	60S ribosomal protein L36a-like	Citoplasma	Tradução de proteínas								
RL4_HUMAN	60S ribosomal protein L4	NC	Tradução de proteínas								
RL7A_HUMAN	60S ribosomal protein L7a	NC	Tradução de proteínas								
RMTL1_HUMAN	RNA methyltransferase-like protein 1	NC	Transcrição								
RN169_HUMAN	RING finger protein 169	NC	NC								
RPF2_HUMAN	Ribosome production factor 2 homolog	Núcleo	NC								
RS11_HUMAN	40S ribosomal protein S11	NC	Tradução de proteínas								
RS18_HUMAN	40S ribosomal protein S18	Citoplasma	Tradução de proteínas								
RSF1_HUMAN	Remodeling and spacing factor 1	Núcleo	Regulação da transcrição								
SEP11_HUMAN	Septin-11	Citoplasma	Ciclo celular								
SETD8_HUMAN	Histone-lysine N-methyltransferase SETD8	Núcleo	Divisão celular, regulação da transcrição								
SFR11_HUMAN	Splicing factor, arginine/serine-rich 11	Núcleo	Regulação da transcrição								
SFRS2_HUMAN	Splicing factor, arginine/serine-rich 2	Núcleo	Regulação da transcrição								
SLIP_HUMAN	GTPase SLIP-GC	Núcleo	NC								
SMC2_HUMAN	Structural maintenance of chromosomes protein 2	Citoplasma e Núcleo	Divisão celular								
SMC6_HUMAN	Structural maintenance of chromosomes protein 6	Núcleo	Reparo ao DNA								
SP16H_HUMAN	FACT complex subunit SPT16	Núcleo	Reparo ao DNA, regulação da transcrição								
SPAG7_HUMAN	Sperm-associated antigen 7	Núcleo	NC								

SR140_HUMAN	U2-associated protein SR140	NC	Transcrição								
STAR_HUMAN	Steroidogenic acute regulatory protein, mitochondrial	Citoplasma	Processo metabólico, transporte de lipídeos								
STP1_HUMAN	Spermatid nuclear transition protein 1	Núcleo	Diferenciação celular, espermatogênese								
STX11_HUMAN	Syntaxin-11	Membrana e Citoplasma	Transporte intracelular de proteínas, transporte mediado por vesículas								
SYTL3_HUMAN	Synaptotagmin-like protein 3	Membrana	Transporte intracelular de proteínas								
TAOK1_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase TAO1	Citoplasma	Fosforilação de proteínas								
TAOK3_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase TAO3	Membrana e Citoplasma	Regulação negativa da cascata JNK, autofosforilação de proteínas								
TCRG1_HUMAN	Transcription elongation regulator 1	Núcleo	Regulação da transcrição								
TIGD1_HUMAN	Tigger transposable element-derived protein 1	Núcleo	Regulação da transcrição								
TNNT3_HUMAN	Troponin T, fast skeletal muscle	NC	Regulação da atividade ATPase, regulação da contração do coração, resposta para íon cálcio, ligante de troponina I e troponina C								
TPM4_HUMAN	Tropomyosin alpha-4 chain	Citoplasma	Contração muscular, resposta ao estresse oxidativo								
TR43C_HUMAN	Putative tripartite motif-containing protein 43C	NC	NC								

TRI13_HUMAN	Tripartite motif-containing protein 13	NC	Regulação positiva da cascata I-kappaB kinase/NF-kappaB							
TTC9A_HUMAN	Tetratricopeptide repeat protein 9A	NC	Dobramento de proteínas							
TUT4_HUMAN	Terminal uridylyltransferase 4	Citoplasma e Núcleo	Regulação da transcrição, manutenção das células tronco							
TXIP1_HUMAN	Translin-associated factor X-interacting protein 1	Citoplasma	Diferenciação celular, espermatogênese, desenvolvimento multicelular							
TXLNB_HUMAN	Beta-taxilin	NC	NC							
U1SBP_HUMAN	U11/U12 small nuclear ribonucleoprotein 35 kDa protein	Núcleo	Regulação da transcrição							
U2AFL_HUMAN	U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor 35 kDa subunit-related protein 1	Núcleo	NC							
U2AFM_HUMAN	U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor 35 kDa subunit-related protein 2	Núcleo	Transcrição							
USH1G_HUMAN	Usher syndrome type-1G protein	NC	Manutenção de células fotoreceptoras, resposta a estímulos, percepção sensorial							
VIME_HUMAN	Vimentin	NC	Movimentação celular, interação vírus - hospedeiro							
WDR46_HUMAN	WD repeat-containing protein 46	NC	NC							

WDR60_HUMAN	WD repeat-containing protein 60	NC	NC								
YG044_HUMAN	Uncharacterized protein LOC389493	NC	NC								
YS003_HUMAN	Uncharacterized protein LOC113230	NC	NC								
Z518B_HUMAN	Zinc finger protein 518B	Núcleo	Regulação da transcrição								
ZBT11_HUMAN	Zinc finger and BTB domain-containing protein 11	Núcleo	Regulação da transcrição								
ZFP28_HUMAN	Zinc finger protein 28 homolog	Núcleo	Regulação da transcrição								
ZN519_HUMAN	Zinc finger protein 519	Núcleo	Regulação da transcrição								
ZN540_HUMAN	Zinc finger protein 540	Núcleo	Regulação da transcrição								
ZN555_HUMAN	Zinc finger protein 555	Núcleo	Regulação da transcrição								
ZN563_HUMAN	Zinc finger protein 563	Núcleo	Regulação da transcrição								
ZN682_HUMAN	Zinc finger protein 682	Núcleo	Regulação da transcrição								
ZN714_HUMAN	Zinc finger protein 714	Núcleo	Regulação da transcrição								
ZN727_HUMAN	Putative zinc finger protein 727	Núcleo	Regulação da transcrição								
ZN791_HUMAN	Zinc finger protein 791	Núcleo	Regulação da transcrição								
ZN845_HUMAN	Zinc finger protein 845	Núcleo	Regulação da transcrição								
ZN14_HUMAN	Zinc finger protein 14	Núcleo	Regulação da transcrição								
ZN98_HUMAN	Zinc finger protein 98	Núcleo	Regulação da transcrição								
ZRAB2_HUMAN	Zinc finger Ran-binding domain-containing protein 2	Núcleo	Regulação da transcrição								

Tabela 18. Relação de proteínas identificadas exclusivamente nos indivíduos do grupo TO

Nome de Entrada	Nomes das Proteínas Exclusivas do Grupo TO	Localização Celular	Processo Biológico	Indivíduos do Grupo TO				
				TO03	TO08	TO10	TO16	TO62
CKAP2_HUMAN	Cytoskeleton-associated protein 2 (Tumor- and microtubule-associated protein)	Citoplasma	Apoptose, ciclo celular					
CLAP1_HUMAN	CLIP-associating protein 1	Citoplasma	Divisão celular					
EEA1_HUMAN	Early endosome antigen 1 (Endosome-associated protein p162)	Citoplasma	Transporte de endossoma					
GCC2_HUMAN	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2 (Golgi coiled-coil protein GCC185) (Renal carcinoma antigen NY-REN-53)	Citoplasma	NC					
LCA5_HUMAN	Lebercilin (Leber congenital amaurosis 5 protein)	Citoplasma	Transporte de proteínas					
MYH4_HUMAN	Myosin-4 (Myosin heavy chain 4) (Myosin heavy chain, skeletal muscle, fetal)	Citoplasma	Contração muscular					
MYH6_HUMAN	Myosin-6 (Myosin heavy chain 6) (Myosin heavy chain, cardiac muscle alpha isoform)	Citoplasma	Contração muscular, desenvolvimento da fibra muscular cardíaca, regulação da pressão sanguínea					

RAB21_HUMAN	Ras-related protein Rab-21	Citoplasma	Transporte de proteínas					
ROCK2_HUMAN	Rho-associated protein kinase 2 (Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 2)	Citoplasma	Sinalização intracelular					
SCAPE_HUMAN	S phase cyclin A-associated protein in the endoplasmic reticulum (S phase cyclin A-associated protein in the ER)	Citoplasma	NC					
TEC_HUMAN	Tyrosine-protein kinase Tec	Citoplasma	Fosforilação de proteínas, cascata da proteína kinase					
TRIO_HUMAN	Triple functional domain protein (PTPRF-interacting protein)	Citoplasma	Indução de apoptose por sinais extracelulares, fosforilação de proteínas					
FKBP5_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5 (FK506-binding protein 5) (HSP90-binding immunophilin)	Citoplasma e Núcleo	Dobramento de proteínas, ligante de FK506, ligante das proteínas de choque térmico					
HMG1_HUMAN	Non-histone chromosomal protein HMG-14 (High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 1)	Citoplasma e Núcleo	NC					
KIN17_HUMAN	DNA/RNA-binding protein KIN17 (KIN, antigenic determinant of recA protein homolog)	Citoplasma e Núcleo	Reparo ao DNA, transcrição					

QN1_HUMAN	Protein QN1 homolog	Citoplasma e Núcleo	Divisão celular, mitose					
REC17_HUMAN	HERV-K_11q22.1 provirus Rec protein	Citoplasma e Núcleo	Transporte de mRNA					
RNPS1_HUMAN	RNA-binding protein with serine-rich domain 1 (SR-related protein LDC2)	Citoplasma e Núcleo	Transcrição					
TSG10_HUMAN	Testis-specific gene 10 protein (Testis development protein NYD-SP7)	Citoplasma e Núcleo	Espermatogênese					
XAF1_HUMAN	XIAP-associated factor 1 (BIRC4-binding protein)	Citoplasma e Núcleo	Apoptose					
D19P1_HUMAN	Protein dpy-19 homolog 2-like 1 (Dpy-19-like protein 2 pseudogene 1)	Membrana	NC					
BOD1L_HUMAN	Biorientation of chromosomes in cell division protein 1-like	NC	NC					
CB070_HUMAN	UPF0573 protein C2orf70	NC	NC					

CC112_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 112 (Mutated in bladder cancer protein 1)	NC	NC				
CC147_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 147	NC	NC				
CC150_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 150	NC	NC				
CCD38_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 38	NC	NC				
CCD66_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 66	NC	NC				
CG055_HUMAN	UPF0562 protein C7orf55	NC	NC				
CHCH6_HUMAN	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 6	NC	NC				
CI163_HUMAN	Uncharacterized protein C9orf163	NC	NC				

CJ120_HUMAN	Uncharacterized protein C10orf120	NC	NC					
CR034_HUMAN	Uncharacterized protein C18orf34	NC	NC					
CROL2_HUMAN	Ciliary rootlet coiled-coil protein-like 2 protein	NC	NC					
CSAG2_HUMAN	Chondrosarcoma-associated gene 2/3 protein (Cancer/testis antigen 24.2)	NC	Resposta à drogas					
CX056_HUMAN	UPF0428 protein CXorf56	NC	NC					
DJC21_HUMAN	DnaJ homolog subfamily C member 21 (DnaJ homolog subfamily A member 5)	NC	Dobramento de proteínas, ligante das proteínas de choque térmico					
F74A4_HUMAN	Protein FAM74A4	NC	NC					
GG6LB_HUMAN	Putative golgin subfamily A member 6-like protein 11	NC	NC					
IFT81_HUMAN	Intraflagellar transport protein 81 homolog	NC	Diferenciação celular, espermatogênese					

IQCB1_HUMAN	IQ calmodulin-binding motif-containing protein 1 (Nephrocystin-5)	NC	manutenção da identidade dos órgãos e de células fotoreceptoras					
K2C4_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 4 (Cytokeratin-4)(Keratin-4)	NC	Diferenciação de células epiteliais, regulação negativa de proliferação de células epiteliais					
LAR4B_HUMAN	La-related protein 4B (La ribonucleoprotein domain family member 4B)	NC	NC					
LRRC9_HUMAN	Leucine-rich repeat-containing protein 9	NC	NC					
MA7D2_HUMAN	MAP7 domain-containing protein 2	NC	NC					
MAGBI_HUMAN	Melanoma-associated antigen B18 (MAGE-B18 antigen)	NC	NC					
MYH10_HUMAN	Myosin-10 (Myosin heavy chain 10) (Myosin heavy chain, non-muscle IIb)	NC	Movimento baseado nos filamentos de actina					
RBMX2_HUMAN	RNA-binding motif protein, X-linked 2	NC	NC					

RL18A_HUMAN	60S ribosomal protein L18a	NC	Tradução de proteínas					
RL35A_HUMAN	60S ribosomal protein L35a (Cell growth-inhibiting gene 33 protein)	NC	Processamento do rRNA, tradução de proteínas					
SMYD2_HUMAN	SET and MYND domain-containing protein 2 (HSKM-B) (Lysine N-methyltransferase 3C)	NC	NC					
TEX12_HUMAN	Testis-expressed sequence 12 protein	NC	NC					
U634C_HUMAN	UPF0634 protein C (Protein immunoreactive with anti-PTH polyclonal antibodies)	NC	Processo metabólico					
YO007_HUMAN	Putative uncharacterized protein DKFZp434L187	NC	NC					
APTX_HUMAN	Aprataxin (Forkhead-associated domain histidine triad-like protein)	Núcleo	Reparo ao DNA, morte celular					
CP088_HUMAN	Protein C16orf88 (Testis-specific gene 118 protein)	Núcleo	NC					
DHX16_HUMAN	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX16 (ATP-dependent RNA helicase #3)	Núcleo	Transcrição					

EID2_HUMAN	EP300-interacting inhibitor of differentiation 2 (EID-2) (EID-1-like inhibitor of differentiation 2)	Núcleo	Diferenciação celular, regulação da transcrição					
HMGB3_HUMAN	High mobility group protein B3 (High mobility group protein 4)	Núcleo	Desenvolvimento multicelular					
JARD2_HUMAN	Protein Jumonji (Jumonji/ARID domain-containing protein 2)	Núcleo	Transcrição, diferenciação de células tronco					
KNL2_HUMAN	Kinetochore-associated protein KNL-2 homolog (HsKNL-2) (Mis18-binding protein 1) (P243)	Núcleo	Divisão celular, mitose					
LEMD2_HUMAN	LEM domain-containing protein 2 (hLEM2)	Núcleo	NC					
MAD1_HUMAN	Max dimerization protein 1 (Max dimerizer 1) (Protein MAD)	Núcleo	Proliferação celular, regulação da transcrição					
NOL7_HUMAN	Nucleolar protein 7 (Nucleolar protein of 27 kDa)	Núcleo	NC					
NOP16_HUMAN	Nucleolar protein 16 (HBV pre-S2 trans-regulated protein 3)	Núcleo	NC					
NP1L3_HUMAN	Nucleosome assembly protein 1-like 3	Núcleo	Formação do nucleossoma					

PRP16_HUMAN	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16 (ATP-dependent RNA helicase DHX38)	Núcleo	Regulação da transcrição					
RAD50_HUMAN	DNA repair protein RAD50 (hRAD50)	Núcleo	Ciclo celular, meiose, reparo ao DNA					
RBM6_HUMAN	RNA-binding protein 6 (RNA-binding motif protein 6)	Núcleo	Transcrição					
RRP1_HUMAN	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog A (RRP1-like protein) (NNP-1)	Núcleo	Processamento de rRNA					
RTF1_HUMAN	RNA polymerase-associated protein RTF1 homolog	Núcleo	Regulação da transcrição					
RUXE_HUMAN	Small nuclear ribonucleoprotein E (snRNP-E) (Sm protein E) (Sm-E) (SmE)	Núcleo	Regulação da transcrição					
SAFB1_HUMAN	Scaffold attachment factor B1 (SAF-B1)(HSP27 estrogen response element-TATA box-binding protein)	Núcleo	Regulação da transcrição					
SFRS8_HUMAN	Splicing factor, arginine/serine-rich 8 (Suppressor of white apricot protein homolog)	Núcleo	Regulação da transcrição					
SMCA1_HUMAN	Probable global transcription activator SNF2L1 (ATP-dependent helicase SMARCA1)	Núcleo	Regulação da transcrição, diferenciação de neurônios					

SNPC4_HUMAN	snRNA-activating protein complex subunit 4 (SNAPc subunit 4)	Núcleo	Regulação da transcrição					
T2EB_HUMAN	Transcription initiation factor IIE subunit beta (TFIIE-beta)	Núcleo	Regulação da transcrição					
THOC2_HUMAN	THO complex subunit 2 (Tho2) (hTREX120)	Núcleo	Regulação da transcrição					
UT14A_HUMAN	U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A (Serologically defined colon cancer antigen 16)	Núcleo	Processamento de rRNA					
ZN107_HUMAN	Zinc finger protein 107 (Zinc finger protein 588) (Zinc finger protein ZFD25)	Núcleo	Regulação da transcrição					
ZN273_HUMAN	Zinc finger protein 273 (Zinc finger protein HZF9)	Núcleo	Regulação da transcrição					
ZN493_HUMAN	Zinc finger protein 493	Núcleo	Regulação da transcrição					
ZN766_HUMAN	Zinc finger protein 766	Núcleo	Regulação da transcrição					
CCL24_HUMAN	C-C motif chemokine 24 (Small-inducible cytokine A24) (Eosinophil chemotactic protein 2) (Eotaxin-2)	Secretada	Resposta imune					

EDN1_HUMAN	Endothelin-1 (Preproendothelin-1) (PPET1) [Cleaved into: Endothelin-1 (ET-1); Big endothelin-1]	Secretada	Ativação de leucócitos, regulação positiva da migração da célula endotelial, regulação positiva da mitose					
NPPL1_HUMAN	Nuclear pore complex-interacting protein-like 1	Secretada	NC					
WFDC8_HUMAN	WAP four-disulfide core domain protein 8 (Putative protease inhibitor WAP8)	Secretada	NC					

Tabela 19. Relação de proteínas identificadas exclusivamente nos indivíduos do grupo EST

Nome de Entrada	Nomes das Proteínas Exclusivamente no grupo EST	Localização Celular	Processo Biológico	Indivíduos do Grupo EST				
				EST09	EST11	EST14	EST20	EST22
AKAP9_HUMAN	A-kinase anchor protein 9	Citoplasma	Transporte, transdução de sinais, transmissão sináptica					
APOL5_HUMAN	Apolipoprotein L5	Citoplasma	Processo metabólico, transporte de lípidios					
BAP29_HUMAN	B-cell receptor-associated protein 29	Citoplasma	Apoptose, transporte mediado por vesículas					
CASP_HUMAN	Protein CASP	Citoplasma	Transporte mediado por vesículas no complexo de golgi					
CENPE_HUMAN	Centromere-associated protein E (Kinesin-related protein CENPE)	Citoplasma	Divisão celular					
COR2B_HUMAN	Coronin-2B	Citoplasma	Organização do citoesqueleto					
CYLC1_HUMAN	Cylicin-1 (Cylicin I)	Citoplasma	Diferenciação celular, espermatogênese					
ERRFI_HUMAN	ERBB receptor feedback inhibitor 1 (MIG-6)	Citoplasma	Resposta ao estresse					
MY18A_HUMAN	Myosin-XVIIIa	Citoplasma	Processo metabólico, anti - apoptose					
RB6I2_HUMAN	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1 (ERC-1)	Citoplasma	Transporte de proteínas, regulação da transcrição, fosforilação do I-kappaB, atividade de fator de transcrição na regulação positiva de NF-kappaB, regulação positiva de anti-apoptose					
RL8_HUMAN	60S ribosomal protein L8	Citoplasma	Tradução de proteínas					
RM20_HUMAN	39S ribosomal protein L20, mitochondrial	Citoplasma	NC					
RS9_HUMAN	40S ribosomal protein S9	Citoplasma	Regulação positiva da apoptose, tradução de					

			proteínas					
RT26_HUMAN	28S ribosomal protein S26, mitochondrial	Citoplasma	Reparo ao DNA, processamento de peptídeos					
RT34_HUMAN	28S ribosomal protein S34, mitochondrial	Citoplasma	NC					
SRFB1_HUMAN	Serum response factor-binding protein 1	Citoplasma	Regulação da transcrição					
TCPZ_HUMAN	T-complex protein 1 subunit zeta (TCP-1-zeta)	Citoplasma	Dobramento de proteínas					
TIM16_HUMAN	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim16	Citoplasma	Transporte de proteínas					
TOP1M_HUMAN	DNA topoisomerase I, mitochondrial (TOP1mt)	Citoplasma	Atividade da DNA topoisomerase type I					
CDC6_HUMAN	Cell division control protein 6 homolog	Citoplasma e Núcleo	Ciclo celular, mitose					
DAPK3_HUMAN	Death-associated protein kinase 3	Citoplasma e Núcleo	Apoptose					
IF2B3_HUMAN	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	Citoplasma e Núcleo	Tradução de proteínas					
NEMO_HUMAN	NF-kappa-B essential modulator (NEMO)	Citoplasma e Núcleo	Resposta imune, indução de apoptose, transcrição					
PARG_HUMAN	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase	Citoplasma e Núcleo	Processo metabólico					
PRC1_HUMAN	Protein regulator of cytokinesis 1	Citoplasma e Núcleo	Divisão celular					
SIRT7_HUMAN	NAD-dependent deacetylase sirtuin-7	Citoplasma e Núcleo	Regulação da transcrição, transcrição de rRNA					
TPPP_HUMAN	Tubulin polymerization-promoting protein (TPPP)	Citoplasma e Núcleo	Polimerização dos microtúbulos					
TRIP4_HUMAN	Activating signal cointegrator 1 (ASC-1)	Citoplasma e Núcleo	Regulação da transcrição					

WIBG_HUMAN	Partner of Y14 and mago (Protein wibg homolog)	Citoplasma e Núcleo	Tradução de proteínas					
GP171_HUMAN	Probable G-protein coupled receptor 171	Membrana	Sinalização via receptor acoplado a proteína G					
MELT_HUMAN	Ventricular zone-expressed PH domain-containing protein homolog 1	Membrana	NC					
ALKB7_HUMAN	Alkylated DNA repair protein alkB homolog 7	NC	NC					
CA063_HUMAN	UPF0471 protein C1orf63	NC	NC					
CC049_HUMAN	Putative uncharacterized protein C3orf49	NC	NC					
CCD37_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 37	NC	NC					
CCD93_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 93	NC	NC					
CDR1_HUMAN	Cerebellar degeneration-related antigen 1 (CDR34)	NC	NC					
CF100_HUMAN	Putative uncharacterized protein C6orf100	NC	NC					
CF222_HUMAN	Uncharacterized protein C6orf222	NC	NC					
CJ093_HUMAN	TPR repeat-containing protein C10orf93	NC	NC					
CJ095_HUMAN	Uncharacterized protein C10orf95	NC	NC					
CK088_HUMAN	UPF0722 protein C11orf88	NC	NC					
DHDDS_HUMAN	Dehydrololichyl diphosphate synthase	NC	NC					
DJC30_HUMAN	DnaJ homolog subfamily C member 30	NC	Dobramento de proteínas, ligante das proteínas de choque térmico					
F186B_HUMAN	Protein FAM186B	NC	NC					
F27D1_HUMAN	Protein FAM27D1	NC	NC					
ICT1_HUMAN	Immature colon carcinoma transcript 1 protein	NC	Tradução de proteínas					
IN80E_HUMAN	INO80 complex subunit E	NC	NC					

IQCF2_HUMAN	IQ domain-containing protein F2	NC	NC					
K2012_HUMAN	Uncharacterized protein KIAA2012	NC	NC					
KIF19_HUMAN	Kinesin-like protein KIF19	NC	Movimento baseado em microtúbulos					
KIF3C_HUMAN	Kinesin-like protein KIF3C	NC	Movimento baseado em microtúbulos					
LIX1L_HUMAN	LIX1-like protein	NC	NC					
MB3L2_HUMAN	Methyl-CpG-binding domain protein 3-like 2	NC	NC					
PREX2_HUMAN	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 2 protein	NC	Sinalização via receptor acoplado a proteína G, sinalização intracelular					
RASL1_HUMAN	RasGAP-activating-like protein 1	NC	Sinalização intracelular					
RL28_HUMAN	60S ribosomal protein L28	NC	Tradução de proteínas					
RL31_HUMAN	60S ribosomal protein L31	NC	Tradução de proteínas					
RL32_HUMAN	60S ribosomal protein L32	NC	Tradução de proteínas					
RS15A_HUMAN	40S ribosomal protein S15a	NC	Regulação positiva do ciclo celular, regulação positiva da proliferação celular, resposta à vírus, tradução de proteínas					
SLN14_HUMAN	Schlafen family member 14	NC	NC					
SPDE1_HUMAN	Speedy protein E1	NC	NC					
SURF2_HUMAN	Surfeit locus protein 2 (Surf-2)	NC	NC					
TNNT1_HUMAN	Troponin T, slow skeletal muscle	NC	Contração muscular					
TPD55_HUMAN	Tumor protein D55 (hD55)	NC	NC					
U634A_HUMAN	UPF0634 protein KIAA1641	NC	NC					
U634B_HUMAN	UPF0634 protein B (CLL-associated antigen KW-1)	NC	NC					
UBE2F_HUMAN	NEDD8-conjugating enzyme UBE2F (NEDD8-conjugating enzyme 2)	NC	Processo metabólico					

YJ017_HUMAN	Putative uncharacterized protein LOC439951	NC	NC					
ZN428_HUMAN	Zinc finger protein 428	NC	NC					
C2C4A_HUMAN	C2 calcium-dependent domain-containing protein 4A	Núcleo	NC					
CRBL2_HUMAN	cAMP-responsive element-binding protein-like 2	Núcleo	Ciclo celular, regulação da transcrição					
DD11L_HUMAN	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX11-like protein	Núcleo	Processo metabólico					
DDX11_HUMAN	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX11	Núcleo	Ciclo celular					
DNMT1_HUMAN	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	Núcleo	Regulação da transcrição					
F107A_HUMAN	Protein FAM107A	Núcleo	Regulação do crescimento celular					
FER3L_HUMAN	Fer3-like protein	Núcleo	Regulação da transcrição					
H12_HUMAN	Histone H1.2 (Histone H1d)	Núcleo	Formação do nucleossoma, ligante de DNA					
KDM2B_HUMAN	Lysine-specific demethylase 2B	Núcleo	Regulação da transcrição					
KIF22_HUMAN	Kinesin-like protein KIF22	Núcleo	Reparo ao DNA, mitose, movimento baseado em microtúbulos					
LARP7_HUMAN	La-related protein 7	Núcleo	Processamento do RNA					
LUZP1_HUMAN	Leucine zipper protein 1	Núcleo	NC					
MLL1_HUMAN	Histone-lysine N-methyltransferase MLL	Núcleo	Apoptose, regulação da transcrição					
NMNA1_HUMAN	Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 1	Núcleo	Processo metabólico					
NOP14_HUMAN	Nucleolar protein 14	Núcleo	Síntese do ribossomo, processamento do rRNA					
NOTO_HUMAN	Homeobox protein notochord	Núcleo	Regulação da transcrição					
NPIL2_HUMAN	NPIP-like protein 2	Núcleo	NC					

PR40A_HUMAN	Pre-mRNA-processing factor 40 homolog A (Fas ligand-associated factor 1)	Núcleo	Regulação da transcrição					
RNF12_HUMAN	E3 ubiquitin-protein ligase RLIM	Núcleo	Regulação da transcrição, ubiquitinação de proteínas					
RP9_HUMAN	Retinitis pigmentosa 9 protein	Núcleo	Transcrição, resposta à estímulo, percepção visual					
RRMJ3_HUMAN	Putative rRNA methyltransferase 3	Núcleo	Processamento de rRNA					
SDA1_HUMAN	Protein SDA1 homolog	Núcleo	Transporte de proteínas, síntese de ribossomos					
SEN6_HUMAN	Sentrin-specific protease 6	Núcleo	Processo metabólico					
SMC1B_HUMAN	Structural maintenance of chromosomes protein 1B	Núcleo	Divisão celular, meiose					
SNW1_HUMAN	SNW domain-containing protein 1	Núcleo	Regulação da transcrição					
TIGD7_HUMAN	Tigger transposable element-derived protein 7	Núcleo	Regulação da transcrição					
XPC_HUMAN	DNA repair protein complementing XP-C cells (p125)	Núcleo	Reparo ao DNA					
Z354B_HUMAN	Zinc finger protein 354B	Núcleo	Regulação da transcrição					
ZN101_HUMAN	Zinc finger protein 101 (Zinc finger protein HZF12)	Núcleo	Regulação da transcrição					
ZN197_HUMAN	Zinc finger protein 197	Núcleo	Regulação da transcrição					
ZN425_HUMAN	Zinc finger protein 425	Núcleo	Ligante de DNA, ligante de zinco, regulação da transcrição					
ZN501_HUMAN	Zinc finger protein 501 (Zinc finger protein 52)	Núcleo	Regulação da transcrição					
ZN592_HUMAN	Zinc finger protein 592	Núcleo	Regulação da transcrição					
ZNP12_HUMAN	Zinc finger protein ZnFP12	Núcleo	Regulação da transcrição					
PLIN5_HUMAN	Perilipin-5	Partícula lipídica	NC					

COJA1_HUMAN	Collagen alpha-1(XIX) chain	Secretada	Diferenciação celular, adesão celular					
-------------	-----------------------------	-----------	--	--	--	--	--	--

Tabela 20. Relação de proteínas identificadas exclusivamente nos indivíduos do grupo SA

Nome de Entrada	Nomes das Proteínas Exclusivamente no grupo SA	Localização Celular	Processo Biológico	Indivíduos do grupo SA					
				SA63	SA64	SA65	SA66	SA73	SA74
41_HUMAN	Protein 4.1	Citoplasma e Núcleo	Circulação sanguínea, organização do citoesqueleto, regulação positiva da ligação com proteínas						
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV (Apo-AIV)	Secretada	Processo metabólico, atividade antioxidante, homeostase do colesterol, resposta imune de mucosa, adesão de leucócitos, transporte de colesterol						
AT5EL_HUMAN	ATP synthase subunit epsilon-like protein, mitochondrial	Citoplasma	Síntese de ATP, transporte de íons						
AT7L2_HUMAN	Ataxin-7-like protein 2	NC	NC						
ATS5_HUMAN	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5	Secretada	Proteólise						
BA2L2_HUMAN	Protein BAT2-like 2 (HLA-B-associated transcript 2-like 2)	NC	NC						
CA065_HUMAN	Uncharacterized protein C1orf65	NC	NC						
CA115_HUMAN	Uncharacterized protein C1orf115	Membrana	NC						
CBX2_HUMAN	Chromobox protein homolog 2	Núcleo	Transcrição						
CC138_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 138	NC	NC						
CCD70_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 70	Secretada	NC						

CCDC9_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 9	NC	NC						
CCNL1_HUMAN	Cyclin-L1 (Cyclin-L)	Núcleo	Regulação da transcrição						
CCPG1_HUMAN	Cell cycle progression protein 1	Membrana	Ciclo celular						
CDK8_HUMAN	Cell division protein kinase 8	Núcleo	Regulação da transcrição						
CDK9_HUMAN	Cell division protein kinase 9	Núcleo	Regulação da transcrição, proliferação celular						
CE350_HUMAN	Centrosome-associated protein 350 (Cep350)	Citoplasma e Núcleo	NC						
CFLAR_HUMAN	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator (c-FLIP)	NC	Apoptose, interação vírus - hospedeiro, proteólise						
CHD1_HUMAN	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1	Citoplasma e Núcleo	Regulação da transcrição						
CHSTD_HUMAN	Carbohydrate sulfotransferase 13	Citoplasma	Processo metabólico						
CLPB_HUMAN	Caseinolytic peptidase B protein homolog	NC	Resposta celular ao calor						
CNBP_HUMAN	Cellular nucleic acid-binding protein (CNBP)	Citoplasma	Regulação da transcrição						
CS022_HUMAN	R3H domain-containing protein C19orf22	Núcleo	NC						
CT144_HUMAN	Uncharacterized protein C20orf144	NC	NC						
CWC15_HUMAN	Protein CWC15 homolog	NC	Regulação da transcrição						
DDX27_HUMAN	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX27	Núcleo	NC						
DDX41_HUMAN	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41	Núcleo	Apoptose, transcrição						
DESP_HUMAN	Desmoplakin (DP)	Citoplasma	Diferenciação de queratinócitos, cross-linking de peptídeos						
DJC25_HUMAN	DnaJ homolog subfamily C member 25	Membrana	Ligante das proteínas de choque térmico						
ESCO1_HUMAN	N-acetyltransferase ESCO1	Núcleo	Reparo ao DNA, ciclo celular						

EXOC5_HUMAN	Exocyst complex component 5	Citoplasma	Exocitose, transporte de proteínas, transporte mediado por vesículas						
F133B_HUMAN	Protein FAM133B	NC	NC						
F175A_HUMAN	BRCA1-A complex subunit Abraxas	Núcleo	Reparo ao DNA						
FA32A_HUMAN	Protein FAM32A	NC	NC						
FBX47_HUMAN	F-box only protein 47	NC	Processo metabólico						
FHAD1_HUMAN	Forkhead-associated domain-containing protein 1	NC	NC						
GBG1_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G(T) subunit gamma-T1 (Transducin gamma chain)	Membrana	Sinalização via receptor acoplado a proteína G						
GG6L7_HUMAN	Putative golgin subfamily A member 6-like protein 7	NC	NC						
H14_HUMAN	Histone H1.4 (Histone H1b)	Núcleo	Formação do nucleossoma						
H1T_HUMAN	Histone H1t (Testicular H1 histone)	Núcleo	Diferenciação celular, espermatogênese						
H4G_HUMAN	Histone H4-like protein type G	Núcleo	Formação do nucleossoma						
HM20B_HUMAN	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily E member 1-related transcriptional factor)	Núcleo	Ciclo celular, regulação da transcrição						
HMG5_HUMAN	High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 5	Núcleo	Regulação da transcrição						
HSF2B_HUMAN	Heat shock factor 2-binding protein	NC	Espermatogênese, transcrição						
HXA6_HUMAN	Homeobox protein Hox-A6 (Homeobox protein Hox-1B)	Núcleo	Regulação da transcrição						

IF2P_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 5B	Citoplasma	Tradução de proteínas						
JADE1_HUMAN	Protein Jade-1 (PHD finger protein 17)	Citoplasma e Núcleo	Apoptose, regulação da transcrição, resposta ao estresse						
K0753_HUMAN	Uncharacterized protein KIAA0753	NC	NC						
KAT2A_HUMAN	Histone acetyltransferase KAT2A	Núcleo	Regulação da transcrição						
LEG7_HUMAN	Galectin-7 (Gal-7)	Citoplasma e Núcleo e Secretada	Apoptose						
LIPA2_HUMAN	Liprin-alpha-2	Citoplasma	Adesão de matriz celular						
LONM_HUMAN	Lon protease homolog, mitochondrial	Citoplasma	Processo metabólico, resposta celular ao estresse oxidativo						
LYRM4_HUMAN	LYR motif-containing protein 4	Citoplasma	NC						
MDM1_HUMAN	Nuclear protein MDM1	Núcleo	NC						
MIPT3_HUMAN	TRAF3-interacting protein 1	Citoplasma	NC						
MYH7B_HUMAN	Myosin-7B	Membrana	Contração muscular						
NARG1_HUMAN	NMDA receptor-regulated protein 1	Citoplasma e Núcleo	Angiogênese, diferenciação celular, regulação da transcrição						
NPIL4_HUMAN	Putative NPIP-like protein ENSP00000381263	Membrana	NC						
NSA2_HUMAN	Ribosome biogenesis protein NSA2 homolog (TGF-beta-inducible nuclear protein 1)	Núcleo	Processamento do rRNA						
PHLA2_HUMAN	Pleckstrin homology-like domain family A member 2	Membrana e Citoplasma	Apoptose						
PIN4_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 4	Citoplasma e Núcleo	Dobramento de proteínas, processamento do rRNA						
PNML2_HUMAN	PNMA-like protein 2	NC	NC						

PQBP1_HUMAN	Polyglutamine-binding protein 1 (PQBP-1)	Núcleo	Regulação da transcrição						
PRLD1_HUMAN	PRELI domain-containing protein 1, mitochondrial	Citoplasma	Resposta imune, desenvolvimento multicelular						
RAD54_HUMAN	DNA repair and recombination protein RAD54-like	Núcleo	Ciclo celular, meiose, reparo ao DNA						
RASD1_HUMAN	Dexamethasone-induced Ras-related protein 1 (Activator of G-protein signaling 1)	Membrana e Citoplasma e Núcleo	Sinalização via receptor acoplado a proteína G, transdução de sinais mediado pela GTPase						
RBM43_HUMAN	RNA-binding protein 43	NC	NC						
RBP1_HUMAN	RalA-binding protein 1 (RalBP1)	Membrana	Quimiotaxia, transporte, ativador da atividade de Rac GTPase						
RGL1_HUMAN	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1	NC	Transdução de sinais						
RL23A_HUMAN	60S ribosomal protein L23a	NC	Tradução de proteínas						
RNH2B_HUMAN	Ribonuclease H2 subunit B (RNase H2 subunit B)	Núcleo	NC						
RPF1_HUMAN	Ribosome production factor 1	Núcleo	Processamento de rRNA						
RS16_HUMAN	40S ribosomal protein S16	NC	Processamento do rRNA, tradução de proteínas						
RS20_HUMAN	40S ribosomal protein S20	NC	Tradução de proteínas						
RU2A_HUMAN	U2 small nuclear ribonucleoprotein A' (U2 snRNP A')	Núcleo	Regulação da transcrição						
SMD3_HUMAN	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 (Sm-D3) (snRNP core protein D3)	Núcleo	Regulação da transcrição						
SNX3_HUMAN	Sorting nexin-3 (Protein SDP3)	Citoplasma	Comunicação celular, endocitose, transporte de proteínas						

SPT16_HUMAN	Spermatogenesis-associated protein 16 (Testis development protein NYD-SP12)	Citoplasma	Diferenciação celular, espermatogênese, desenvolvimento multicelular						
SRRT_HUMAN	Serrate RNA effector molecule homolog (Arsenite-resistance protein 2)	Citoplasma e Núcleo	Proliferação celular, processamento do microRNA primário, resposta para arsênico						
SSX1_HUMAN	Protein SSX1	NC	Regulação da transcrição						
SSX6_HUMAN	Protein SSX6	NC	Regulação da transcrição						
STK10_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase 10	NC	Fosforilação de proteínas						
STMN1_HUMAN	Stathmin	Citoplasma	Diferenciação celular, sinalização intracelular, desenvolvimento do sistema nervoso, resposta à vírus						
SYCP2_HUMAN	Synaptonemal complex protein 2	Núcleo	Divisão celular, meiose						
TAP26_HUMAN	Thyroid transcription factor 1-associated protein 26	Núcleo	Regulação da transcrição						
TBC28_HUMAN	TBC1 domain family member 28	NC	NC						
TFAM_HUMAN	Transcription factor A, mitochondrial (mtTFA) (Mitochondrial transcription factor 1)	Citoplasma	Regulação da transcrição						
THG1_HUMAN	Probable tRNA(His) guanylyltransferase	Citoplasma	Processamento de tRNA						
TNNT2_HUMAN	Troponin T, cardiac muscle (Cardiac muscle troponin T)	NC	Regulação da atividade ATPase, regulação da contração do coração, resposta para íon cálcio, ligante de troponina I e troponina C						
TOP2B_HUMAN	DNA topoisomerase 2-beta (DNA topoisomerase II, beta isozyme)	Citoplasma e Núcleo	DNA topological change						

UBF1_HUMAN	Nucleolar transcription factor 1 (Autoantigen NOR-90)	Núcleo	Regulação da transcrição						
VIGLN_HUMAN	Vigilin (High density lipoprotein-binding protein) (HDL-binding protein)	Citoplasma e Núcleo	Processo metabólico						
YB011_HUMAN	Uncharacterized protein FLJ46347	NC	NC						
YC014_HUMAN	Putative uncharacterized protein LOC100125556	NC	NC						
YD021_HUMAN	Putative uncharacterized protein ENSP00000382790	NC	NC						
YH010_HUMAN	IQ motif and ankyrin repeat domain-containing protein LOC642574	NC	NC						
YJ009_HUMAN	Uncharacterized protein PRO1102	NC	NC						
YM018_HUMAN	Uncharacterized protein FLJ40176	NC	NC						
YP010_HUMAN	Putative uncharacterized protein FLJ32790	NC	NC						
YV023_HUMAN	Putative uncharacterized protein ENSP00000383309	NC	NC						
Z3H7B_HUMAN	Zinc finger CCCH domain-containing protein 7B (Rotavirus 'X'-associated non-structural protein)	Núcleo	Resposta vírus - hospedeiro						
Z512B_HUMAN	Zinc finger protein 512B	Núcleo	Regulação da transcrição						
Z518A_HUMAN	Zinc finger protein 518A	Núcleo	Regulação da transcrição						
ZKSC2_HUMAN	Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 2 (Zinc finger protein 694)	Núcleo	Regulação da transcrição						
ZMAT1_HUMAN	Zinc finger matrin-type protein 1	Núcleo	NC						

ZN506_HUMAN	Zinc finger protein 506	Núcleo	Regulação da transcrição					
ZN638_HUMAN	Zinc finger protein 638 (Zinc finger matrin-like protein) (Cutaneous T-cell lymphoma-associated antigen se33-1)	Núcleo	Transcrição					
ZN821_HUMAN	Zinc finger protein 821	Núcleo	Regulação da transcrição					

7. Referências bibliográficas

Adachi J, Kumar C, Zhang Y, Olsen JV, Mann M. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol.* 2006;7(9):R80.

Ahmed KA, Xiang J. Mechanisms of cellular communication through intercellular protein transfer. *J Cell Mol Med.* 2010 Jan 11.

Arthur JM, Thongboonkerd V, Scherzer JA, Cai J, Pierce WM, Klein JB. Differential expression of proteins in renal cortex and medulla: a proteomic approach. *Kidney Int.* 2002 Oct;62(4):1314-21.

Ashton-Chess J, Brouard S, Souillou JP. Is clinical tolerance realistic in the next decade? *Transpl Int.* 2006 Jul;19(7):539-48.

Ashton-Chess, J., M. Giral, *et al.* Using biomarkers of tolerance and rejection to identify high- and low-risk patients following kidney transplantation. *Transplantation*, v.87, n.9 Suppl, May 15, p.S95-9. 2009.

Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos, Registro Brasileiro de Transplantes, Ano XV – nº 2 - Janeiro/Junho 2009: Disponível em: www.abto.org.br

Auchincloss H Jr, Lee R, Shea S, Markowitz JS, Grusby MJ, Glimcher LH. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 15;90(8):3373-7.

Bacchetta R, Sartirana C, Levings MK, Bordinon C, Narula S, Roncarolo MG. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are

independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur J Immunol.* 2002 Aug;32(8):2237-45.

Bañón-Maneus E, Diekmann F, Carrascal M, Quintana LF, Moya-Rull D, Bescós M, *et al.* Two-dimensional difference gel electrophoresis urinary proteomic profile in the search of nonimmune chronic allograft dysfunction biomarkers. *Transplantation.* 2010 Mar 15;89(5):548-58.

Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, Chaudhry AN, Cook HT, Lechler RI. Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *J Immunol.* 2001 Dec 15;167(12):7199-206.

Barber LD, Whitelegg A, Madrigal JA, Banner NR, Rose ML. Detection of vimentin-specific autoreactive CD8+ T cells in cardiac transplant patients. *Transplantation.* 2004 May 27;77(10):1604-9.

Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, *et al.* In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med.* 2002 Mar 4;195(5):603-16.

Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, *et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol.* 2002 Jan;30(1):42-8.

Beckingham I.J., Nicholson M.L., Bell P.R. Analysis of factors associated with complications following renal transplant needle core biopsy. *Br J Urol* 1994; 73: 13-5.

Benfield M.R., Herrin J., Feld L., Rose S., Stablein D., Tejani A. Safety of kidney biopsy in pediatric transplantation: a report of the Controlled Clinical Trials in Pediatric Transplantation Trial of Induction Therapy Study Group. *Transplantation* 1999; 67: 544-7.

Bennett CL, Christie J, Ramsdell F *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20–1.

Bongartz J, Bruni N, Or-Guil M. Epitope mapping using randomly generated peptide libraries. *Methods Mol Biol.* 2009;524:237-46.

Braudeau C, Ashton-Chess J, Giral M, Dugast E, Louis S, Pallier A, *et al.* Contrasted blood and intragraft toll-like receptor 4 mRNA profiles in operational tolerance versus chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation.* 2008 Jul 15;86(1):130-6.

Briggs, R. C. Briggs, J. A. Ozer, J. Sealy, L. Dworkin, L. L. Kingsmore, S. *et al.* The human myeloid cell nuclear differentiation antigen gene is one of at least two related interferon-inducible genes located on chromosome 1q that are expressed specifically in hematopoietic cells. *Blood.* 1994; 83: 2153-2162,.

Brouard S, Dupont A, Giral M, Louis S, Lair D, Braudeau C, *et al.* Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am J Transplant.* 2005 Feb;5(2):330-40.

Brouard S, Mansfield E, Braud C, Li L, Giral M, Hieh SC, *et al.* Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with

operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 Sep 25;104(39):15448-53.

Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA *et al*. Disruption of a new forkhead / winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001;27: 68–73.

Bushell A, Jones E, Gallimore A, Wood K. The generation of CD25+ CD4+ regulatory T cells that prevent allograft rejection does not compromise immunity to a viral pathogen. *J Immunol*. 2005 Mar 15;174(6):3290-7.

Cai J, Lee J, Jankowska-Gan E, Derks R, Pool J, Mutis T, *et al*. Minor H antigen HA-1-specific regulator and effector CD8+ T cells, and HA-1 microchimerism, in allograft tolerance. *J Exp Med*. 2004 Apr 5;199(7):1017-23.

Caldas C, Luna E, Spadafora-Ferreira M, Porto G, Iwai LK, Oshiro SE, *et al*. Cellular autoreactivity against heat shock protein 60 in renal transplant patients: peripheral and graft-infiltrating responses. *Clin Exp Immunol*. 2006 Oct;146(1):66-75.

Câmara NO, Nishida S, Silva MS, Pestana JO, Pereira AB, Sesso R, *et al*. Monitoring serum beta-2 microglobulin is useful for detecting patients with increased risk of acute rejection during reduction in immunosuppression. *Transplant Proc*. 1998 Dec;30(8):4158-9.

Cavani A, Nasorri F, Prezzi C, Sebastiani S, Albanesi C, Girolomoni G. Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. *J Invest Dermatol*. 2000 Feb;114(2):295-302.

Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003 Dec 15;198(12):1875-86.

Chen, Y. Kuchroo, V. K. Inobe, J. Hafler, D. A. Weiner, H. L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*, v. 265, n. 5176, p. 1237-40, Aug 26 1994.

Chikuma S, Bluestone JA. CTLA-4 and tolerance: the biochemical point of view. *Immunol Res.* 2003;28(3):241-53.

Clarke W., Silverman B.C., Zhang Z., Chan D. W., Klein A. S., Molmenti E. P. Characterization of renal allograft rejection by urinary proteomic analysis. *Annals of Surgery*, vol. 237 (5), 660-665. 2003.

Cohen IR. Peptide therapy for type I diabetes: the immunological homunculus and the rationale for vaccination. *Diabetologia.* 2002, 45:1468-1474.

Cohen IR. The cognitive paradigm and the immunological homunculus. *Immunology Today.* 1992, 13:490-494.

Colvin, R. B. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol*, v.18, n.4, Apr, p.1046-56. 2007

Colvin, R. B. e V. Nickleleit. Renal Transplant Pathology. In: Heptinstall's *Pathology of the Kidney*. J. Jennette, J. Olson, M. Schwartz e F. Silva (1 Ed.). Philadelphia: Lippincott-Raven. 2006. p.1347-1490

Cornell, L. D., R. N. Smith, *et al.* Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *Annu Rev Pathol*, v.3, p.189-220. 2008.

Davey GM, Kurts C, Miller JF, Bouillet P, Strasser A, Brooks AG, *et al.* Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross presentation of self-antigen occurs by a Bcl-2-inhibitable pathway mediated by Bim. *J Exp Med*. 2002 Oct 7;196(7):947-55.

Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000 Jul 6;343(1):37-49.

DePaz HA, Oluwale OO, Adeyeri AO, Witkowski P, Jin MX, Hardy MA, *et al.* Immature rat myeloid dendritic cells generated in low-dose granulocyte macrophage-colony stimulating factor prolong donor-specific rat cardiac allograft survival. *Transplantation*. 2003 Feb 27;75(4):521-8.

Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med*. 2002 Jul 15;196(2):247-53. Erratum in: *J Exp Med* 2002 Aug 19;196(4):559. *J Exp Med* 2002 Sep 16;196(6):867.

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

Dragun D, Müller DN, Bräsen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelhä M, Dechend R, *et al.* Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med*. 2005 Feb 10;352(6):558-69.

El-Amm JM, Gruber SA. The significance of subclinical rejection. *Clin Transplant*. 2009 Mar;23(2):150-6

Elster EA, Hale DA, Mannon RB, Cendales LC, Swanson SJ, Kirk AD. The road to tolerance: renal transplant tolerance induction in nonhuman primate studies and clinical trials. *Transpl Immunol*. 2004 Sep-Oct;13(2):87-99.

Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev*. 2005 Aug;206:232-59.

Fehr T, Sykes M. Tolerance induction in clinical transplantation. *Transpl Immunol*. 2004 Sep-Oct;13(2):117-30.

Feitsma AL, van der Voort EI, Franken KL, el Bannoudi H, Elferink BG, Drijfhout JW, *et al*. Identification of citrullinated vimentin peptides as T cell epitopes in HLA-DR4-positive patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010 Jan;62(1):117-25.

Feng XM, Chen XL, Liu N, Chen Z, Zhou YL, Han ZB, *et al*. Interleukin-27 upregulates major histocompatibility complex class II expression in primary human endothelial cells through induction of major histocompatibility complex class II transactivator. *Hum Immunol*. 2007 Dec;68(12):965-72.

Fiedler GM, Baumann S, Leichtle A, Oltmann A, Kase J, Thiery J, *et al*. Standardized peptidome profiling of human urine by magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Chem*. 2007 Mar;53(3):421-8.

Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev*. 2008 Aug;224:166-82.

Fotouhi-Ardakani N, El Kebir D, Pierre-Charles N, Wang L, Ahern SP, Filep JG, *et al*. Role for Myeloid Nuclear Differentiation Antigen in the Regulation

of Neutrophil Apoptosis during Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Apr 15.

Fu F, Li Y, Qian S, Lu L, Chambers F, Starzl TE, *et al*. Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II+, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients. *Transplantation*. 1996 Sep 15;62(5):659-65.

Game DS, Rogers NJ, Lechler RI. Acquisition of HLA-DR and costimulatory molecules by T cells from allogeneic antigen presenting cells. *Am J Transplant*. 2005 Jul;5(7):1614-25.

Gröne HJ, Weber K, Gröne E, Helmchen U, Osborn M. Coexpression of keratin and vimentin in damaged and regenerating tubular epithelia of the kidney. *Am J Pathol*. 1987 Oct;129(1):1-8.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, *et al*. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997 Oct 16;389(6652):737-42.

Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol*. 2003 Mar;3(3):233-42.

Heeger PS. T-cell allorecognition and transplant rejection: a summary and update. *Am J Transplant*. 2003 May;3(5):525-33.

Helderman JH, Goral S. Transplant Immunobiology. In: Danovitch GM, editor. *Handbook of Kidney Transplantation* – 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. pg 33.

Herrera, O. B. Golshayan, D. Tibbott, R. Salcido Ochoa, F. James, M. J. Marelli-Berg, F. M. *et al.* A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol*, v. 173, n. 8, p. 4828-37, Oct 15 2004.

Hoffmann, S. C., D. A. Hale, *et al.* Functionally significant renal allograft rejection is defined by transcriptional criteria. *Am J Transplant*, v.5, n.3, Mar, p.573-81. 2005.

Human Proteome Organization (HUPO). Human Kidney and Urine Proteome Project; 2010. Disponível em: <http://www.hupo.org/research/urine/>

Humar A, Payne WD, Sutherland DE, Matas AJ. Clinical determinants of multiple acute rejection episodes in kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2000 Jun 15;69(11):2357-60.

Inaba K, Turley S, Yamaide F, Iyoda T, Mahnke K, Inaba M, *et al.* Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med*. 1998 Dec 7;188(11):2163-73.

Jiang S, Golshayan D, Tsang J, Lombardi G, Lechler RI. In vitro expanded alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cell treatment for the induction of donor-specific transplantation tolerance. *Int Immunopharmacol*. 2006 Dec 20;6(13-14):1879-82.

Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med*. 2000 Nov 6;192(9):1213-22.

Joosten SA, Sijpkens YW, van Kooten C, Paul LC. Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. *Kidney Int.* 2005 Jul;68(1):1-13.

Jonker M, Danskine A, Haanstra K, Wubben J, Kondova I, Kuhn EM, *et al.* The autoimmune response to vimentin after renal transplantation in nonhuman primates is immunosuppression dependent. *Transplantation.* 2005 Aug 15;80(3):385-93.

Kasiske BL, Andany MA, Danielson B. A thirty percent chronic decline in inverse serum creatinine is an excellent predictor of late renal allograft failure. *Am J Kidney Dis.* 2002 Apr;39(4):762-8.

Kean LS, Gangappa S, Pearson TC, Larsen CP. Transplant tolerance in non-human primates: progress, current challenges and unmet needs. *Am J Transplant.* 2006 May;6(5 Pt 1):884-93.

Kindt, T.J. Osborne, B.A. Goldsby, R.A. *Kuby Immunology.* 6th ed. New York. W. H. Freeman. 2006. 574p.

Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol.* 2002 Feb 1;168(3):1080-6.

Knight RJ, Burrows L, Bodian C. The influence of acute rejection on long-term renal allograft survival: a comparison of living and cadaveric donor transplantation. *Transplantation.* 2001 Jul 15;72(1):69-76.

Kotsch K, Mashreghi MF, Bold G, Tretow P, Beyer J, Matz M, *et al.* Enhanced granulysin mRNA expression in urinary sediment in early and delayed acute renal allograft rejection. *Transplantation.* 2004 Jun 27;77(12):1866-75.

Kreisel D, Krasinskas AM, Krupnick AS, Gelman AE, Balsara KR, Popma SH, *et al.* Vascular endothelium does not activate CD4+ direct allorecognition in graft rejection. *J Immunol.* 2004 Sep 1;173(5):3027-34.

Kreisel D, Krupnick AS, Gelman AE, Engels FH, Popma SH, Krasinskas AM, *et al.* Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition. *Nat Med.* 2002 Mar;8(3):233-9.

Kyewski B, Klein L. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:571-606.

Lakkis FG, Arakelov A, Konieczny BT, Inoue Y. Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nat Med.* 2000 Jun;6(6):686-8.

Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pack M, Hankins DF, Morris PJ, Austyn JM. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med.* 1990 Nov 1;172(5):1483-93.

Lechler RI, Batchelor JR. Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts. Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient. *J Exp Med.* 1982a Dec1;156(6):1835-41.

Lechler RI, Batchelor JR. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med.* 1982b Jan 1;155(1):31-41.

- Lee RS, Yamada K, Houser SL, Womer KL, Maloney ME, Rose HS, *et al.* Indirect recognition of allopeptides promotes the development of cardiac allograft vasculopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Mar 13;98(6):3276-81.
- Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002 Dec;129(4):263-76.
- Levings MK, Gregori S, Tresoldi E, Cazzaniga S, Bonini C, Roncarolo MG. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood*. 2005 Feb 1;105(3):1162-9.
- Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, *et al.* Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med*. 2001 Mar 29;344(13):947-54.
- Li Y, Koshiha T, Yoshizawa A, Yonekawa Y, Masuda K, Ito A, *et al.* Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transplant*. 2004 Dec;4(12):2118-25.
- Lisik W, Kahan B. Proliferation signal inhibitors: chemical, biologic, and clinical properties. *Transplantation Reviews*. 2005. 19:186-212.
- Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suci-Foca N. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *Int Immunol*. 1998 Jun;10(6):775-83.
- Louis S, Braudeau C, Giral M, Dupont A, Moizant F, Robillard N, *et al.* Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation*. 2006 Feb 15;81(3):398-407.

Magro CM, Klinger DM, Adams PW, Orosz CG, Pope-Harman AL, Waldman WJ, *et al.* Evidence that humoral allograft rejection in lung transplant patients is not histocompatibility antigen-related. *Am J Transplant.* 2003 Oct;3(10):1264-72.

Mahesh B, Leong HS, McCormack A, Sarathchandra P, Holder A, Rose ML. Autoantibodies to vimentin cause accelerated rejection of cardiac allografts. *Am J Pathol.* 2007 Apr;170(4):1415-27.

Maier S, Tertilt C, Chambron N, Gerauer K, Hüser N, Heidecke CD, *et al.* Inhibition of natural killer cells results in acceptance of cardiac allografts in CD28^{-/-} mice. *Nat Med.* 2001 May;7(5):557-62.

Mao Y, Yu J, Chen J, Yang H, He Q, Shou Z, *et al.* Diagnosis of renal allograft subclinical rejection by urine protein fingerprint analysis. *Transpl Immunol.* 2008 Jan;18(3):255-9.

Martin L, Guignier F, Bocrie O, D'Athis P, Rageot D, Riflè G, *et al.* Detection of anti-HLA antibodies with flow cytometry in needle core biopsies of renal transplants recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation.* 2005 May 27;79(10):1459-61.

Martínez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I, Orlando G, Tisone G, Lerut J, *et al.* Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest.* 2008 Aug;118(8):2845-57.

Matthews JB, Ramos E, Bluestone JA. Clinical trials of transplant tolerance: slow but steady progress. *Am J Transplant.* 2003 Jul;3(7):794-803.

Mazariegos GV, Zahorchak AF, Reyes J, Chapman H, Zeevi A, Thomson AW. Dendritic cell subset ratio in tolerant, weaning and non-tolerant liver recipients is not affected by extent of immunosuppression. *Am J Transplant*. 2005 Feb;5(2):314-22.

Mazariegos GV, Zahorchak AF, Reyes J, Ostrowski L, Flynn B, Zeevi A, et al. Dendritic cell subset ratio in peripheral blood correlates with successful withdrawal of immunosuppression in liver transplant patients. *Am J Transplant*. 2003 Jun;3(6):689-96.

Miyajima T, Shimizu R, Kuzuhara H, Fujimoto S. Anti-idiotypic antibodies in a patient with a well-functioning renal graft without azathioprine. II. Anti-idiotypic antibodies directed to a clonotype of a certain cytotoxic T lymphocyte. *Int Immunol*. 1989;1(5):503-8.

Moll S, Pascual M. Humoral rejection of organ allografts. *Am J Transplant*. 2005 Nov;5(11):2611-8.

Monaco AP. The beginning of clinical tolerance in solid organ allografts. *Exp Clin Transplant*. 2004 Jun;2(1):153-61.

Moraes-Vieira PM, Silva HM, Takenaka MC, Monteiro SM, Lemos F, Saitovitch D, et al. Differential monocyte STAT6 activation and CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells in kidney operational tolerance transplanted individuals. *Hum Immunol*. 2010 May;71(5):442-50.

Mor-Vaknin N, Punturieri A, Sitwala K, Markovitz DM. Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nat Cell Biol*. 2003 Jan;5(1):59-63.

Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol*. 2010 Jan;11(1):21-7.

- Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, *et al.* Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med.* 2005 Dec 1;353(22):2342-51.
- Nagy N, Vanky F, Klein E. Tumor surveillance: expression of the transporter associated with antigen processing (TAP-1) in ex-vivo human tumor samples and its elevation by in vitro treatment with IFN-gamma and TNF-alpha. *Immunol Lett.* 1998 Dec;64(2-3):153-60.
- Naicker S, Naicker T, Bhoola KD. Immunolocalisation of endothelin-1 and its receptors during acute renal allograft rejection. *Transplant Proc.* 2001 Feb-Mar;33(1-2):1218-20.
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med.* 2003 Dec 11;349(24):2326-33.
- Neumann J, Spadafora-Ferreira M, Goldberg AC, Tudor R, Macaubas C, Sabbaga E, *et al.* Reactivity of renal transplant sera against a 17 kD mononuclear cell antigen. *Transpl Int.* 1992;5 Suppl 1:S617-20.
- Newell KA, Larsen CP. Tolerance assays: measuring the unknown. *Transplantation.* 2006 Jun 15;81(11):1503-9.
- Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, *et al.* Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol.* 2006 Jun;7(6):652-62.
- Oetting WS, Rogers TB, Krick TP, Matas AJ, Ibrahim HN. Urinary beta2-microglobulin is associated with acute renal allograft rejection. *Am J Kidney Dis.* 2006 May;47(5):898-904.

O'Riordan E, Goligorsky MS. Emerging studies of the urinary proteome: the end of the beginning? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005 Nov;14(6):579-85.

O'Riordan E, Orlova TN, Mei J J, Butt K, Chander PM, Rahman S, *et al*. Bioinformatic analysis of the urine proteome of acute allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Dec;15(12):3240-8.

Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2009 Jan;227(1):221-33.

Piazza A, Poggi E, Borrelli L, Servetti S, Monaco PI, Buonomo O, *et al*. Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: posttransplant analysis using flow cytometric techniques. *Transplantation*. 2001 Apr 27;71(8):1106-12.

Pons JA, Revilla-Nuin B, Baroja-Mazo A, Ramírez P, Martínez-Alarcón L, Sánchez-Bueno F, *et al*. FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal. *Transplantation*. 2008 Nov 27;86(10):1370-8.

Quintana LF, Solé-Gonzalez A, Kalko SG, Bañon-Maneus E, Solé M, Diekmann F, *et al*. Urine proteomics to detect biomarkers for chronic allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Feb;20(2):428-35.

Rapaport FT, Dausset J, Converse JM, Lawrence HS. Biological and ultrastructural studies of leucocyte fractions as transplantation antigens in man. *Transplantation*. 1965 Jul;3:490-500.

Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2000, 192(2): 295-302.

Rocha PN, Plumb TJ, Crowley SD, Coffman TM. Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunol Rev.* 2003 Dec;196:51-64.

Rothenberg ME. Eotaxin. An essential mediator of eosinophil trafficking into mucosal tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Sep;21(3):291-5.

Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A, Subra JF, Legendre C, Noël C, *et al.* Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2006 Apr;6(4):736-46.

Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol.* 2009 Oct;21(10):1105-11.

Sakaguchi, S. Sakaguchi, N. Asano, M. Itoh, M. Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, v. 155, n. 3, p. 1151-64, Aug 1 1995.

Sánchez-Fueyo A, Domenig CM, Mariat C, Alexopoulos S, Zheng XX, Strom TB. Influence of direct and indirect allorecognition pathways on CD4+CD25+ regulatory T-cell function in transplantation. *Transpl Int.* 2007 Jun;20(6):534-41.

Sarto C, Marocchi A, Sanchez JC, Giannone D, Frutiger S, Golaz O, *et al.* Renal cell carcinoma and normal kidney protein expression. *Electrophoresis.* 1997 Mar-Apr;18(3-4):599-604.

- Sawyer GJ, Dalchau R, Fabre JW. Indirect T cell allorecognition: a cyclosporin A resistant pathway for T cell help for antibody production to donor MHC antigens. *Transpl Immunol*. 1993;1(1):77-81.
- Schaub S, Rush D, Wilkins J, Gibson I, W. Weiler T, Sangster K. *et al*. Proteomic- based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. *J. Am. Soc. Nephrol*, 15, 219-227. 2004.
- Schaub S, Nickerson P, Rush D, Mayr M, Hess C, Golian M, *et al*. Urinary CXCL9 and CXCL10 levels correlate with the extent of subclinical tubulitis. *Am J Transplant*. 2009 Jun;9(6):1347-53.
- Seino KI, Fukao K, Muramoto K, Yanagisawa K, Takada Y, Kakuta S, *et al*. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Feb 27;98(5):2577-81.
- Sokol CL, Chu NQ, Yu S, Nish SA, Laufer TM, Medzhitov R. Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat Immunol*. 2009 Jul;10(7):713-20.
- Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, *et al*. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant*. 2007 Mar;7(3):518-26.
- Spadafora-Ferreira M, Fonseca JA, Granja C, Malheiros DM, Kalil J, Coelho V. Predominant IL-10 production in indirect alloreactivity is not associated with rejection. *Clin Immunol*. 2001 Dec;101(3):315-27.

Steinmann J, Kaden J, May G, Schroder K, Herwartz C, Muller-Ruchholtz W. Failure of in vitro T-cell assays to predict clinical outcome after human kidney transplantation. *J Clin Lab Anal.* 1994;8(3):157-62.

Strober S, Benike C, Krishnaswamy S, Engleman EG, Grumet FC. Clinical transplantation tolerance twelve years after prospective withdrawal of immunosuppressive drugs: studies of chimerism and anti-donor reactivity. *Transplantation.* 2000 Apr 27;69(8):1549-54.

Strong, K. J., Osicka, T. M., Comper, W. D., Urinary-peptide excretion in patients with and volunteers without diabetes. *J. Lab. Clin. Med.* 2005, 145, 239–246.

Sun Q, Liu Z, Yin G, Chen H, Chen J, Li L. Detectable circulating antiendothelial cell antibodies in renal allograft recipients with C4d-positive acute rejection: a report of three cases. *Transplantation.* 2005 Jun 27;79(12):1759-62.

Suri-Payer E, Kehn PJ, Cheever AW, Shevach EM. Pathogenesis of post-thymectomy autoimmune gastritis. Identification of anti-H/K adenosine triphosphatase-reactive T cells. *J Immunol.* 1996 Aug 15;157(4):1799-805.

Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med.* 2001, 193(11): 1311-1318.

Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, Takemoto S. High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N Engl J Med.* 1995 Aug 10;333(6):333-6.

Thomson AW, Mazariegos GV, Reyes J, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Bentelejewski C, *et al.* Monitoring the patient off immunosuppression. Conceptual framework for a proposed tolerance assay study in liver transplant recipients. *Transplantation*. 2001 Oct 27;72(8 Suppl):S13-22.

Tokita D, Mazariegos GV, Zahorchak AF, Chien N, Abe M, Raimondi G, *et al.* High PD-L1/CD86 ratio on plasmacytoid dendritic cells correlates with elevated T-regulatory cells in liver transplant tolerance. *Transplantation*. 2008 Feb 15;85(3):369-77.

VanBuskirk AM, Burlingham WJ, Jankowska-Gan E, Chin T, Kusaka S, Geissler F, *et al.* Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest*. 2000 Jul;106(1):145-55.

Vandekerckhove BA, Datema G, Koning F, Goulmy E, Persijn GG, Van Rood JJ, *et al.* Analysis of the donor-specific cytotoxic T lymphocyte repertoire in a patient with a long term surviving allograft. Frequency, specificity, and phenotype of donor-reactive T cell receptor (TCR)-alpha beta+ and TCR-gamma delta+ clones. *J Immunol*. 1990 Feb 15;144(4):1288-94.

Vella JP, Spadafora-Ferreira M, Murphy B, Alexander SI, Harmon W, Carpenter CB, *et al.* Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation*. 1997 Sep 27;64(6):795-800.

Waldmann H, Adams E, Fairchild P, Cobbold S. Infectious tolerance and the long-term acceptance of transplanted tissue. *Immunol Rev*. 212:301-13, 2006.

- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*. 1992 Mar 26;356(6367):314-7.
- Wittke S, Fliser D, Haubitz M, Bartel S, Krebs R, Hausadel F, *et al*. Determination of peptides and proteins in human urine with capillary electrophoresis-mass spectrometry, a suitable tool for the establishment of new diagnostic markers. *J Chromatogr A*. 2003 Sep 26;1013(1-2):173-81.
- Witzmann FA, Fultz CD, Grant RA, Wright LS, Kornguth SE, Siegel FL. Differential expression of cytosolic proteins in the rat kidney cortex and medulla: preliminary proteomics. *Electrophoresis*. 1998 Oct;19(14):2491-7.
- Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2003 Mar;3(3):199-210.
- Yoshitomi M, Koshiba T, Haga H, Li Y, Zhao X, Cheng D, *et al*. Requirement of protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression after liver transplantation. *Transplantation*. 2009 Feb 27;87(4):606-14. Erratum in: *Transplantation*. 2009 Apr 15;87(7):1104
- Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med*. 2000 Jul;6(7):782-9.