Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira

Estudo do perfil imunológico molecular em indivíduos
transplantados renais com 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 Coelho

São Paulo

2009

Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira

Estudo do perfil imunológico molecular em indivíduos
transplantados renais com de 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 Coelho

São Paulo

2009

Dedico este trabalho
a minha amada mãe,
por tudo...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos vocês, que de algumas forma participaram e me ajudaram a finalizar mais uma etapa de minha vida...

Primeiramente a minha mãe, meu porto seguro, e a minha família, minha irmã, meu sobrinho, ao grande Isaac, meu tio Beto e minhas avós pelo apoio;

A minha querida orientadora Verônica Coelho por ter e aceitado como aluno, me ajudado a crescer cientificamente e me guiado nos meus passos iniciais dentro da imunologia, muito obrigado mesmo;

Ao professor Jorge Kalil e aos demais professores do Laboratório de Imunologia, Edécio Cunha-Neto e Luiza Gunglielme Guilherme por suas sugestões e agradável convivência;

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

À funcionaria da disciplina de Imunopatologia e Alergia, Tânia;

À dois professores e amigos, Andrea Maranhão e Marcelo Brígido, que me iniciaram na carreira científica;

Aos integrantes do laboratório de imunologia, que são muitos, mas deixo aqui meus sinceros agradecimentos;

Aos amigos do laboratório de imunologia pela convivência amigável e divertida: Amanda, Sandras Emico e Maria, Carois, Malu, Selma, Seu Jair, Adalberto, Fernanda, Aninha e Evelyn.

Aos amigos do ICB Lucas e Zé pelas discussões e amizade;

À Rosi pelas inúmeras risadas, conversas e conselhos. A uma grande amiga que ganhei durante meu mestrado, a Maisa, sempre disposta a tomar um café e conversar sobre qualquer coisa, muito obrigado pelo seu companheirismo.

Ao grande amigo, de todas as horas, Hernandez, pela sua amizade, cumplicidade, discussões, bagunças, companheiro para todas as horas, valeu!

À minha companheira Cecília, com quem venho compartilhando meus últimos 5 anos, por todo o amor e carinho além dos excelentes momentos, muito obrigado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
Caminhos à tolerância imunológica	01
Células T: origem, destino e funções	03
Células T reguladoras	07
Fatores de transcrição e sinalização intracelular em linfócitos T	12
Resposta imune ao transplante	22
Imunossupressão	26
Tolerância operacional no transplante renal	29
2. OBJETIVOS	34
Objetivo geral	34
Objetivos específicos	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
Delineamento experimental	35
Sujeitos de pesquisa	36
Critérios para escolha dos pacientes	37
Obtenção de células mononucleares no sangue dos sujeitos de pesquisa	38
Congelamento e descongelamento de células	39
PCR em Tempo Real	39
Extração de RNA	39
Quantificação de RNA	40
Tratamento com DNase	41
Transcrição Reversa	41

Reação de PCR em tempo real (RT-PCR).....	42
Desenho e padronização dos iniciadores.....	43
Especificidade e adequação dos iniciadores.....	44
Critérios de validação.....	45
Detecção intracelular de Foxp3.....	45
Citometria de fluxo – <i>PHOSFLOW</i>	47
Avaliação das vias IL-4/STAT6 e IL-6/STAT3.....	47
Permeabilização.....	47
Marcação intracelular e de superfície.....	48
Análise estatística dos dados.....	49
4. RESULTADOS	50
Sujeitos de Pesquisa: dados clínicos.....	50
Análise do perfil transcricional imunológico dos indivíduos transplantados por PCR em tempo real.....	54
Expressão gênica REGULA X INFLAMA em 2 tempos distintos.....	67
Análise da expressão de Foxp3 em células T CD4 ⁺ CD25 ⁺	82
Análise das vias de sinalização IL-4/STAT6 e IL-6/STAT3.....	90
Via de sinalização IL-6/STAT3.....	91
Via de sinalização IL-4/STAT6.....	94
Análise da expressão de IL-4R α e SOCS3.....	98
Balanco global do conjunto de resultados.....	100
5. DISCUSSÃO	102
6. CONCLUSÕES	146
ANEXO A.....	149

ANEXO B.....	164
7. BIBLIOGRAFIA.....	166
APÊNDICE A.....	187
APÊNDICE B.....	191

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais destinos de células T CD4 ⁺ diferenciadas.....	4
Figura 2: Representação esquemática da interação de células T com seu microambiente e transdução de sinais.....	13
Figura 3: Função do enxerto renal nos diferentes grupos clínicos.....	52
Figura 4: Visualização da integridade do RNA em gel de agarose 1%.....	54
Figura 5: Curva de dissociação para iniciadores de TGF- β	55
Figura 6: Cálculo da eficiência dos iniciadores para os genes Foxp3, GATA-3, TGF β , o receptor de TGF β , IL-10, T-bet, TNF- α e GAPDH.....	57
Figura 7: Expressão gênica relativa.....	60
Figura 8: Perfil de modificação da expressão de genes REGULA x INFLAMA nos diferentes grupos de estudo, por PCR em tempo Real.....	67
Figura 9: Análise sequencial da expressão relativa de RNAm em PBMC nos indivíduos transplantados renais.....	70
Figura 10: Perfil de estabilidade gênica, entre os tipos de modificações REGULA x INFLAMA, em dois pontos distintos, por PCR em tempo Real.....	80
Figura 11: Perfil de concordância entre os tipos de modificações REGULA x INFLAMA e a ausência de modificação, SEM MOD, nos diferentes grupos de estudo, em relação a dois pontos estudados, por PCR em tempo real.....	81
Figura 12: Análise representativa da expressão de Foxp3 em células T CD4 ⁺ do indivíduo com rejeição crônica, RC7.....	83
Figura 13: Representação das regiões das populações de linfócitos CD4 ⁺ /CD25 ⁺ /Foxp3 analisadas nos diferentes grupos de estudo.....	84
Figura 14: Análise das porcentagens de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ , nos diferentes grupos de estudo.....	85
Figura 15: Análise do número absoluto de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ nos diferentes grupos de estudo.....	86
Figura 16: Análise das porcentagens de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ nos diferentes grupos de estudo.....	87

Figura 17: Análise do número absoluto de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ , por citometria de fluxo, nos diferentes grupos de estudo.....	89
Figura 18: Análise da sinalização via IL-6/STAT3 no indivíduo Est9, do grupo estável, por Citometria de Fluxo - PhosFlow.....	92
Figura 19: Histograma representando a fosforilação de STAT3 do indivíduo Est9, do grupo de função estável do enxerto e imunossupressão convencional.....	93
Figura 20: Análise da fosforilação de STAT3 nas regiões celulares de linfócitos e de monócitos.....	94
Figura 21: Análise da sinalização via IL-4/STAT6 do indivíduo RC13, do grupo de rejeição crônica, por Citometria de Fluxo – PhosFlow.....	96
Figura 22: Histograma representativo, do indivíduo RC13, do grupo de rejeição crônica.....	97
Figura 23: Análise da fosforilação de STAT6 nas regiões celulares de linfócitos e de monócitos.....	98
Figura 24: Expressão gênica relativa de SOCS3 nos diferentes grupos de estudo.....	99
Figura 25: Expressão gênica relativa de IL-4R α nos diferentes grupos de estudo.....	100

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Sequências de iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real.....	45
TABELA 2: História clínica dos diferentes indivíduos transplantados renais.....	53
TABELA 3: Eficiência dos iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real.....	57
TABELA 4: Expressão Gênica relativa em indivíduos transplantados renais com rejeição crônica: Balanço REGULA X INFLAMA.....	62
TABELA 5: Expressão Gênica relativa em indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto e imunossupressão convencional: Balanço REGULA X INFLAMA.....	64
TABELA 6: Expressão Gênica relativa em indivíduos transplantados renais com baixa imunossupressão: Balanço REGULA X INFLAMA.....	65
TABELA 7: Expressão Gênica relativa em indivíduos transplantados renais com tolerância operacional: Balanço REGULA X INFLAMA.....	65
TABELA 8: Expressão Gênica Relativa em indivíduos transplantados renais com rejeição crônica, em dois pontos : Balanço REGULA X INFLAMA.....	71
TABELA 9: Expressão Gênica relativa em indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto e imunossupressão convencional, em dois pontos: Balanço REGULA X INFLAMA.....	74
TABELA 10: Expressão Gênica relativa em indivíduos transplantados renais com baixa imunossupressão, em dois pontos: Balanço REGULA X INFLAMA.....	77
TABELA 11: Expressão Gênica relativa em indivíduos transplantados renais com tolerância operacional, em dois pontos: Balanço REGULA X INFLAMA.....	78
TABELA 12: Balanço Global dos Resultados.....	101
TABELA 13: Dados demográficos clínicos dos Receptores do transplante renal.....	150
TABELA 14: Dados demográficos e clínicos do doador/enxerto.....	152
TABELA 15: Dados da evolução clínica dos indivíduos transplantados renais.....	154

TABELA 16: Uso de Drogas imunossupressoras.....158

TABELA 17: Dados sobre a Evolução dos Transplantados Renais.....161

LISTA DE ABREVIATURAS

BI: função estável do enxerto e baixa imunossupressão

cDNA: DNA complementar

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

dNTP: desoxinucleotídeo trifosfato

Est: função estável do enxerto e imunossupressão convencional

IL: interleucina

IR: índice de expressão relativa

Kb: kilobase

M: molar

ml: mililitro

µg: micrograma

µl: microlitro

mm³: milímetro cúbico

ng: nanograma

pb: pares de base

RC: rejeição crônica

RNase: Ribonuclease

Sau: doadores renais saudáveis

STAT: fator transdutor de sinal e ativador transcrição

TO: tolerância operacional

Tx: transplante

°C: grau Celsius

RESUMO

A indução de tolerância ao aloenxerto, no contexto do transplante clínico, é um dos maiores desafios da imunologia. Existem pacientes transplantados que mesmo após a retirada de imunossupressores mantêm a função estável do aloenxerto. Este estado é chamado de “tolerância operacional”. Nosso objetivo foi analisar se os indivíduos em tolerância operacional tem um perfil imunológico molecular diferencial em relação aos outros grupos clínicos, visando identificar potenciais mecanismos envolvidos na manutenção desse estado de não agressão ao órgão transplantado. Analisamos 10 doadores renais saudáveis (Sau) e 32 indivíduos transplantados renais, sendo 4 tolerantes operacionais (TO), 11 com rejeição crônica (RC), 12 com função renal estável e imunossupressão convencional (Est) e 5 com função renal estável e baixa imunossupressão (BI). Analisamos a expressão gênica, em células mononucleares do sangue, de um painel de moléculas predominantemente imunorreguladoras ou pró-inflamatórias (REGULA/INFLAMA), por PCR em tempo real, em duas amostras, com intervalos de 4-6 meses. Quantificamos as células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, por citometria de fluxo, e estudamos a ativação de duas vias de sinalização, IL-6/STAT3 e IL-4/STAT6, por *PhosFlow*, nos diferentes grupos de estudo. Nós observamos algumas diferenças significativas entre os indivíduos TO e os outros grupos de estudo, ($p < 0,05$). A expressão dos genes de TGF- β e TGF- β R foi maior no grupo de indivíduos TO em comparação aos grupos Est e BI, analisando-se 2 tempos distintos. A expressão de GATA-3 foi maior no grupo TO comparado a todos os outros grupos de estudo. A expressão gênica de Foxp3 foi maior no grupo TO comparado aos grupos RC e BI, apenas quando analisamos as 2 amostras. Neste painel REGULA/INFLAMA, o grupo TO teve um predomínio de modificações do tipo REGULA, em ambos os tempos estudados, e maior estabilidade na expressão gênica entre as 2 amostras. Em relação as células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, os grupos RC e Est tiveram menores números absolutos e porcentagens em comparação aos outros grupos. O grupo TO teve uma quantidade dessas células semelhantes aos grupos Sau e BI. No estudo das vias de sinalização observamos que a fosforilação de STAT6, na região de monócitos, foi menor em indivíduos TO quando comparada a todos os outros grupos estudados. O painel de moléculas REGULA/INFLAMA, utilizado neste estudo, permitiu determinar um perfil imunológico molecular com características predominantemente imunorreguladoras no grupo TO. O perfil de fosforilação da via de sinalização IL-4/STAT6 nos indivíduos TO, na região de monócitos, nos permite interpretar que essas vias sejam mobilizadas de forma diferente, podendo participar deste estado de não agressão ao enxerto. A redução de

células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nos indivíduos com imunossupressão convencional (grupos RC e Est) nos permite interpretar que a imunossupressão afeta essa população celular, potencialmente imunorreguladora. O maior número de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, nos indivíduos TO e BI nos permite sugerir que essas células tenham um papel importante no estado de tolerância operacional. Também o fator de transcrição GATA-3 parece desempenhar um importante papel na indução/manutenção do estado de TO, sugerindo que um desvio Th2 seja relevante para a manutenção deste estado. Os nossos resultados nos permitem interpretar que o estado de tolerância operacional tem uma repercussão sistêmica e que essas moléculas parecem ser relevantes e talvez dominantes neste estado de homeostase no contexto do transplante renal humano.

Descritores: Tolerância operacional, células T reguladoras, Foxp3, sinalização intracelular, transplante.

SUMMARY

The induction of allograft tolerance in the clinics is one of the main challenges in immunology. A special group of kidney transplanted individuals maintain stable graft function after the complete withdrawal of immunosuppression; in a state called "Operational Tolerance" (TO). Our aim was to analyze whether these individuals display a differential immunologic molecular profile compared with other clinical groups, aiming at identifying potential mechanisms involved in the maintenance of this clinical operational tolerance state. We analyzed 10 healthy kidney donors (Sau) and 32 kidney transplanted individuals belonging to the following groups: operational tolerance (TO n=4), chronic rejection (RC n=11), stable graft function under conventional immunosuppression (Est n=12) and stable graft function with low immunosuppression (BI n=5). We compared the gene expression profile of predominantly REGULATORY/INFLAMMATORY molecules, by real time PCR, in two samples with intervals of 4-6 months. We quantified the absolute numbers and percentages of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells, by flow cytometry, and the activation of IL-6/STAT3 and IL-4/STAT6 signaling pathways, by PhosFlow. We observed several significant differences between the TO group and the other groups ($p < 0.05$). The mRNA expression of TGF- β R and TGF- β was higher in the TO group compared with both BI and Est groups, when 2 distinct time points were analyzed. The GATA-3 mRNA expression was higher in TO compared with all other groups. The Foxp3 mRNA expression was higher in TO group compared with RC and BI groups, only when the 2 points were analyzed. Using this REGULATORY/INFLAMMATORY panel, the TO group showed a predominance of REGULATORY modifications in both samples, and a higher mRNA expression stability, in these two time points. The operational tolerance patients showed a CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cell profile similar to healthy kidney donors and to the low immunosuppression group. Both the chronic rejection individuals and those with stable graft function under standard immunosuppression presented lower numbers and percentages of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells, in comparison to all other groups. The operational tolerant patients also displayed a reduced activation of the IL-4/STAT6 pathway in the gate of monocytes compared with all the other groups. This panel of REGULATORY/INFLAMMATORY molecules allowed us to identify a differential immunologic molecular profile, with predominantly regulatory characteristics, in the TO group. The reduced phosphorylation of STAT6 in the gate of monocytes, in TO individuals, indicates that this pathway may be involved in the process of homeostasis in operational tolerance. The lower numbers of potentially regulatory CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells, observed in chronic rejection individuals and in those with stable graft function under

standard immunosuppression, lead us to suggest that these cells may be affected by immunosuppression. Moreover, the higher numbers of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells observed in TO and BI individuals suggest that these cells may have an important role in the induction/maintenance of these two homeostatic states of minimal, or of no aggression to the graft. Furthermore, the higher mRNA expression of GATA-3, in the TO group, suggests that a Th2 deviation may also be relevant to the maintenance of operational tolerance. Our results allowed us to interpret that the state of operational tolerance has systemic repercussion, and that the molecules studied in our work may be relevant to the process of homeostasis in the context of human kidney transplantation.

Keywords: Kidney Transplantation, Operational tolerance, Foxp3, intracellular signaling, regulatory T cells.

1. Introdução

Caminhos à tolerância imunológica

O sistema imune é uma intrincada rede formada por diferentes tipos celulares e diversas proteínas solúveis, todos se comunicando e interagindo. Desta forma, o sistema imune tem um papel importante na manutenção da integridade do organismo e na discriminação entre o próprio e o não próprio.

A tolerância ao próprio pode ser definida como um processo fisiológico de homeostase do organismo no qual é mantido um estado de não agressão a tecidos próprios e ocorre tanto no timo (tolerância central) quanto na periferia (tolerância periférica). No timo, os timócitos cujos receptores de célula T (TCR, do inglês, *T cell receptor*) ligam-se com intensidade moderada a antígenos próprios sobrevivem e migram para os órgãos periféricos (Goldrath *et al.*, 2005). Quando se ligam fortemente aos antígenos próprios sofrem apoptose através da morte celular induzida por ativação ou, ainda, morrem por negligência por não se ligarem a antígeno algum (morte celular passiva). Um fator de transcrição presente no timo tem ganho grande destaque no processo de seleção tímica por regular a transcrição de genes tecido específicos (Anderson *et al.*, 2002). Esse fator de transcrição foi denominado AIRE (regulador da autoimunidade, do inglês, *autoimmune regulator*) e mutações no gene codificador de AIRE induz o desenvolvimento de doenças autoimunes, indicando que a sua ação na expressão de genes tecidos específico é fundamental no processo de tolerância central (Anderson *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2005). Contudo, a tolerância central não elimina totalmente os linfócitos autorreativos, já que

clones autorreativos são comumente encontrados na periferia do organismo de indivíduos sadios(Cohen, 1992; 2007; Luna *et al.*, 2007) e mecanismos de regulação periféricos existem controlando a autorreatividade potencialmente patológica.

A tolerância periférica ocorre por diferentes mecanismos que atuam em conjunto ou individualmente, sendo eles: (i) anergia (incapacidade de ativação e proliferação, desenvolvida ao se reconhecer um antígeno sem coestimulação adequada)(Barron *et al.*, 2008); (ii) o reconhecimento de receptores inibitórios como o CTLA-4 (do inglês, *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*) que se liga à molécula CD28 e inibe a produção de IL-2, levando à consequente apoptose do linfócito (Bluestone, 1997; Greenwald *et al.*, 2001); (iii) apoptose devido à estimulação antigênica repetida dos linfócitos T(Anderson *et al.*, 2006); (iv) ignorância das células T (quando estas células não encontram antígenos para se ligarem) (Miller *et al.*, 1993); (v) indução de tolerância por células T reguladoras (Chen *et al.*, 2004; Carrier *et al.*, 2007a; b)e (vi) mudança no perfil de citocinas produzidas, alterando o perfil da resposta imune(Chen *et al.*, 1995; Romball *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, tem sido discutido e investigado o papel das células autorreativas e células reguladoras na manutenção da homeostase imunológica(Coutinho *et al.*, 2001; Cohen, 2007). As células T autorreativas podem estar envolvidas em processos imunorreguladores, limitando as respostas imunes e prevenindo o desenvolvimento de doenças autoimunes. Postula-se que alguns linfócitos autorreativos formariam um grupo de células que reconheceriam um determinados grupo de autoantígenos. Estes

antígenos, juntos, compreenderiam o “homúnculo imunológico” (a imagem do que é próprio ao sistema imune), e uma rede imunorreguladora existiria dirigida predominantemente a esses antígenos próprios (Cohen *et al.*, 1991; Cohen, 1992; 2007).

Cohen propôs em sua teoria que a autorreatividade fisiológica estaria dirigida a três tipos distintos de antígenos homunculares, sendo eles moléculas tecido-específicas, moléculas da resposta imune e moléculas de manutenção. Assim, seria a estes antígenos que o repertório de células T autorreativas direcionaria sua atividade, dentro do contexto de autoimunidade fisiológica (Cohen *et al.*, 1991; Cohen, 1992; 2007).

Células T: origem, destinos e funções.

Inicialmente, os imunologistas acreditavam que existiam fundamentalmente dois tipos de respostas imunes dependentes da ação de células T CD4⁺. Uma era mediada por anticorpo e a outra mediada por células. Pouco progresso houve nessa área até meados da década de 80, quando técnicas de clonagem de células T foram desenvolvidas, muitas citocinas foram descritas e clonadas, e diversos ensaios se tornaram disponíveis.

Em estudos na década de 80, Mosmann e colaboradores descreveram que células T CD4⁺ podiam ser subdivididas funcionalmente em dois grupos: aquelas que secretam IFN- γ e aquelas que secretam IL-4. Com base nesses dados foi concluído que as células T CD4⁺ não eram um grupo homogêneo, mas apresentavam diversas populações supostamente distintas (Mosmann

et al., 1986). Na Figura 1 ilustramos 4 populações de células T CD4⁺, suas citocinas características, fatores de transcrição e vias importantes para sua diferenciação.

Figura 1. Principais destinos de células TCD4⁺ diferenciadas: citocinas críticas para suas diferenciações, citocinas características de cada subtipo celular e seus fatores de transcrição.

As primeiras descrições de diferenciação celular de linfócitos T, *in vitro*, foram relatadas em 1990. Primeiramente, foram descritos estudos nos quais células T *naïves* não produziam IL-4, porém, quando estimuladas pelo TCR, na presença de IL-4, essas células podiam se tornar grandes produtoras dessa citocina, em torno de 2 a 3 dias (Killar *et al.*, 1987; Le Gros *et al.*, 1990). Posteriormente, foi observado que para que ocorresse essa diferenciação, *in vitro*, era necessária a ativação de uma via de sinalização que incluía o receptor de IL-4, STAT-6 (fator transdutor de sinal e ativador da

transcrição, do inglês, *signal transducer and activator of transcription*) e o fator de ligação ao DNA GATA-3 (Zhang *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1997).

Parecia clara uma dicotomia entre a diferenciação de células Th2 por meio da ação de IL-4 e da diferenciação de células Th1 por meio da ação da IL-12. Contudo, a lógica da diferenciação foi se mostrando não ser tão simples. A neutralização de IFN- γ diminui a diferenciação de células Th1. Foi observado, então, que a IL-12 induz uma produção de IFN- γ , mediada pela expressão do fator de transcrição T-bet, levando a um aumento significativo na produção de IFN- γ . Esse IFN- γ atua como um mecanismo de *feedback* positivo (Szabo *et al.*, 2000; Lighvani *et al.*, 2001).

As células Th1 com uma ação próinflamatória foram implicadas na patogênese de muitas doenças autoimunes, como esclerose múltipla e artrite reumatóide. Entretanto, resultados neutralizando IL-12 e IFN- γ ou mesmo animais *knockout* para essas citocinas tinham diferentes efeitos na indução de EAE (encefalomielite autoimune experimental, do inglês, *experimental autoimmune encephalomyelitis*), modelo animal para esclerose múltipla (Cua *et al.*, 2003). Foi mostrado que animais *knockout* para a subunidade p40 da IL-12 eram resistentes ao desenvolvimento da EAE, enquanto que animais *knockout* de IFN- γ eram mais sensíveis. A identificação da IL-23, que é constituída pela subunidade p40 da IL-12 em conjunto com a cadeia p19, levou a vários questionamentos a respeito do papel da IL-12, IL-23 e das células Th1 no desenvolvimento da EAE (Cua *et al.*, 2003). Foi verificado, posteriormente, que a IL-23 desempenha um papel

central na indução da EAE, em alguns modelos, e devido à relação entre a IL-23 e a expressão de IL-17, uma nova linhagem de célula T foi identificada, a Th17 (Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). A descrição de que as células Th17 são distintas das células Th1 e Th2 baseia-se na observação de que as células Th17 não produzem as citocinas clássicas de um perfil Th1 ou Th2, produzem a citocina IL-17 e expressam baixos níveis dos fatores de transcrição T-bet e GATA-3. Outro fator é que as citocinas IL-4 e IFN- γ suprimem a diferenciação de células Th17 (Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). Posteriormente, foi mostrado que as células Th17 podiam, *in vitro*, ser induzidas por estimulação do TCR em conjunto com TGF- β e IL-6 (Bettelli *et al.*, 2006; Mangan *et al.*, 2006; Veldhoen *et al.*, 2006). Seguindo-se esses estudos iniciais, o fator de transcrição ROR γ T foi identificado como regulador de células Th17 (Ivanov *et al.*, 2006).

As células Th17 são inibidas por IFN- γ e IL-27, citocinas secretadas por células Th1, e atuam como mediadoras do recrutamento de neutrófilos para os sítios de inflamação. Essas células também são dependentes de IL-23 para sua sobrevivência e manutenção (Ivanov *et al.*, 2007; Mcgeachy *et al.*, 2008). Apesar de alguns pesquisadores apontarem a IL-23 como um fator importante apenas para a expansão de células Th17 (Afzali *et al.*, 2007), foi mostrado que a IL-23 é necessária para promover um fenótipo patogênico às células Th17, confirmando os estudos iniciais sobre a função indispensável de IL-23 nos modelos de doenças autoimunes induzidas por Th17. A via de sinalização STAT3/IL-6 é importante para o desenvolvimento de células Th17 (Mathur *et al.*, 2007).

Outro tipo de célula T descrita, com função supressora, foi resgatada pelo pesquisador Sakaguchi na década de 90. A essas células foi atribuído o nome de célula T reguladora e diversos subtipos dessas células têm sido descritos.

Células T reguladoras

As células com papel regulador têm sido alvo de muitas pesquisas ao longo dos anos. Uma das primeiras pesquisas, descritas por Gershon & Kondo, nesta área, surgiu na década de 70, então denominadas de células supressoras. Porém, foi somente a partir dos anos 90 que a existência destas células passou a ter uma aceitação maior por parte dos pesquisadores (Sakaguchi *et al.*, 1995).

Os diversos mecanismos responsáveis pela manutenção da homeostase imunológica têm despertado interesse da comunidade científica. Uma variedade de células tem sido descrita por apresentarem uma atividade reguladora, dentre elas, as células NKT (do inglês, *Natural Killer T cell*) (Seino *et al.*, 2001) e NK (Beilke *et al.*, 2005), células CD8⁺ (Filaci *et al.*, 2004), células CD8⁺CD28⁻ (Manavalan *et al.*, 2004), CD8⁺CD25⁺ (Cosmi *et al.*, 2003) CD4⁺CD25⁻ (Chattopadhyay *et al.*, 2006) e células T $\gamma\delta$ (Kapp *et al.*, 2004a; Kapp *et al.*, 2004b). Groux e colaboradores descreveram que células T antígeno específicas têm a capacidade de suprimir a proliferação de células T CD4⁺, em resposta a um determinado antígeno, prevenindo a ocorrência de colite autoimune em camundongos SCID (modelo de imunodeficiência severa combinada de camundongos, do inglês, *Severe*

combined immunodeficiency). Essas células foram chamadas de células T reguladoras tipo 1 (Tr-1)(Groux *et al.*, 1997).

Em 1994, Chen e colaboradores descreveram outro tipo de célula T com perfil imunorregulador, células T auxiliares tipo 3 (do inglês, *T helper 3*, Th3), capazes de inibir a proliferação de clones de células T por meio do fator de crescimento transformador β (TGF- β ; do inglês, *Transforming Growth Factor β*) (Chen *et al.*, 1994). Posteriormente, Sakaguchi e colaboradores identificaram, em 1995, um terceiro tipo de células T CD4⁺ expressando a cadeia α do receptor de IL-2 com capacidade de controlar células T autorreativas *in vitro* e *in vivo*. Esses estudos resultaram na identificação de uma população de células T que possuem uma atividade reguladora/supressora, sendo denominadas, nessa época, de células T CD4⁺CD25⁺.

A essas células foi atribuído o nome de células T reguladoras naturais e, atualmente, é a população de células com atividade reguladora mais estudada e melhor caracterizada. As células T CD4⁺CD25⁺ originam-se no timo e constituem cerca de 5-10% de todas as células T, no sistema murino, exibindo uma potente atividade reguladora tanto *in vivo* como *in vitro* (Sakaguchi *et al.*, 1995). Essas células T reguladoras suprimem a proliferação de células T CD4⁺ CD25⁻ e de células T CD8⁺, assim como a secreção de IFN- γ , tanto *in vitro* como *in vivo* (Piccirillo *et al.*, 2001). Células similares também foram encontradas em humanos (Dieckmann *et al.*, 2001). Essas células desempenham um importante papel na regulação da resposta imune através da inibição de células T autorreativas efetoras. Mais recentemente,

foi identificada nessas células uma alta expressão do fator de transcrição chamado Foxp3 (do inglês, *Forkhead Box P3*) (Fontenot *et al.*, 2003). O Foxp3 é um fator da proteína escurfina pertencendo à família de fatores de transcrição *forkhead* (Li *et al.*, 2004).

A expressão de Foxp3 em células T de camundongos é considerada um bom marcador das células T reguladoras, contudo, em humanos, Foxp3 pode ser induzido transitoriamente em células T ativadas, não sendo um marcador específico do estado de regulação, diferentemente do que é observado em camundongos (Walker *et al.*, 2003; Ziegler, 2006). Assim, apesar de ser importante para a função supressora das células T reguladoras, o Foxp3 pode ser induzido em células T ativadas via TCR (Mantel *et al.*, 2006). Ademais, em humanos, alguns tipos de células T reguladoras que não expressam Foxp3 foram relatadas (Roncarolo *et al.*, 2006). A regulação de sua expressão e sua importância dentro da população de células T reguladoras será descrito em maior detalhe posteriormente.

Nos estudos iniciais sobre a ontogenia de células T reguladoras acreditava-se que essas células reconheciam os autoantígenos expressos no timo com uma alta avidéz e, portanto, as células T reguladoras teriam uma avidéz maior por autoantígenos do que outras células que passaram pelo processo de seleção positiva e negativa (Jordan *et al.*, 2001; Apostolou *et al.*, 2002; Cozzo *et al.*, 2005). Apesar desses dados, em outros estudos foi sugerido que células T reguladoras podem também ser geradas a partir de interações de menor avidéz. Esses estudos, por meio da análise de repertório de TCRs, tanto em células T reguladoras como de células T não

reguladoras, permitiram identificar que tanto os TCRs presentes nas células T reguladoras como nas células T não reguladoras eram capazes de reconhecerem antígenos não próprios de forma similar (Pacholczyk *et al.*, 2006; Pacholczyk *et al.*, 2007). Esse dado permite a interpretação de que as células T reguladoras naturais, apesar de se diferenciarem através do reconhecimento de antígenos próprios, podem também regular a resposta imune a antígenos não próprios. Assim, a visão de que as células T reguladoras naturais parecem ter um papel central no controle de respostas autoimunes potencialmente patológicas, enquanto que as células reguladoras induzidas na periferia atuam no controle de respostas imunes exacerbadas não é bem adequada.

A manutenção e sobrevivência das células T CD4⁺CD25⁺ é regulada por IL-2 (Furtado *et al.*, 2002; Setoguchi *et al.*, 2005). O uso de anticorpos anti-IL-2 anula, *in vitro*, completamente a função supressora das células CD4⁺CD25⁺ e, *in vivo*, a sua neutralização inibe a proliferação homeostática de células T CD4⁺CD25⁺ periféricas em animais linfopênicos (Setoguchi *et al.*, 2005).

As células T reguladoras podem atuar suprimindo a resposta imune tanto por meio de fatores solúveis como TGF- β , IL-10 e IL-35 quanto por um mecanismo dependente de contato célula a célula, como mediado pelo CTLA-4 (Kingsley *et al.*, 2002; Read *et al.*, 2006; Collison *et al.*, 2007; You *et al.*, 2007). Novos mecanismos de supressão mediados pelas células T reguladoras têm sido descritos. Dentre eles: (i) a capacidade dessas células consumirem os fatores de crescimento presentes no microambiente levando

as células efectoras a entrarem em apoptose (Pandiyan *et al.*, 2007), (ii) mecanismo de tolerância infecciosa, conceito resgatado pelo pesquisador Waldman e colaboradores (Qin *et al.*, 1993; Waldmann *et al.*, 1998; Waldmann, 2008). Um exemplo recente de mecanismos de tolerância infecciosa no qual as células T têm capacidade de transferir atividade supressora para outros linfócitos pode ser observado na supressão por meio do cAMP (monofosfato cíclico de adenosina ,do inglês,*Cyclic adenosine monophosphate*), presente nas células T reguladoras, que é transferido, por junções do tipo *gap*, a outra célula, suprimindo sua resposta (Bopp *et al.*, 2007); (iii) supressão mediada pela ligação de adenosina, gerada por meio da regulação do catabolismo extracelular de ATP pelas células T reguladoras, a receptores purinérgicos acoplados à proteína G, presente em células T, induzindo supressão dessas células (Deaglio *et al.*, 2007); (iv) geração de células T reguladoras gerenciado por células dendríticas plasmocitóides expressando IDO (do inglês, *Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase*) que estimulariam a expressão de PD-L (do inglês, *Programmed Death ligand*) em outras células dendríticas induzindo apoptose de células efectoras que expressem PD-1 (do inglês, *Programmed Death 1*) (Sharma *et al.*, 2007).

Como pode ser observado pela grande variedade de mecanismos supressores, diversos são os caminhos para a tolerância e imunorregulação. É provável que diferentes indivíduos possuam diferentes mecanismos dominantes de regulação que os conduzam a diferentes desfechos em diversos processos imunológicos. A compreensão mais global desses

mecanismos pode gerar conhecimentos para que as intervenções clínicas sejam mais eficazes.

Fatores de Transcrição e sinalização intracelular em de linfócitos T

A ontogenia e diferenciação de diversas células do sistema imune são desencadeados por estímulos captados por receptores de superfície celular, culminando na deflagração de uma variedade de vias de transdução de sinais. Diversos são os caminhos que uma determinada célula pode percorrer para que se diferencie em um perfil celular com função efetora definida. Dentre os fatores importantes na etapa de diferenciação destaca-se o microambiente em que a célula está inserida e os fatores de crescimento ali presentes. Na Figura 2 esquematizamos algumas das possíveis vias de sinalização ativadas em um determinado microambiente e como essas vias convergem para promover a regulação da transcrição de Foxp3, conforme será discutido posteriormente.

Dentre as vias de sinalização necessárias tanto para diferenciação celular como para a função efetora de linfócitos T, o TCR desempenha um papel central. O reconhecimento antigênico pelo TCR em conjunto com receptores coestimuladores ativam uma variedade de vias de transdução de sinais. Os genes mais expressos pelos sinais desencadeados pelo reconhecimento antigênico são os alvos dos fatores de transcrição NFAT (Fator nuclear de ativação de células T, do inglês, *Nuclear factor of activated T-cells*)(Diehn *et al.*, 2002).

Figura 2. Representação esquemática da interação de células T com seu microambiente e os meios pelos quais sinais extracelulares são transduzidos para o interior da célula.

A sinalização intracelular pode ser dividida em diferentes etapas, as relacionados com a membrana plasmática, as vias citoplasmáticas e a atuação nuclear dos fatores de transcrição. Essas vias auxiliam na ativação de diversos fatores de transcrição como o NFAT, AP-1 e NF- κ B (fator nuclear kappa B, do inglês, *Nuclear Factor Kappa B*) (Abbas & Lichtmann, 2005).

O maior efeito do reconhecimento antigênico e da consequente mobilização intracelular de Ca^{2+} é a ativação do fator de transcrição NFAT que integra uma família de proteínas altamente fosforiladas residindo no citoplasma de células em repouso. A sinalização via TCR pelo reconhecimento do complexo peptídeo-MHC inicia-se com a fosforilação dos domínios ITAMs (imunorreceptores de ativação baseados em motivos de tirosinas, do inglês, *Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif*), presentes nas caudas intracitoplasmáticas das moléculas de CD3 e da cadeia ζ do complexo do TCR. Os eventos iniciais na sinalização via receptor de célula T são realizados por duas quinases da família Src, a Lck (proteína tirosina quinase leucócito específica, do inglês, *Leukocyte-Specific Protein Tyrosine Kinase*), que está constitutivamente associada com o domínio intracitoplasmático dos correceptores CD4 e CD8, e a Fyn que se associa aos domínios citoplasmáticos das cadeias ξ e do CD3. Ambas, Fyn e Lck, fosforilam ITAMs específicos das cadeias acessórias do complexo receptor de células T. Isso é importante para recrutar ZAP70 (proteína quinase 70 associada a cadeia zeta, do inglês, *Zeta-Chain-Associated Protein Kinase 70*) ao complexo do TCR, onde também é fosforilado. A

ZAP70 ativada fosforila LAT (adaptador de ativação de células T, do inglês, *linker activated T cells*). A fosforilação de LAT leva à mobilização de cálcio intracelular e à consequente defosforilação e ativação de NFAT, por uma defosfatase dependente de cálcio, a cálcio calcineurina. Isso permite a translocação do NFAT para o núcleo, onde se torna transcritionalmente ativo (Chiodetti *et al.*, 2006). No núcleo, o NFAT interage com o fator de transcrição AP-1 (Jun/Fos), induzindo a ativação da transcrição de diversos genes centrais na produção de uma resposta imune efetiva, incluindo a produção de citocinas (Dolmetsch *et al.*, 1997). Recentemente, foi descrito que NFAT interage também com o fator de transcrição Foxp3 e essa interação teria grande importância na geração de um fenótipo regulador em células T (Wu *et al.*, 2006).

Os receptores coestimuladores parecem não ser determinantes para a mobilização de cálcio e contribuem pouco para ativação de NFAT (Porcellini *et al.*, 2006). Assim, a ativação de NFAT ocorre em resposta aos sinais estimuladores do Ca^{2+} desencadeados, em sua maior parte, pela ligação ao TCR. Em contraste, a co-estimulação é crítica para a ativação ótima de NF- κ B e AP-1. A ligação ao TCR e os sinais coestimuladores ativam as vias JNK (quinase N-terminal cJun, do inglês, *c-Jun N-terminal kinases*), p38, MAP-quinase e I κ B quinase, aumentando os níveis nucleares de NF- κ B/Rel e AP-1 mais intensamente do que a estimulação apenas do TCR. O NFAT regula duas atividades contrastantes da função da célula T. Na presença de AP-1 promove ativação e na sua ausência anergia (Macian *et al.*, 2004).

Análises das três principais vias de sinalização do TCR (cálcio/NFAT, RAS/MAPK e IP3/PKC) mostram que todas elas estão atenuadas em células T tolerizadas (Chiodetti *et al.*, 2006). O primeiro bloqueio parece ser na atividade quinase de ZAP70, resultando na inibição da via cálcio/NFAT. Em contraste, foi observado que células T anérgicas apresentaram uma maior inibição da via RAS/MAPK, sendo a atividade de ZAP70 em conjunto com a ativação da via cálcio/NFAT pouco afetada, levando à ideia de que o processo de tolerância e anergia podem ser bioquimicamente distintos (Chiodetti *et al.*, 2006). O conceito de anergia, em que as células não proliferam frente à ativação, induz o pensamento de que as células T reguladoras poderiam ser consideradas como células anérgicas. Contudo, anergia reflete uma via de ativação interrompida que pode ser restabelecida, resultando em ativação e até mesmo respostas patológicas. Em contrapartida, as células T reguladoras são geradas de modo que suas vias são formadas com favorecimento para um perfil regulador. Outro fator é que a assinatura gênica (perfil gênico) entre uma célula T reguladora e uma célula anérgica é distinta, não podendo o conceito de anergia ser atribuído às mesmas populações celulares (Knoechel *et al.*, 2006).

O estímulo do TCR, conforme descrito, leva à ativação de diversas vias de sinalização. Essas vias agem em sinergismo com vias de sinalização ativadas por fatores de crescimento, como citocinas, para promover a diferenciação de linfócitos T *naïves* em uma variedade de diferentes tipos celulares, dentre esses as células Th1 e Th2. Estímulos por IL-4 ativam o

fator de transcrição STAT6 e polarização Th2, enquanto que o estímulo com IL-12 ativa STAT4 e induz a polarização para um perfil Th1(Steinman, 2007).

O fator de transcrição T-bet orchestra a manutenção do fenótipo de células Th1. A sua expressão está relacionada com a indução de expressão da citocina IFN- γ , sendo também detectada em uma variedade de outras células que produzem esta citocina, como as células T CD4⁺, CD8⁺ e NK (Glimcher *et al.*, 2004). Essas células produtoras de IFN- γ podem induzir a diferenciação de células T *naïves* em células Th1 (Das *et al.*, 2001; Martin-Fontecha *et al.*, 2004). Após a diferenciação a partir de células T CD4⁺*naïves*, o T-bet é seletivamente expresso em células Th1 e não nas Th2 (Agnello *et al.*, 2003).

A importância de T-bet na regulação da diferenciação de células Th1 foi confirmada em camundongos T-bet^{-/-}(Szabo *et al.*, 2000). As células T CD4⁺ desses camundongos possuem defeitos na resposta polarizada para Th1. No entanto, apesar de sua expressão estar associada a processos inflamatórios e produção de IFN- γ , foi descrito um papel protetor desse gene em modelo de colite, mas com sua participação na imunidade inata(Garrett *et al.*, 2007). Os autores descreveram que a deficiência de T-bet na imunidade inata na ausência de imunidade adaptativa (animal Rag^{-/-}) resulta em colite ulcerativa espontânea. Esse efeito parece ser devido a função de T-bet atuar inibindo a transcrição de TNF em células dendríticas colônicas. O TNF tem sua produção aumentada,por estímulo antigênico pelas bactérias residentes, o que levaria à quebra da barreira epitelial e, consequentemente,

ao desenvolvimento de colite. Nesse contexto, T-bet teria um papel de bloquear essa produção e proteger o desenvolvimento de colite (Garrett *et al.*, 2007). Isso mostra que um fator associado a processos inflamatórios pode, em determinados contextos, atuar de forma reguladora, acrescentado mais complexidade à forma pela qual o sistema imune funciona fisiologicamente.

O fator GATA-3 é necessário para o desenvolvimento de timócitos, expansão e proliferação de precursores de células T e diferenciação de células Th2. A sua deficiência bloqueia o desenvolvimento de células T no timo (Pandolfi *et al.*, 1995; Hendriks *et al.*, 1999). Ademais, esse fator é necessário para a efetiva produção de citocinas por células Th2 e está envolvido na repressão da produção de IFN- γ . A citocina IL-4 induz a expressão de GATA-3 por meio da ativação do fator de transcrição STAT6 (Schwenger *et al.*, 2005). Outros fatores também são necessários na diferenciação de células Th2 como o STAT5 e Gfi-1 (Zhu *et al.*, 2006).

A função exata de GATA-3 na diferenciação de células Th2 ainda não está completamente esclarecida, pois sua deficiência resulta em morte embrionária (Agnello *et al.*, 2003). O GATA-3 pode inibir a diferenciação de células Th1 por poder reprimir a expressão de STAT4. Por sua vez, T-bet inibe a expressão e função de GATA-3, fator de transcrição presente em células Th2, que poderia impedir o desenvolvimento de células Th1 (Usui *et al.*, 2006).

A STAT6 parece, também, desempenhar um importante papel na geração de células T reguladoras antígeno específicas induzidas na periferia (Sanchez-Guajardo *et al.*, 2007). Dois trabalhos descreveram atividades contraditórias envolvendo STAT6 na geração de células T reguladoras. Sanchez-Guajardo e colaboradores descreveram que o desenvolvimento dessas células requer o sinergismo entre os sinais mediados pelo TCR e por STAT6. Esses pesquisadores observaram que a ausência de STAT6 impede a geração de células T $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ e que camundongos transgênicos expressando uma forma ativa constitutiva de STAT6 apresentam um aumento de células T $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$. Isso estabelece um importante papel do fator de transcrição STAT6 e da via IL-4/STAT6 no desenvolvimento e manutenção de células T reguladoras periféricas. Em contraste, Takaki e colaboradores relataram uma característica repressora de STAT6 na indução de Foxp3 mediado por TGF- β (Takaki *et al.*, 2008). Apesar de dados contraditórios, pode-se dizer que STAT6, além de regular a diferenciação de células Th2, também está relacionado com a geração de células T reguladoras o que aumenta a importância desse fator de transcrição na regulação de respostas imunes e sua possível participação em processos de tolerância à aloenxertos, por exemplo.

Outro fator de transcrição que tem despertado interesse na comunidade científica, por estar relacionado tanto à resposta imunorreguladora como por propiciar o desenvolvimento de células Th17, é o STAT3. O fator de transcrição STAT3 regula, positivamente, múltiplos genes tidos como predominantemente imunorreguladores como IL-10, e

TGF- β como, também, regula negativamente genes predominantemente próinflamatórios como IFN- γ , IFN- β , IL-12, CD80, CD86 e MHC classe II (Takeda *et al.*, 1998; Stepkowski *et al.*, 2008). A maior contribuição para a regulação negativa de genes próinflamatórios baseia-se na via de sinalização ativada pela IL-10, que induz a fosforilação de STAT3 (Staples *et al.*, 2007). Apesar desses dados permitirem que seja atribuído uma possível função imunorreguladora a STAT3, esse fator de transcrição, ativado por IL-6, pode propiciar, na presença de TGF- β , a geração de células Th17, potencialmente próinflamatórias (Wilson *et al.*, 2007). Assim, quando se analisa essa via de sinalização, uma dicotomia em relação a uma atividade reguladora e uma inflamatória parece existir. É provável que a interação dessa via de sinalização com outras vias direcione uma resposta para um perfil predominantemente regulador ou predominantemente inflamatório.

Apesar da grande quantidade de informação sobre as vias de transdução de sinal relacionadas com a ativação ou a supressão da resposta imune, pouco se sabe sobre as vias responsáveis pela a geração de um fenótipo regulador em células T. Ademais, não existem estudos sobre quais as vias de transdução de sinal estariam relacionadas com a ativação de fatores de transcrição “tolerogênicos” em pacientes transplantados em estado de “tolerância operacional”. O estudo desses pacientes pode fornecer dados importantes sobre possíveis mecanismos de sinalização molecular potencialmente envolvidos neste estado de tolerância.

Dentre as vias relacionadas, as que regulam a expressão de Foxp3 têm uma grande importância, pois este fator está associado às células T

reguladoras naturais. A ativação da via PI3K-Akt, também conhecida por proteína quinase B (PKB), promove a fosforilação das proteínas Fox, tornando-as susceptíveis à exportação do núcleo, inibindo sua atividade transcricional (Lin *et al.*, 2004). O mapeamento do promotor de Foxp3 permitiu o mapeamento de regiões de ligação para os fatores de transcrição NFAT e AP-1, agindo em trans, e induzindo a transcrição de Foxp3 após estímulo via TCR (Mantel *et al.*, 2006). O Foxp3 pode se associar com a família de fatores transcricionais Rel, NFAT e NF- κ B, bloqueando suas ligações a promotores de genes alvos, incluindo de citocinas chaves como IL-2, 4 e IFN- γ (Bettelli *et al.*, 2005). Além disso, células T derivadas de camundongos escurfina^{-/-}, que não possuem a proteína Foxp3 funcional, têm um aumento significativo nas atividades dos fatores NFAT e NF- κ B quando comparadas com controles (Grundstrom *et al.*, 2004; Bettelli *et al.*, 2005). Assim, a repressão desses fatores por Foxp3 pode inibir a proliferação e função efetora de células T periféricas.

O TGF- β é capaz de induzir a expressão de Foxp3 e, consequentemente, um fenótipo regulador em células periféricas CD4⁺CD25⁻ tanto murinas como humanas, tendo pouco efeito em células T CD4⁺CD25⁺. O fator de transcrição Smad3 (do inglês, *Mothers against decapentaplegic homolog 3*), fosforilado e ativado pela ligação do TGF- β ao seu receptor, liga-se a um *enhancer* presente no gene de Foxp3, interagindo com NFAT nessa região, promovendo a transcrição de Foxp3 nessas células. Foi demonstrado que esse *enhancer* está conservado filogeneticamente em

diversas espécies de animais e, para que a transcrição de Foxp3 aconteça, a ligação de Smad3 nessa região é necessária (Tone *et al.*, 2008).

Outras vias também regulam a expressão do fator de transcrição, Foxp3. Em ensaios, *in vitro*, usando-se o gene de luciferase sob controle do promotor de Foxp3 mostrou-se que o fator de transcrição STAT-5 é um importante indutor da transcrição de Foxp3 (Burchill *et al.*, 2007). Dessa forma, em tese, um linfócito que se encontra em um ambiente contendo IL-2 e TGF- β , e reconheça um complexo peptídeo-MHC próprio ou não próprio pode expressar Foxp3 e se diferenciar em uma célula T reguladoraantígeno específica.

Os eventos transcripcionais e as vias de sinalização que controlam a tolerância de células T no contexto do transplante são pouco compreendidos. Uma melhor compreensão dessas vias e como estes fatores de transcrição atuam podem auxiliar no desenvolvimento de novas intervenções clínicas para o controle da rejeição, sendo essas terapias mais direcionadas a determinados tipos celulares minimizando a ocorrência de efeitos colaterais.

Resposta imune ao transplante

O transplante alogênico é o processo de transferência de células, tecidos ou órgãos de um indivíduo a outro, da mesma espécie, e é realizado nos casos em que há falência ou mal funcionamento irreversível de um órgão ou tecido. O principal desafio no sucesso de alotransplantes em humanos é a rejeição do enxerto. Para a sua prevenção e tratamento há a

necessidade do uso contínuo de imunossupressores. Apesar do extenso desenvolvimento de novas terapias imunossupressoras, o alto custo das drogas e, principalmente, seus efeitos colaterais ainda são um grande problema a ser superado.

A rejeição pode ser entendida como a deterioração funcional e estrutural do enxerto. De acordo com os padrões histopatológicos renais, a rejeição é classificada pelos critérios adotados após reunião em BANFF (CANADÁ) (Solez *et al.*, 2007). Baseado nos critérios de BANFF, a biópsia do rim transplantado pode ser classificada em normal, rejeição mediada por anticorpos, rejeição *borderline* (limítrofe), rejeição aguda mediada por células T e rejeição crônica mediada por células T. A rejeição mediada por anticorpos é caracterizada pela presença das alterações: C4d no enxerto renal, anticorpo antidoador (anti-HLA), características tissulares de rejeição aguda e piora de função renal. A *borderline* (limítrofe) é caracterizada pela suspeita clínica de rejeição aguda mediada por célula T, com focos de tubulite. A rejeição aguda mediada por células T caracteriza-se, histologicamente, pela infiltração intersticial de células mononucleares, rompimento da membrana basal tubular (tubulite) e necrose do músculo liso endotelial acompanhado por inflamação linfocitária. A rejeição crônica mediada por células T tem como característica a presença de fibrose intersticial, com infiltrado mononuclear e atrofia tubular (Solez *et al.*, 2007).

Os aloantígenos desencadeiam tanto respostas imunes celulares como humorais. Os genes polimórficos expressos codominantemente influenciam, entre outros fatores, no modo como o sistema imune do receptor irá

responder ao enxerto. As principais moléculas responsáveis por desencadear a rejeição de órgãos são as do MHC (complexo principal de histocompatibilidade, do inglês; *major histocompatibility complex*), altamente polimórficas e expressas em praticamente todos os tecidos e células nucleadas. As moléculas de MHC alogênicas são reconhecidas pelas células T do sujeito transplantado por três vias. Uma primeira é a via direta de alorreconhecimento que envolve o reconhecimento, por linfócitos T do receptor, de moléculas MHC intactas exibidas por células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês; *antigen presenting cells*) do doador ou por células do próprio enxerto. Na via de alorreconhecimento indireta os linfócitos T do receptor reconhecem peptídeos, derivados de moléculas de MHC alogênicas, que são processadas e apresentadas dentro de moléculas de MHC próprias, no contexto de APC do indivíduo transplantado. Os aloantígenos processados podem ser apresentados tanto por MHC classe I como MHC classe II e ativam predominantemente células T CD8⁺ e T CD4⁺, respectivamente (Rocha *et al.*, 2003). Outra via de alorreconhecimento é a semi-direta, que é o reconhecimento de moléculas MHC do doador presentes em células do receptor, adquiridas por essas células por meio de um fenômeno chamado de trogocitose, podendo ativar células T do receptor tanto pela via direta como indireta (Herrera *et al.*, 2004).

No transplante humano, a principal estratégia para reduzir a imunogenicidade dos enxertos tem sido minimizar as diferenças alogênicas entre doador e receptor mediante a seleção de doadores, além do uso de drogas imunossupressoras. Além disso, a análise de um painel de

aloanticorpos presentes no receptor também é realizada para a melhor seleção do par receptor-doador e para se diminuir a resposta imune ao enxerto. O sucesso atual do transplante de órgão baseia-se, em grande parte, no uso de moléculas imunossupressoras que são capazes de bloquear a ação de células do sistema imune. Contudo, seus efeitos colaterais são um grande desafio a ser superado, tais como mielossupressão, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, desordens metabólicas, entre outros (Demirkiran *et al.*, 2008). Essas terapias são eficientes no tratamento da rejeição aguda, mas apresentam poucos efeitos em relação à rejeição crônica. Assim, o desenvolvimento de novas terapias é, hoje, um importante foco da pesquisa científica neste campo.

O estudo das respostas imunes em indivíduos transplantados pode fornecer informações importantes sobre os caminhos para a imunorregulação no contexto do transplante, mesmo na presença de drogas imunossupressoras. Apesar de todos os transplantados apresentarem alorreatividade e ativação do sistema imune, uma grande diversidade de respostas pode ser observada. Alguns pacientes rejeitam o órgão prontamente, outros evoluem com rejeição crônica e outros apresentam melhor evolução do enxerto a longo prazo, com necessidade de pouca ou mesmo nenhuma imunossupressão. Este último grupo de pacientes, que se encontra em estado de “tolerância operacional”, contrasta com os pacientes que evoluíram com rejeição crônica e perda de função do enxerto. Considerando-se que, atualmente, não existe um protocolo terapêutico eficiente para o tratamento e controle da rejeição crônica, principal causa de

perda tardia do enxerto, uma melhor compreensão das diferenças imunológicas observadas entre indivíduos com rejeição crônica comparativamente a indivíduos tolerantes operacionais poderá ajudar na elucidação de possíveis mecanismos sobre este estado de tolerância.

Imunossupressão

Sem o uso de imunossupressão, órgãos transplantados são rapidamente rejeitados pelo sistema imune do receptor. As terapias imunossupressivas atuais reduzem eficientemente a resposta imune a aloantígenos, resultando em uma menor incidência de rejeição crônica. A maior parte das drogas imunossupressoras tem como alvo os sinais intracelulares envolvidos com a ativação de células T e apresentação de antígenos. Porém, as terapias de longa duração com imunossupressores levam à ocorrência de inúmeros efeitos colaterais que contribuem para a redução da sobrevida do órgão transplantado (Lopez, M. M. *et al.*, 2006).

As drogas imunossupressoras convencionais incluem corticosteróides, inibidores de calcineurina, anticorpos monoclonais, rapamicina, micofenolato mofetil, anticorpos depletors de células T, entre outros.

Os corticosteróides são hormônios pleitrópicos com ações anti-inflamatórias e imunorreguladoras. Os corticosteróides inibem a ação dos fatores de transcrição AP-1 e NF κ B, os quais estão envolvidos na transcrição de citocinas e quimiocinas, como IL-2, TNF, e IFN- γ . Há dados experimentais nos quais mostram-se que os corticosteróides não têm um impacto negativo nas células T reguladoras (Polanczyk *et al.*, 2004).

A ciclosporina e o tacrolimus são potentes inibidores da fosfatase calcineurina que é essencial para a ativação dos linfócitos. Através da inibição da calcineurina, essas drogas inibem a produção de IL-2 e outras citocinas, por meio da inibição da defosforilação e translocação nuclear de NFAT (Wu *et al.*, 2006). Isso pode resultar na inibição da indução de Foxp3, pois o NFAT induz a transcrição de Foxp3 (Baan *et al.*, 2005; Mantel *et al.*, 2006; Zeiser *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2007). Outro efeito deletério dos inibidores de calcineurina sobre as células T reguladoras baseia-se na inibição da transcrição de IL-2 que é importante para a função e homeostasia dessas células (Setoguchi *et al.*, 2005; Zeiser *et al.*, 2006; Burchill *et al.*, 2007).

Os anticorpos bloqueadores do receptor de IL-2 são agentes dirigidos contra a cadeia α do receptor de IL-2, o CD25. Dois agentes terapêuticos deste grupo são: o anticorpo monoclonal quimérico basilixmab e o anticorpo monoclonal humanizado daclizumab. Apesar do fato de a IL-2 ser fundamental para a homeostase das células T reguladoras, nenhuma conclusão pode ser feita sobre o efeito dos anticorpos monoclonais anti-CD25 nesta população de células, uma vez que os dados ainda são muito conflitantes (Baan *et al.*, 2005; Kreijveld *et al.*, 2007).

As moléculas derivadas da rapamicina, o sirolimus e o everolimus, são inibidores da via de sinalização desencadeados pela IL-2. Esses fatores agem no mTOR (do inglês, *mammalian target of rapamycin*) prevenindo a progressão do ciclo celular do estágio G1 para S (Wiederrecht *et al.*, 1992; Wiederrecht *et al.*, 1995). A rapamicina não interfere com a capacidade

supressiva das células T reguladoras (Game *et al.*, 2005; Coenen *et al.*, 2007). As células T reguladoras mostraram-se mais resistentes aos efeitos pró apoptóticos da rapamicina do que células T CD25⁻ (Coenen *et al.*, 2007). Experimentos, *in vitro*, com a rapamicina mostraram que houve a expansão seletiva de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, tanto humanas como de camundongos (Battaglia *et al.*, 2006; Coenen *et al.*, 2007; Strauss *et al.*, 2007). Em suma, existem dados experimentais nos quais indica-se de que a rapamicina favorece a sobrevivência e expansão de células T reguladoras e, por suprimir células T efectoras, pode ajudar no estabelecimento de um equilíbrio regulador que favoreça respostas reguladoras a estímulos alogênicos.

O MMF, micofenolato Mofetil, é um produto do ácido micofenólico (MPA; do inglês, *mycophenolic acid*), um inibidor da inosina monofosfatase desidrogenase. Essa enzima é um fator limitante na síntese, *de novo*, de nucleotídeos guanosina e, células T são dependentes desse via para a sua proliferação (Allison *et al.*, 2000). O MMF suprime a proliferação de células T estimuladas por antígenos (Allison *et al.*, 2000). Ademais, o MMF diminui a expressão de CD25 nessas células T de forma dose dependente (Thomson *et al.*, 1993). Há, na literatura, apenas um relato da relação de MPA com as células T reguladoras. Nesse estudo, *in vitro*, não houve alteração na expressão de Foxp3 e da capacidade supressora dessas células em resposta a MPA e, dessa forma, as células T reguladoras, aparentemente, funcionam normalmente na presença de MPA (Gummert *et al.*, 1999; Zeiser *et al.*, 2006).

Há dados na literatura nos quais tem sido sugerido que os benefícios clínicos de Anticorpos depletors de células T, ATG e Campath (anticorpo humanizado anti-CD52, Alemtuzumab), não resultam apenas de sua ação imunodepletora, mas também pela indução de células T reguladoras. Foi relatado que ATG promove uma rápida e estável expansão de células T reguladoras, *in vitro*, assim como aumento na expressão de Foxp3 (Lopez, M. *et al.*, 2006). Com base em estudos clínicos, sugere-se que a terapia com campath em conjunto com sirolimus, mas não ciclosporina A, é capaz de promover, *in vivo*, a expansão de células T CD4⁺CD25^{high} em indivíduos transplantados renais (Noris *et al.*, 2007). Estudos em nosso grupo, em que foi realizada a humanização do anticorpo anti-CD3, observou-se que, quando humanizado, esse anticorpo era capaz de causar uma mudança no padrão de citocinas produzidas, *in vitro*, com uma diminuição da produção de IFN- γ e manutenção da produção de IL-10, quando comparado com as versões não humanizadas, sugerindo um potencial papel imunorregulador desse anticorpo humanizado (Silva *et al.*, submetido). Com base no conjunto de dados publicados acredita-se, hoje, que anticorpos depletors de células T possam ser úteis na indução de imunorregulação e tolerância no transplante de órgãos sólidos e que, provavelmente, múltiplos mecanismos estão envolvidos nesse processo.

Tolerância operacional no transplante renal

Define-se tolerância operacional como um estado estável de sobrevivência do aloenxerto, por um período longo de tempo, com características histológicas e funcionais normais, em um receptor não imunossuprimido.

Outro estado importante é o do “quase” tolerante, no qual pacientes transplantados estáveis com longo tempo de transplante requerem o uso de baixas doses de imunossupressores (Ashton-Chess *et al.*, 2006). Existem poucos trabalhos na literatura sobre pacientes tolerantes operacionais e não se sabe ao certo quais mecanismos tolerogênicos esses pacientes conseguiram desenvolver para evitar a rejeição.

Nesse sentido, alguns estudos foram descritos. Em um trabalho realizado com 4 indivíduos transplantados renais e hepáticos, tolerantes operacionais, descreveu-se, em um ensaio *trans vivo* de hipersensibilidade tardia (DTH, do inglês, *Delayed-Type Hypersensitivity*), que 3 dos 4 indivíduos analisados não apresentaram respostas frente a antígenos HLA do doador (Vanbuskirk *et al.*, 2000). O único paciente cujas PBMC responderam a antígenos do doador, com uma reação de DTH, perdeu o enxerto após um período de 7 anos pós transplante. A resposta diminuída observada nesses 3 pacientes parece ter sido devido à ação imunossupressora de TGF- β e IL-10.

Outro estudo descreveu um aumento na população de células T CD4⁺CD25^{High} e da expressão de Foxp3 foi descrito após a diminuição gradual de imunossupressão em indivíduos transplantados hepáticos (Pons *et al.*, 2008). Observou-se que indivíduos que mantinham a função estável do enxerto ao longo da diminuição da imunossupressão tiveram um aumento de células T CD4⁺CD25^{High} e da expressão de mRNA do gene de Foxp3 comparados a indivíduos que apresentaram episódios de rejeição (Pons *et al.*, 2008). Nesse estudo, sugeriu-se que a imunossupressão pode afetar a

frequência de células T reguladoras em indivíduos transplantados e terapias que visem uma diminuição gradual da imunossupressão podem ter efeitos benéficos na indução de um perfil que favoreça a imunorregulação pelas células T reguladoras.

Em outro estudo, envolvendo um grupo de 5 pacientes transplantados renais tolerantes operacionais, mostrou-se que linfócitos T, do sangue, com um perfil alterado de TCR V β tiveram um acúmulo de transcrito, nessas células, das citocinas IL-10, IL-2, IL-13 e IFN- γ (Brouard *et al.*, 2005). Louis e colaboradores, analisando 4 indivíduos tolerantes operacionais renais, comparativamente com pacientes com rejeição crônica e indivíduos saudáveis, não observaram diferenças na imunofenotipagem entre indivíduos saudáveis e tolerantes operacionais. Esses autores também descreveram uma maior quantidade de células T CD4⁺CD25⁺ e maior expressão de mRNA de Foxp3 quando comparados com indivíduos com rejeição crônica (Louis *et al.*, 2006).

A identificação de marcadores gênicos tem sido mostrada como uma forte ferramenta na predição de rejeição crônica ou tolerância ao enxerto em humanos (Brouard *et al.*, 2007; Sawitzki *et al.*, 2007). Em Estudos realizados com transplante renal, em ratos, mostrou-se que os leucócitos infiltrantes durante a fase de indução de tolerância ou de rejeição possuem um perfil diferenciado com acúmulo de transcritos para os genes de α -1,2-manosidase e TOAG-1 (do inglês: *tolerance associated gene 1*) (Sawitzki *et al.*, 2007). Em humanos, uma busca por biomarcadores associados ao quadro de tolerância operacional ao aloenxerto renal foi realizada

analisando-se 75 indivíduos transplantados renais pertencentes a diversos grupos clínicos (Brouard *et al.*, 2007). Observou-se, por *microarray*, um grupo de 49 genes diferencialmente expressos nos indivíduos tolerantes operacionais em relação àqueles com rejeição crônica. Esses biomarcadores foram usados na predição de tolerância operacional e, 33 dos 49 genes foram capazes de diferenciar os indivíduos tolerantes operacionais dos com rejeição crônica. Essa “assinatura”, observada por esses pesquisadores, tem como padrão uma redução na transcrição de genes relacionados com sinalização coestimuladora, apoptose e resposta de células T de memória. Esses genes serão agora testados em um grupo de 200 pacientes com função renal estável e, aqueles que apresentarem o perfil de expressão semelhante àqueles dos pacientes em tolerância operacional, serão submetidos a uma diminuição gradual de drogas imunossupressoras, em estudo controlado (comunicação, Sophie Brouard, *13th International Congress of Immunology*, agosto de 2007).

Apesar da importância do estudo das vias de sinalização no contexto do transplante, existem poucos dados na literatura sobre como essas vias e os fatores de transcrição regulados por elas estão envolvidos no processo de rejeição e no de tolerância ao aloenxerto, tanto no transplante humano como em modelos animais. Também não existem estudos de vias de sinalização nos casos de tolerância operacional. O estudo da resposta imune em pacientes transplantados é uma fonte valiosa de informação para a melhor compreensão sobre a resposta imune no transplante e sobre como mecanismos imunorreguladores podem contribuir para perpetuar função do

órgão transplantado (Salama *et al.*, 2007; Berlanda *et al.*, 2008). Apesar da indução de tolerância em modelos animais ser bem sucedida, sua tradução para a clínica é lenta e nem sempre com resultados promissores. A determinação do perfil imunológico diferenciado em indivíduos que se encontram nesse estado, raro, de tolerância operacional, poderá contribuir para a elucidação dos caminhos que levam à tolerância ao aloenxerto em humanos.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Determinar o perfil molecular imunológico diferencial dos indivíduos com tolerância operacional em relação àqueles com rejeição crônica e com função estável do enxerto sob imunossupressão convencional. Visamos, dessa forma, identificar possíveis mecanismos e parâmetros para o diagnóstico deste estado de tolerância operacional.

Objetivos Específicos

Analisar, *ex vivo*, comparativamente, no sangue dos sujeitos de pesquisa pertencentes aos diferentes grupos de estudo:

1. A expressão gênica de um painel de moléculas predominantemente imunorreguladoras (receptor de TGF- β , TGF- β , Foxp3, IL-10, GATA-3) e pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF, T-bet), em dois momentos distintos.
2. A expressão da proteína Foxp3 em células T CD4⁺CD25⁺.
3. A fosforilação dos componentes das cascatas de sinalização: IL-4/STAT6 e IL-6/STAT3.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento Experimental

Sujeitos de Pesquisa

Os indivíduos estudados neste trabalho 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”* – Instituto do Milênio, CNPq (420166/2005 - 0). Dos pacientes estudados, 5 são provenientes do Rio Grande do Sul (PUC-RS) e o restante do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O sangue dos pacientes foi coletado, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A). Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital das clínicas da universidade de São Paulo (CAPPesp nº 0468/08) (Apêndice B).

Foram analisadas células de 10 indivíduos, adultos, saudáveis, doadores renais, de ambos os sexos (Grupo E) e 32 indivíduos pertencentes a 4 diferentes grupos clínicos (grupo A, grupo B, Grupo C e grupo D). Os indivíduos foram numerados conforme a ordem de entrada no estudo. Fizemos a coleta de 40 ml de sangue, desses indivíduos, em tubo contendo heparina e de 5 ml em tubo com EDTA mediante a assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido. Este projeto faz parte do projeto multicentrico integrante do Instituto de Investigação em Imunologia – iii intitulado “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.”

Grupo A – Pacientes estáveis com longo tempo de transplante (≥ 1 ano de transplante), sem uso de drogas imunossupressoras há pelo menos 6 meses – Tolerância operacional (TO).

Grupo B – Pacientes com baixa dose de imunossupressão e função estável do enxerto (BI).

Grupos C – Pacientes com longo tempo de transplante (≥ 1 ano de transplante) com rejeição crônica (RC) (diagnóstico através dos critérios de classificação das patologias do rim transplantado – Banff).

Grupo D – Pacientes estáveis com longo tempo de transplante (≥ 1 ano de transplante) com doses convencionais de imunossupressores (Est).

Grupo E – Indivíduos saudáveis – Doadores de rim (Sau).

Critérios para escolha dos pacientes

Baixas doses:

Tx renal: Azatioprina: $\leq 2\text{mg/kg}$, prednisona $\leq 0,12\text{ mg/Kg/dia}$; Ciclosporina $\leq 1,5\text{mg/kg/dia}$ (ou nível sérico no tempo zero $\leq 50\text{ng/ml}$), rapamicina $\leq 1\text{mg/dia}$ (ou nível sérico $\leq 5\text{ ng/ml}$), micofenolato mofetil $\leq 15\text{mg/kg/dia}$, micofenolato sódico 10 mg/kg/dia , tacrolimus $\leq 0,05\text{mg/kg/dia}$ (ou nível sérico $\leq 5\text{ ng/ml}$),

Função estável:

Tx renal: limite de clearance de creatinina $\geq 45\text{ml/min}$, não apresentando variação negativa de clearance $> 10\%$ nos últimos 6 meses ou níveis

considerados dentro da normalidade de creatinina sérica nos últimos 6 meses.

Obtenção de células mononucleares do sangue dos sujeitos de pesquisa

As células mononucleares foram isoladas a partir do sangue de indivíduos adultos saudáveis e indivíduos transplantados renais. O sangue foi obtido por punção venosa em tubos contendo como anticoagulante a heparina ou EDTA (BD, Becton Dickinson, NJ EUA).

As amostras de sangue coletadas foram diluídas 1:2 em solução salina isotônica e separadas em gradiente de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077g/l, Ficoll: Pharmacia Biotech, Sweden e Hypaque: Urografina 370, Schering, Brasil). Após centrifugação a 600g por 25 minutos, as PBMC foram coletadas, ressuspensas com solução salina e centrifugadas a 600g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sedimento celular foi lavado duas vezes. Nessas lavagens as células foram ressuspensas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) e centrifugadas novamente a 600g por 8 minutos. As células foram ressuspensas em 10 ml de meio DMEM e centrifugadas a 200g por 8 minutos para a remoção de plaquetas. As células foram ressuspensas em 3 ml de meio DMEM acrescido de 10% de soro humano normal inativado, suplementado com 2 mM L-Glutamina, 10 mM HEPES, 0,1 ng/ml de Perflacina (Rhodia, SP-Brasil), 1 mM de Piruvato de Sódio (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) (DMEM completo). A concentração celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

Congelamento e descongelamento de células

As suspensões de células mononucleares foram centrifugadas a 600g por 8 minutos e ressuspensas (5 a 20×10^6 células/ml) em solução de congelamento contendo 90% de soro fetal bovino inativado (SFBi, Imunoquímica, RJ, Brasil), e 10% dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, Missouri EUA). Alíquotas de 1 ml foram distribuídas em tubos de congelamento previamente resfriados, que foram então transferidos para os tanques de nitrogênio líquido. Para o descongelamento, os tubos foram transferidos do nitrogênio líquido para o banho-maria a 37°C, por alguns minutos. Esta suspensão de células foi transferida para outro tubo contendo 10 ml de meioDMEM(Sigma-Aldrich, Missouri EUA) enriquecido com 10 mM de Hepes (Sigma-Aldrich, Missouri EUA), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich, Missouri EUA), 1 mM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich, Missouri EUA), 40 µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich, Missouri EUA), 0,1 ng/ml de cefalosporina (Peflacin®, Rhodia, SP, Brasil) e 10% de soro humano inativado (DMEM suplementado). Após duas centrifugações a 600g por 8 minutos, a viabilidade celular foi determinada através do corante vital Azul de Tripan (MCB Manufacturing Chemists Inc., Cincinnati, OH, EUA).

PCR em Tempo Real

Extração de RNA

O RNA foi extraído pelo método descrito por Chomczynski, o qual utiliza-se a solução de Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) para isolamento de RNA total(Chomczynski *et al.*, 1987). Trizol é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que rompe as

células mantendo a integridade do RNA. Foi adicionado 1 ml de trizol para $1-4 \cdot 10^6$ células. Incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse período foram adicionados 200 μ l de clorofórmio RNAse free, puro, por ml de trizol. Após agitação e incubação por 3 minutos à temperatura ambiente, centrifugou-se a 13000g, por 15 minutos a 4° C. Após a centrifugação há uma separação de fases e o RNA se encontra localizado na fase aquosa. Essa fase foi transferida para um novo tubo e precipitada com 1000 μ l de álcool isopropil por ml de trizol. Incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se por 13000g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 1 ml de etanol 70%. Centrifugou-se a 13000g por 5 minutos a 4° C. O sedimento foi ressuspensionado em 12 μ l de água tratada com DEPC q.s.p (Invitrogen, CA, USA). Desse estoque, 1 μ l foi usado para a quantificação em espectrofotômetro e 1 μ l para análise em gel de agarose 1,2%. Este material foi mantido a – 80°C até o momento da transcrição.

Quantificação de RNA

Após a extração, o RNA obtido foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro (Beckman, Fullerton, CA, USA) nos comprimentos de onda (λ) de 260 e 280 nm. O grau de pureza da amostra foi verificado através da análise da relação entre 260 e 280nm. Sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores de razão maiores que 1,7. Para o cálculo da concentração da amostra considerou-se que a densidade óptica (DO) igual a 1 corresponde a 40 μ g de RNA / ml no comprimento de onda de 260 nm (Sambrook & Russel, 2001).

Uma alíquota de RNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1,2%, RNAse free, para a visualização da integridade das amostras, observando as duas subunidades do RNA ribossômico, 18S e 28S, e também possíveis contaminações com DNA. Como marcador de massa moléculas usou-se o High DNA Mass ladder (Invitrogen, CA, USA). As amostras com RNA degradado foram descartadas e recoletadas.

Tratamento com DNAase

As amostras de RNA foram tratadas com DNAase para que não houvesse interferência do DNA na PCR em tempo real. Foi usado 1 µl da enzima DNAase-I por 1 µg de RNA. Foram adicionados 3 µl de DNAase, 3 µl de tampão 10x RNAase free e 3 µg de RNA, completando-se o volume com água tratada com DEPC q.s.p para 30 µl. A amostra foi incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período, adicionou-se uma solução de EDTA para bloqueio, misturou-se e incubou-se por 10 minutos a 65° C.

Transcrição reversa

Após a constatação da qualidade e pureza do RNA, a transcrição reversa foi feita com 3µg de RNA total utilizando-se a enzima transcriptase reversa (Super-script II™ Reverse Transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para este protocolo foi adicionado ao RNA 1µl de oligo dT (500 µg/ml), 1µl de dNTP (2,5mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, resultando em uma concentração final de 10mM) e água 20µl. Esta mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos em termociclador (MJ research, Inc., Watertown, MA,

USA). Em seguida, foram adicionados ao tubo de reação 4µl de tampão de transcrição 5x, 2µl de DTT 0,1M e 1µl de inibidor de RNase (40U/µl) (RNase OUT™, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram, então, colocadas em termociclador a 42°C por 2 minutos, nessa etapa fez-se uma pausa para a adição da enzima transcriptase reversa (200U/µl). Após essa pausa a reação continuou a 42°C por 50 minutos seguidos de 70°C por 15 minutos.

Reação de PCR em tempo real (RT-PCR)

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços, usando o reagente “SYBR-Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o equipamento “Perkin-Elmer ABI Prism 7500 Sequence Detection System”. A reação foi realizada em 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C, de acordo com o manual de instruções do fabricante ABI PRISM 7500. A determinação da intensidade de fluorescência na reação foi feita pelo cálculo do ΔRn ($\Delta Rn = Rn+ - Rn-$), onde $Rn+$ = intensidade de emissão do SYBR Green / intensidade de emissão do ROX em um dado momento da reação, e $Rn-$ = intensidade de emissão do SYBR Green / intensidade de emissão do ROX, antes da amplificação. O composto ROX é utilizado como controle interno passivo, pois a sua intensidade de fluorescência é emitida de forma constante durante toda a reação. Durante os ciclos iniciais da reação não há acúmulo de produtos de amplificação e os valores de ΔRn permanecem na linha de base (fluorescência do ROX > SYBR Green). Na fase logarítmica da reação ocorre acúmulo dos produtos de amplificação e a ΔRn ultrapassa

a linha de base. Para a quantificação relativa, foi estabelecido um valor de ΔR_n que seria uma linha de corte (*Threshold*) para cada curva de amplificação de um dado par de iniciadores. O número do ciclo em que a ΔR_n cruza o *threshold* corresponde ao C_t (*cycle threshold*) da amostra. O valor de C_t é preditivo da quantidade de mRNA alvo presente na amostra. O cálculo da quantificação relativa (QR) foi feito pelo método de Pfaffl, (Pfaffl, 2001) e utilizando-se como gene de referência o GAPDH (D-gliceraldeído 3-fostato desidrogenase). Consideramos maior ou menor expressão todo o valor de QR >2 ou QR <0,5, respectivamente, em relação à expressão nos indivíduos saudáveis.

A fórmula utilizada para a quantificação relativa (QR) é:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{P_{\text{target}}(\text{control-sample})}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{P_{\text{ref}}(\text{control-target})}}}$$

Onde: $\Delta CP = C_t$ Controle (doadores renais saudáveis) – C_t amostra (indivíduos transplantados renais). Ref representa o GAPDH. $\Delta CP_{\text{Target}}$: a diferença de C_t s dos genes de interesse. *Target* (parte inferior): C_t do GAPDH do indivíduo transplantado renal a ser analisado. E_{target} : eficiência do gene de interesse. E_{ref} : eficiência do controle endógeno, GAPDH.

Desenho e padronização dos iniciadores

Os iniciadores utilizados nas reações de amplificação foram desenhados pelo programa *Primer Express* (Applied Biosystems, EUA). O tamanho dos iniciadores variou de 18 a 26 bases. O tamanho dos produtos de amplificação gerados variou de 86 a 159pb e 75-90°C de T_m (temperatura de anelamento).

A concentração de uso de cada par de sequências de iniciadores foi padronizada em reações de RT-PCR em tempo real, utilizando-se as amostras de PBMC de indivíduos saudáveis sendo testadas as concentrações de 100nM, 200nM e 300nM, para cada par de iniciadores. Após as reações de PCR em tempo real foi observado o valor de Ct de cada reação para cada concentração de iniciadores e escolheu-se a concentração que apresentava o menor valor de Ct. O valor de Ct é preditivo da quantidade de mRNA alvo presente na amostra. Dessa forma, a concentração de uso de cada iniciador foi escolhida baseando-se no valor de Ct, de forma que a concentração de cada par de “iniciadores” não fosse um fator limitante da reação.

Especificidade e adequação dos iniciadores

A especificidade dos “iniciadores” desenhados pelo *Primer Express* foi avaliada pela curva de dissociação. Para isso, após a reação, a placa foi submetida a um segundo programa: 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 95°C por 1 minuto. A curva de dissociação consiste na monitorização da fluorescência das amostras em relação ao aumento de temperatura. A fluorescência das amostras decresce com o aumento da temperatura, pois à medida em que as pontes de hidrogênio, que mantêm as duplas fitas unidas, se rompem (devido ao aumento de temperatura), o *SYBR-Green* é liberado. A fluorescência é emitida somente quando o DNA está em dupla fita. Assim, quando observamos somente um pico de fluorescência em uma dada temperatura significa que houve amplificação de um produto específico. Esta temperatura é a temperatura de anelamento (T_m) do

produto de amplificação (*amplicon*). Os iniciadores utilizados estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências dos iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real

	FORWARD	REVERSE
Foxp3	GTGGGCCTGCATGGCAC	GAGAAGGGCAGGGCACAAT
GATA3	AGCACAGAAGGCAGGGAGTGT	TGATAGAGCCCGCAGGCG
T-bet	GGATGCGCCAGGAAGTTTCA	GACTGGAGCACAATCATCTGGG
IL-10	AATCGATGACAGCGCCGTAG	CCAAGCTGAGAACCAAGACCC
TNF	TAGCCCATGTTGTAGCAAACCT	TCTCTCAGCTCCACGCCATT
IFN- γ	GTGTGGAGACCATCAAGGAAGACA	TTGGACATTCAAGTCAGTTACC
SOCS3	CTTCTCTCTGCAGAGCGATC	TGGTCCAGGAACCTCCGAAT
IL-4R α	CCCAGTGCCCTCTACTCTCAT	AAATCGTGAACCTTTGTCTCCGT
GAPDH	TGGTCTCCTCTGACTTCAACA	AGCCAAATTCGTTGTCATACC
TGF- β	GGTGGAAACCCACAACGAAAT	TCTCGGAGCTCTGATGTGTTGA
TGF- β R	GATTGTTGGTACCCAAGGAAAGC	AAGTCTGCAATACAGCAAGTTCCAT

Critérios de Validação

Os critérios de validação interna das reações de PCR em tempo real foram: **(i)** RNA íntegro visualizado em gel de agarose 1,2%, **(ii)** presença de controles brancos adequados, sem amplificação, **(iii)** curva de amplificação com padrão exponencial e com platô, com o seu início de aumento antes do Ct de 30, **(iv)** curva de dissociação adequada com pico único, **(v)** ocorrência de amplificação do gene de interesse com Ct de até 35, **(vi)** triplicatas do ensaio com diferenças entre elas < 1 Ct. Nos casos em que uma das triplicatas não atendeu os critérios de validação, ela foi excluída e as análises realizadas com as médias dos outros dois Cts, desde que dentro dos critérios de validação e com uma diferença entre elas $< 0,5$ Ct.

Detecção intracelular de Foxp3

Neste ensaio, usou-se o kit para marcação intracitoplasmática da eBioscience® (Human Regulatory T Cell Staining Kit). Inicialmente, 1.10^6

células foram ressuspensas em 100µl de PBS 1X 2%FCS(Soro fetal bovino, do inglês, *calf fetal serum*). Fez-se a marcação de superfície com o mix de anticorpos anti-CD4 FITC e anti-CD25 APC, incubando-se por 30 minutos a 4° C no escuro. Após centrifugação e descarte do sobrenadante as células foram fixadas com uma solução de Fixação/Permeabilização 1x fornecida pelo kit. Incubou-se por 1 hora no escuro em gelo. Após esse período adicionou-se 1 ml de PBS 2%FCS gelado e centrifugou-se por 10 minutos a 600g, descartando-se o sobrenadante. Adicionaram-se 200µl de tampão de Permeabilização 1x e centrifugou-se a suspensão por 10 minutos a 600g, descartando-se o sobrenadante. Repetiu-se esse passo mais uma vez. Após a segunda centrifugação, descartou-se o sobrenadante, agitou-se vigorosamente e adicionaram-se 8 µl do anticorpo anti-Foxp3 PE, incubando-se por 30 minutos no gelo e no escuro. Após essa etapa, lavaram-se 2 vezes as células com 200 µl de tampão de Permeabilização. Após a segunda lavagem o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 300 µl de tampão Facs (PBS 1X 2%FCS). Em seguida, fez-se a aquisição em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, NJ, EUA). Um total de 200000 células foram adquiridas na região de linfócitos. A análise e compensação foi realizada no software FloJo 8.7.4. (Tree Star inc., Ashland, OR, EUA). O número absoluto de células foi calculado com base no hemograma proveniente do mesmo dia em que o sangue foi coletado.

Citometria de fluxo – PHOSFLOW

Avaliação das vias IL-4/STAT6 e IL-6/STAT3

Após a contagem celular na câmara de Neubauer, foram adicionadas, para padronização, 1.10^6 , 2.10^6 , 3.10^6 e 6.10^6 células, por condição, em tubos Facs. Devido ao número excessivo de lavagem, esse ensaio foi realizado para se buscar o número mínimo de células necessário para a realização do ensaio. Após essa etapa, estabeleceu-se um número mínimo de 2.10^6 células. As células foram centrifugadas por 5 minutos a 600g. Adicionaram-se 300 µl de meio RPMI 10% SFC pré aquecido a 37° C. Para a padronização, foram testadas diferentes concentrações de IL-4 - 3ng, 5ng e 10ng e, de IL-6 - 2ng, 5ng e 10ng (BD , Becton Dickinson, NJ, EUA). Como controle positivo usaram-se 20ul de H₂O₂ (água oxigenada). Fez-se uma cinética de fosforilação dos fatores de transcrição nos tempos de 12, 15 e 30 minutos. Após os ensaios de padronização escolheu-se o tempo de 15 minutos e uma concentração de 3ng de IL-4 e de 5 ng de IL-6.

Permeabilização

Após o estímulo, as células foram fixadas acrescentando-se 300ul de paraformoldeído 4% e incubadas por 10 minutos a 37° C. Após esse período, centrifugaram-se as amostras a 600g por 5 minutos. Adicionou-se 1 ml de metanol 90% gelado e incubou-se no gelo por 30 minutos. Em seguida, adicionaram-se 10 ml de PBS 1x e centrifugou-se a suspensão por 7 minutos a 600g. Após descarte do sobrenadante, adicionaram-se 100 µl de PBS 2% SFCe incubou-se a suspensão por 15 minutos à temperatura ambiente para reidratação.

Marcação intracelular e de superfície

Após a reidratação, acrescentaram-se 200 µl de tampão de lavagem FCS (PBS 1X 2% SFC) e centrifugou-se a suspensão por 5 minutos a 600g. Descartou-se o sobrenadante, resuspendeu-se o sedimento em tampão de lavagem FCS e centrifugou-se a suspensão por 5 minutos a 600g. Descartou-se o sobrenadante, resuspendeu-se o sedimento celular e acrescentaram-se, tanto nas células estimuladas como não estimuladas, 25 µl de anticorpo anti-CD3 FITC, 1:50, (BD , Becton Dickinson, NJ, EUA), 25 µl do anticorpo anti-CD4 PerCp, 1:10, (BD , Becton Dickinson, NJ, EUA) e, dependendo do estímulo, 25 µl de PE *mouse* anti-pSTAT6 pY641 (BD , Becton Dickinson, NJ, EUA) ou PE *mouse* anti-pSTAT3 pY705 (BD , Becton Dickinson, NJ, EUA). Incubou-se a suspensão por 30 minutos no gelo e no escuro. Após esse período, lavou-se três vezes com tampão de lavagem FCS e, após a última centrifugação, resuspendeu-se o sedimento celular em 400 µl de tampão de lavagem FACS. Em seguida, fez-se a aquisição da amostra no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD , Becton Dickinson, NJ, EUA). A compensação e análise dos dados foram feitas no programa FlowJo 8.7.4. (Tree Star inc., Ashland, OR, EUA) . Um total de 200000 eventos foram adquiridos na região de linfócitos. O cálculo do aumento da fosforilação de STAT3 e STAT6 foi feito comparando-se as condições com e sem estímulo.

Análise estatística dos dados.

Para a análise dos resultados, utilizamos os seguintes testes: 1way ANOVA, para comparação dos diferentes grupos de estudo, e 2way ANOVA para avaliação da expressão gênica ao longo do tempo nos diferentes grupos de estudo. As análises estatísticas foram feitas com os programas: Prism 5.0 (GraphPad Software inc., CA, EUA). para as análises de 1way ANOVA, e o programa Statistica 8.0 (STATSoft inc., OK, EUA), para as análises de 2way ANOVA.

4. RESULTADOS

Sujeitos de Pesquisa: Dados Clínicos

No presente trabalho, foram estudados 10 doadores renais saudáveis e 32 indivíduos transplantados renais. Desses 32 indivíduos transplantados renais temos: em estado de tolerância operacional (TO, n=4), com rejeição crônica do enxerto, diagnosticados por biópsia (RC, n=11), seguindo os critérios de Banff (Solez *et al.*, 2007), transplantados renais com função estável do enxerto e imunossupressão convencional (Est, n=12) e indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto e baixa imunossupressão (BI, n=5, critérios em Material e Métodos). O sangue desses indivíduos foi processado e armazenado conforme descrito em Material e Métodos.

Nos indivíduos analisados, neste estudo, a glomerulonefrite crônica foi a doença de base mais comum (16 dos 32 indivíduos transplantados renais), embora várias outras doenças de bases tenham sido observadas (Tabelas clínicas individuais no anexo A). Não houve diferença, entre os diferentes grupos de estudo, em relação a transfusões sanguíneas, sexo, idade, gestações e tipo de diálise no que diz respeito à evolução clínica e desfecho para rejeição crônica ou tolerância operacional (Tabela 2 e Tabelas no Anexo A). O grupo de indivíduos com rejeição crônica apresentou uma maior frequência de doadores cadavéricos (7/11) quando comparado com todos os outros grupos de estudo (2/12 Est, 1/4 TO, 1/5 BI) (Tabela 2). Achado semelhante foi observado com a ocorrência de função retardada do

enxerto, o tempo de isquemia e o desenvolvimento de rejeição crônica. Apenas 2 indivíduos que receberam rins de doadores cadavéricos não apresentaram função retardada do enxerto, apesar de longos tempos de isquemia terem sido observados (RC24 e BI30) (Tabela 2 e Tabelas clínicas individuais no anexo A).

Em relação à imunossupressão, não foi observada uma associação entre os diferentes esquemas imunossupressivos e a evolução do enxerto nos diferentes grupos. Entretanto, quando foi analisada a realização de terapia de indução, com os anticorpos daclizumab (anticorpo humanizado anti-CD25), Basiliximab (anticorpo quimérico anti-CD25) e ATG (globulina anti-timocitaria), observamos que 11 dos 12 indivíduos do grupo Est foram submetidos à terapias com algum desses anticorpos (Tabela 2). Também observamos, no grupo de indivíduos com rejeição crônica, uma maior frequência de rejeição aguda quando comparada àquela de todos os outros grupos de estudo (8/11 RC, 4/12 Est, 1/4 TO e 2/5 BI) (Tabela 2). Os dados clínicos individuais de todos os indivíduos transplantados renais estudados encontram-se no anexo A.

Como indicador da função renal, usou-se a concentração de creatinina sérica. A referência de normalidade considerada para mulheres é de 0,5 a 1,0 mg/dl e para homens de 0,7 a 1,2 mg/dl. Os indivíduos com rejeição crônica apresentaram um valor médio de creatinina maior do que o observado tanto para os indivíduos em tolerância operacional, indivíduos com baixa imunossupressão, indivíduos estáveis com imunossupressão convencionale doadores renais saudáveis ($p < 0,05$) (Figura 3). Um dos

indivíduos com rejeição crônica (RC2) perdeu o enxerto e apresentou o maior valor de creatinina sérica (5,8mg/dl), mesmo quando comparado com os outros indivíduos pertencentes ao mesmo grupo clínico. O grupo dos indivíduos com rejeição crônica apresentou uma maior frequência de indivíduos com proteinúria quando comparado aos outros grupos de estudo (6/11 RC, 4/12 Est, 0/4 TO e 0/5 BI).

Figura 3. Função do enxerto renal nos diferentes grupos clínicos. Valor de creatinina sérica sanguínea nos indivíduos com rejeição crônica (RC, n=11), tolerantes operacionais (TO, n=4), estáveis (Est, n=12), baixa imunossupressão (BI, n=5) e doadores renais saudáveis (Sau, n=10). Creatinina, faixa de normalidade: mulheres -0,5 a 1,0 mg/dl e homens - 0,7 a 1,2 mg/dl. Estão representadas as média $\pm$ SEM.***($p < 0.001$).

TABELA 2. História clínica dos diferentes indivíduos transplantados renais.

Sujeitos de Pesquisa	TO1	TO2	TO3	TO4	Grupo BI (n=5)	Grupo RC (n=11)	Grupo EST (n=12)
Idade (anos)	53	42	43	49	61 ± 12	44 ± 14	47 ± 10
Sexo (F/M)	M	M	F	F	3/ 2	3/ 8	6/6
Numero de transplantes	1	2	1	1	1 (n = 5)	1 (n = 11)	1 (n = 11) 2 (n = 1)
Tempo de transplante (anos)	23	5	7	23	15 ± 9	8 ± 3	5 ± 6
Terapia de indução					1/5	5/11	11/12
	ND	Basilixmab	N	N	Basilixmab = 1	Basilixmab = 2	Basilixmab = 5
						ATG = 1	ATG + IVIG = 1
						Daclizumab = 2	Daclizumab = 5
Disparidade HLA	3	4	0	0	3,4 ± 1,14 (n=1) *	4,72 ± 1,34	3,83 ± 1,26
Doador (Vivo/Cad)	Vivo	Cad	Vivo	Vivo	4/1	4/7	10/2
Transfusão sanguínea (S/N)	ND	S	N	S	4/5	5/11	4/12
Episódio de rejeição aguda (S/N)	N	S	N	N	2/5	8/11	4/12
Infecção viral (S/N)	ND	S	ND	N	2/5	5/11	4/12
Razão da interrupção da IS	Não aderência	Não aderência	Não aderência	Não aderência	NA	NA	NA
Tempo sem IS (anos)	6	1,5	4,10	8	NA	NA	NA

TO: indivíduos com Tolerância operacional; BI: indivíduos com baixa imunossupressão; RC: indivíduos com rejeição crônica; indivíduos com EST: função estável do enxerto e imunossupressão convencional. ND: Não disponível. NA: Não se aplica. IS: imunossupressão. F/M: feminino/masculino. S/N: Sim/Não. Dados representados como media ± desvio padrão. Balixmab: anticorpo humanizado anti-CD25. Daclizumab: anticorpo quimérico anti-CD25. ATG: globulina anti-timocítica. IVIG: imunoglobulina intravenosa. HLA: antígeno leucocitário humano. Cad: doador cadavérico. * Disparidade HLA não disponível para: 1 indivíduos, grupo BI).

Análise do perfil transcricional imunológico dos indivíduos transplantados, por PCR em tempo real

Foram coletados 5 ml de sangue em tubo contendo EDTA para separação celular, contagem de PBMC e extração do RNA, conforme descrito em Material e Métodos. O RNA foi analisado em gel de agarose 1,2% para a confirmação de sua integridade e concentração por meio da visualização das bandas 18S e 28S dos RNAs ribossômicos (Figura 4). Após essa etapa, iniciou-se a transcrição reversa e a PCR em tempo real.

Figura 4. Visualização da integridade do RNA em Gel de agarose 1,2%. Pode-se visualizar as subunidades 28S e 18S do RNAm ribossomal. As amostras são provenientes de três indivíduos transplantados renais com rejeição crônica (TO3, RC4 e RC5). Todas as amostras tiveram o mesmo padrão de qualidade. Como marcador de massa molecular usou-se o *High DNA Mass Ladder* (Invitrogen) para a quantificação das amostras e a confirmação da quantificação e pureza realizada no espectrofotômetro.

Os protocolos utilizados para a padronização da concentração de cDNA dos genes de GAPDH, GATA-3, T-bet, Foxp3, IL-10, IFN- γ , TNF, TGF- β e do receptor de TGF- β e seus respectivos iniciadores estão descritos em Material e Métodos. Após a padronização da concentração dos iniciadores e do cDNA, realizou-se a PCR em tempo real para esses genes

em 10 doadores renais saudáveis e 32 indivíduos transplantados renais. Dos indivíduos transplantados renais, 22 foram analisados de forma sequencial e serão descritos posteriormente.

Todos os resultados apresentados aqui são oriundos de experimentos que preencheram os critérios de validação para PCR em tempo real (ver Material e Métodos). Dentre esses critérios, tem-se a curva de dissociação que permite verificar a especificidade do par de iniciadores para a amostra a ser amplificada. Iniciadores específicos para uma única sequência de nucleotídeos devem apresentar uma curva de dissociação do produto amplificado com pico único. Na Figura 5 mostramos a curva de dissociação para o gene do TGF- β . Todos os outros genes apresentaram curvas de dissociação semelhantes em todos os indivíduos analisados, nos anexos encontram-se um exemplo de uma curva de dissociação dos outros genes analisados (Anexo B).

Figura 5. Curva de dissociação para iniciadores de TGF- β . Dissociação do amplicon do TGF- β com um pico único e com T_m de 79 °C, preenchendo um dos critérios de validade da PCR (descritos em material e métodos). Um exemplo de uma curva de dissociação para cada gene analisado encontra-se no Anexo B.

Nosso objetivo, neste bloco experimental, foi avaliar, comparativamente, o perfil de um painel de genes predominantemente imunorreguladores (REGULA) e predominantemente pró-inflamatórios (INFLAMA) expressos, *ex vivo*, em células do sangue de indivíduos em estado de tolerância operacional (TO), rejeição crônica (RC), estáveis com imunossupressão convencional (Est) e os indivíduos com baixa imunossupressão (BI) relativo a expressão nos doadores renais saudáveis (Sau). Os genes avaliados tidos como predominantemente REGULA foram o receptor de TGF- β , TGF- β , IL-10, Foxp3 e GATA3 e os tidos como predominantemente INFLAMA o IFN- γ , o TNF e o T-bet.

A expressão relativa foi calculada pelo método de Pfaffl, conforme descrito em Material e Métodos (Pfaffl, 2001). Nesse método considera-se a eficiência individual de cada gene para o cálculo da expressão relativa. O método utilizado é apropriado para o cálculo da expressão relativa, inclusive para genes com eficiências diferentes (Figura 6 e Tabela 3). Como controle endógeno utilizamos o gene da enzima GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). A expressão relativa foi avaliada comparativamente aos doadores renais saudáveis. Usou-se a mediana dos valores de Ct, de cada gene, dos doadores renais saudáveis para cálculo da expressão relativa aos outros grupos de estudo. O cálculo da eficiência dos iniciadores foi realizado conforme descrito em Material e Métodos.

Tabela 3 – Eficiência dos Iniciadores Utilizados na Reação de PCR em Tempo Real

Gene	Eficiência
GAPDH	2,3
FOXP3	1,8
GATA3	2,3
TBET	2,2
IL10	2,4
TGF- β	1,9
TGF- β R	2
TNF	1,9
IL-4R	2,4
SOCS3	1,8
IFN- γ	2,2

Eficiência dos iniciadores para os genes Foxp3, GATA-3, TGF β , o receptor de TGF β , IL-10, T-bet, TNF e GAPDH foi calculada conforme descrito em material e métodos.

Figura 6. Cálculo da eficiência dos iniciadores para os genes Foxp3, GATA-3, TGF β , o receptor de TGF β , IL-10, T-bet, TNF e GAPDH. A eficiência foi calculada conforme descrita em material e métodos. O cálculo de eficiência é feito levando-se em base a inclinação da reta. No eixo Y: Cts (*cycle threshold*) dos respectivos genes e no eixo x a quantidade de RNA.

Os resultados mostrados, como de índice de expressão relativa (IR) (números adimensionais), foram assim interpretados: $IR \geq 2$ maior expressão

do gene em questão em relação à expressão nos doadores renais saudáveis e, $IR \leq 0,5$ menor expressão do mRNA deste gene em relação à expressão nos doadores renais saudáveis.

Dentre os genes analisados, houve uma grande variação da expressão nos diferentes indivíduos estudados. Contudo, algumas diferenças foram observadas. Os genes analisados que apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) entre os diferentes grupos estudados foram: TGF- β (Figura 7B), TGF- β R (Figura 7C) e o GATA-3 (Figura 7D).

A expressão de Foxp3 foi analisada em 10 indivíduos com rejeição crônica, 11 estáveis, 4 tolerantes operacionais e 5 com baixa imunossupressão. A expressão gênica de Foxp3 não apresentou diferença estatística entre os diferentes grupos de estudo. O grupo com rejeição crônica apresentou uma maior frequência (7/11) de indivíduos com uma menor expressão de Foxp3 comparados aos indivíduos tolerantes operacionais (0/4). Apesar da grande variação, no grupo dos indivíduos tolerantes operacionais, observamos que 2 dos 4 indivíduos tiveram uma maior expressão de Foxp3 em relação aos doadores renais saudáveis e um maior valor de mediana quando comparados àqueles de todos os outros grupos. Ademais, nesse grupo (TO), não observamos qualquer indivíduo com expressão menor que a dos doadores renais saudáveis (Figura 7A).

As expressões de TGF- β e do receptor de TGF- β foram avaliadas em 11 indivíduos com rejeição crônica, 11 indivíduos estáveis com imunossupressão convencional, 4 tolerantes operacionais e 5 com baixa

imunossupressão. O padrão de expressão desses dois genes foi similar. Em ambos, o grupo dos pacientes tolerantes operacionais teve uma expressão significativamente maior quando comparada àquela do grupo Est ($p < 0,05$). Uma diferença significativa também foi observada na expressão do gene do receptor do TGF- β , com maior expressão desse gene no TO em comparação ao grupo BI ($p < 0,05$). O grupo RC possui alguns indivíduos (4/11) com expressão desses genes semelhante àqueles do grupo TO, o que não foi observado em nenhum dos outros grupos (Est e BI). Um padrão semelhante para a expressão de seu receptor também pode ser observado no grupo RC. Os grupos BI (4/5) e Est (6/11) apresentaram uma maior frequência de indivíduos com inibição da expressão tanto de TGF- β como de seu receptor quando comparados aos grupos TO (0/4) e RC (3/11) (Figura 7B e 7C).

A expressão de GATA-3 foi avaliada em 11 indivíduos com rejeição crônica, 11 estáveis, 4 tolerantes operacionais e 5 com baixa imunossupressão. A mediana de expressão do gene GATA-3 foi significativamente maior no grupo TO quando comparada com todos os outros grupos de estudo ($p < 0,05$). O padrão de expressão desse gene foi similar entre o grupo dos indivíduos com rejeição crônica e os com função estável do enxerto e imunossupressão convencional. É importante ressaltar que, embora com uma expressão menor quando comparado ao TO, o grupo Est apresentou alguns indivíduos (4/12) com uma expressão semelhante a esse grupo (Figura 7D).

Figura 7. Expressão gênica relativa. Foram analisadas as moléculas Foxp3 (A), TGF- β R (B), TGF- β (C), GATA-3 (D), IL-10 (E), TNF (F), T-bet (G) e IFN- γ (H). Estão representados quatro grupos de estudo: Rejeição crônica (RC, n=11), estáveis com imunossupressão convencional (Est, n=11), tolerantes operacionais (TO, n=4) e com baixa imunossupressão (BI, n=5). O índice de expressão relativa foi calculado em relação aos doadores renais saudáveis. A linha azul corresponde ao ponto de corte onde consideramos uma maior expressão em relação aos doadores renais saudáveis. A linha vermelha corresponde ao ponto de corte onde consideramos uma menor expressão em relação aos doadores renais saudáveis. Diferença estatística: * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001). A barra horizontal corresponde à mediana em cada grupo estudado.

A expressão de IL-10 foi avaliada em 11 indivíduos com rejeição crônica, 11 estáveis com imunossupressão convencional, 4 tolerantes operacionais e 5 com baixa imunossupressão. Não foi possível observar diferenças estatísticas entre os diferentes grupos. O grupo Est (5/11) e BI (2/5) apresentaram uma maior frequência de indivíduos com menor expressão desse gene quando comparado aos grupos TO (0/4) e RC (1/11) (Figura 7E).

Os genes tidos como predominantemente pró-inflamatórios (INFLAMA), T-bet, IFN- γ e TNF foram analisados em 11 indivíduos com rejeição crônica, 11 estáveis, 4 tolerantes operacionais e 5 com baixa imunossupressão. Quando se compararam os diferentes grupos, não houve diferença estatística na expressão desses genes (Figura 7F, 7G e 7H).

Tabela 4 – Expressão Gênica relativa em indivíduos transplantados renais com rejeição crônica: Balanço REGULA X INFLAMA.

Indivíduo	Foxp3	GATA3	TGF β	TGF β R	IL-10	T-bet	TNF	IFN- γ	Predomínio de Modificação INFLAMA/REGULA
RC1	0,053	0,016	0,081	0,212	0,636	0,006	0,455	0,61	INFLAMA
RC2	0	0,100	0,832	0,351	0	0,085	0,812	6,022	INFLAMA
RC4	0,278	1,032	4,488	2,652	6,031	0,052	2,927	7,185	REGULA
RC5	1,335	1,355	5,095	2,095	30,27	0,325	5,709	17,328	REGULA
RC6	0,209	0,278	2,634	1,228	6,626	0,040	0,430	5,377	REGULA
RC7	7,386	10,417	8,546	1,947	4,668	1,388	3,673	10,658	REGULA
RC13	0,949	2,583	0,205	1,373	6,269	0,103	0,059	2,505	REGULA
RC24	1,941	0,941	0,694	1,935	1,951	0,412	2,197	0,790	INFLAMA
RC25	0,182	0,047	0,202	0,833	0,989	0,284	0,468	0,043	EQUI
RC26	0,0031	0,729	0,679	4,464	1,094	0,852	1,075	0,518	EQUI
RC32	0,464	0,303	0,261	0,063	15,387	0,0428	0,201	0,164	EQUI

As moléculas TGF β , TGF- β R, IL-10, Foxp3 e GATA3 foram consideradas moléculas imunorreguladoras (n=5). IFN- γ , TNF e T-bet foram consideradas pró-inflamatórias (n=3). RC: Rejeição crônica (n=11). Os resultados foram obtidos por PCR em tempo real, normalizados referentes à expressão do gene endógeno GAPDH. A expressão dos genes nos diferentes indivíduos transplantados renais foi feita relativamente aos doadores renais saudáveis. Os números em azul representam modulação do tipo REGULA e, em vermelho, modulação do tipo INFLAMA. Em marrom encontram-se os genes que não tiveram alteração em relação aos indivíduos saudáveis. REGULA: quando houve modificação ou predomínio imunorregulador, seja com aumento de moléculas reguladoras, seja com diminuição das pró-inflamatórias (Azul escuro). INFLAMA: quando houve modificação ou predomínio inflamatório, seja com aumento de moléculas pró-inflamatórias, seja com diminuição das reguladoras (Vinho). EQUI: quando o número de modificações REGULA foi igual ao número de modificações INFLAMA (Bege).

A expressão dos genes nos sujeitos de pesquisa, relativa à expressão em indivíduos saudáveis, foi também analisada de forma individual nos diferentes grupos de estudo (Tabelas 4, 5, 6 e 7). Consideraram-se dois tipos de modificações, as do tipo INFLAMA, que se caracterizam por uma maior expressão de genes predominantemente inflamatórias e/ou menor expressão de genes predominantemente reguladores em relação aos

doadores renais saudáveis, e do tipo REGULA, que se caracterizam por uma menor expressão de genes predominantemente inflamatórias e maior expressão de genes predominantemente reguladores em relação aos doadores renais saudáveis saudáveis. Nas Tabelas 4 a 7 mostramos as modificações do tipo INFLAMA em vermelho e as do tipo REGULA em azul, em marrom são destacados os genes que tiveram sua expressão semelhante aos doadores renais saudáveis.

O balanço das modificações da expressão gênica foi bastante variado nos grupos de indivíduos com rejeição crônica (3 INFLAMA, 5 REGULA e 3 EQUI) e dos estáveis sob doses convencionais de imunossupressores (6 INFLAMA e 5 REGULA) (Tabela 4 e 5). O grupo dos indivíduos sob baixa imunossupressão apresentou uma predominância de modificações do tipo INFLAMA quando comparado a todos os outros grupos (3 INFLAMA e 2 EQUI) (Tabela 6). Apesar disso, a maior parte dos genes predominantemente inflamatórios estavam inibidos o que não foi observado em relação aos outros grupos do estudo e, o perfil INFLAMA foi devido à inibição da expressão de genes do predominantemente imunorreguladores. Outro fator importante a ser destacado é que a expressão global dos genes analisados foi menor nos indivíduos com baixa imunossupressão em relação aos doadores renais saudáveis e em comparação com os outros grupos de estudo. Nesse sentido, apenas o indivíduo BI27 (grupo de baixa imunossupressão) teve uma maior expressão, de um único gene (IFN- γ) em relação aos saudáveis. Já o grupo dos TO apresentou apenas modificações do tipo REGULA (Tabela 7).

Tabela 5 – Expressão Gênica relativa em indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto e imunossupressão convencional: Balanço REGULA X INFLAMA.

Indivíduo	Foxp3	GATA3	TGF β	TGF β R	IL-10	T-bet	TNF	IFN- γ	Predomínio de Modificação INFLAMA/REGULA
Est9	0,126	0,203	2,201	0,073	0,040	0,064	0,383	2,792	INFLAMA
Est11	15,364	13,931	0,119	0,067	3,534	0,039	0,424	3,529	REGULA
Est12	9,620	26,215	0,037	0,311	14,659	0,563	2,429	2,175	INFLAMA
Est14	0,608	0,964	1,291	1,661	0,326	0,131	2,089	3,2	INFLAMA
Est17	8,526	5,350	0,038	0,067	233,024	0,288	0,105	0,132	REGULA
Est19	0,1	5,404	1,337	1,217	0,317	0,142	1,356	2,596	INFLAMA
Est20	0,074	0,183	0,183	1,367	0,217	0,087	0,263	0,157	INFLAMA
Est22	0,257	0,598	0,972	0,663	0,400	0,098	0,012	0,119	REGULA
Est23	0,813	1,028	1,5442	0,429	5,196	1,526	3,216	0,795	INFLAMA
Est28	0,191	0,298	0,526	0,554	1,646	0,203	0,499	0,356	REGULA
Est31	3,320	1,106	0,456	0,05	131,67	0,111	0,070	0,102	REGULA

As moléculas TGF β , TGF- β R, IL-10, Foxp3 e GATA3 foram consideradas moléculas imunorreguladoras (n=5). IFN- γ , TNF e T-bet foram consideradas pró-inflamatórias (n=3). Est: indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=11). Os resultados foram obtidos por PCR em tempo real, normalizados referentes à expressão do gene endógeno GAPDH. A expressão dos genes nos diferentes indivíduos transplantados renais foi feita relativamente aos doadores renais saudáveis. Os números em azul representam modulação do tipo REGULAe, em vermelho, modulação do tipo INFLAMA. Em marrom encontram-se os genes que não tiveram alteração em relação aos indivíduos saudáveis. REGULA: quando houve modificação ou predomínio imunorregulador, seja com aumento de moléculas reguladoras, seja com diminuição das pró-inflamatórias (Azul escuro). INFLAMA: quando houve modificação ou predomínio inflamatório, seja com aumento de moléculas pró-inflamatórias, seja com diminuição das reguladoras (Vinho). EQUI: quando o número de modificações REGULA foi igual ao número de modificações INFLAMA (Bege).

Quando analisamos a expressão desses genes, individualmente, conjuntamente com os dados clínicos, não observamos qualquer relação a expressão gênica e entre o tipo de modificação INFLAMA X REGULA, em relação às doenças de base, comorbidades, infecções, tempo do diagnóstico da rejeição, idade, imunossupressão, entre outros.

Tabela 6 – Expressão Gênica relativa em indivíduos transplantados renais com baixa imunossupressão: Balanço REGULA X INFLAMA.

Indivíduo	Foxp3	GATA3	TGFβ	TGFβR	IL-10	T-bet	TNF	IFN-γ	Predomínio de Modificação INFLAMA/REGULA
BI21	0,117	0,339	0,247	0,292	0,236	0,0308	0,012	0,082	INFLAMA
BI27	0,869	1,099	0,669	1,274	1,232	1,985	0,480	16,377	EQUI
BI29	0,443	0,800	0,259	0,181	5,043	0,596	0,262	0,356	EQUI
BI30	0,768	0,765	0,308	0,232	0,106	1,345	1,221	0,729	INFLAMA
BI34	0,285	0,274	0,307	0,246	2,634	0,0253	1,241	0,460	INFLAMA

As moléculas TGFβ, TGF-βR, IL-10, Foxp3 e GATA3 foram consideradas moléculas imunorreguladoras (n=5). IFN-γ, TNF e T-bet foram consideradas pró-inflamatórias (n=3). BI: baixa imunossupressão(n=5). Os resultados foram obtidos por PCR em tempo real, normalizados referentes à expressão do gene endógeno GAPDH. A expressão dos genes nos diferentes indivíduos transplantados renais foi feita relativamente aos doadores renais saudáveis. Os números em azul representam modulação do tipo REGULA e, em vermelho, modulação do tipo INFLAMA. Em marrom encontram-se os genes que não tiveram alteração em relação aos indivíduos saudáveis. REGULA: quando houve modificação ou predomínio imunorregulador, seja com aumento de moléculas reguladoras, seja com diminuição das pró-inflamatórias (Azul escuro). INFLAMA: quando houve modificação ou predomínio inflamatório, seja com aumento de moléculas pró-inflamatórias, seja com diminuição das reguladoras (Vinho). EQUI: quando o número de modificações REGULA foi igual ao número de modificações INFLAMA (Bege).

Tabela 7 – Expressão Gênica relativa em indivíduos transplantados renais com tolerância operacional: Balanço REGULA X INFLAMA.

Indivíduo	Foxp3	GATA3	TGFβ	TGFβR	IL-10	T-bet	TNF	IFN-γ	Predomínio de Modificação INFLAMA/REGULA
TO3	1,174	5,560	4,256	2,384	2,162	0,204	3,349	4,402	REGULA
TO8	3,068	3,780	7,509	2,359	0,844	2,875	6,936	6,713	REGULA
TO10	14,509	35,263	3,06	3,892	2,014	2,3	0,450	0,717	REGULA
TO16	1,9811	15,473	2,558	2,369	3,224	0,708	6,925	0,4502	REGULA

As moléculas TGFβ, TGF-βR, IL-10, Foxp3 e GATA3 foram consideradas moléculas imunorreguladoras (n=5). IFN-γ, TNF e T-bet foram consideradas pró-inflamatórias (n=3). TO: tolerância operacional (n=4). Os resultados foram obtidos por PCR em tempo real, normalizados referentes à expressão do gene endógeno GAPDH. A expressão dos genes nos diferentes indivíduos transplantados renais foi feita relativamente aos doadores renais saudáveis. Os números em azul representam modulação do tipo REGULA e, em vermelho, modulação do tipo INFLAMA. Em marrom encontram-se os genes que não tiveram alteração em relação aos indivíduos saudáveis. REGULA: quando houve modificação ou predomínio imunorregulador, seja com aumento de moléculas reguladoras, seja com diminuição das pró-inflamatórias (Azul escuro). INFLAMA: quando houve modificação ou predomínio inflamatório, seja com aumento de moléculas pró-inflamatórias, seja com diminuição das reguladoras (Vinho). EQUI: quando o número de modificações REGULA foi igual ao número de modificações INFLAMA (Bege).

De um modo geral, as PBMC dos indivíduos estudados tiveram importantes modificações na expressão de mRNA dos genes estudados. Como podemos observar, nas Tabelas 4 a 7, ocorreu uma diversidade em relação aos doadores renais saudáveis quanto ao tipo de modificação presente em cada indivíduo, mesmo dentro do mesmo grupo de estudo. Comparando-se as expressões gênicas individualmente, houve predomínio de modificações REGULA nos indivíduos tolerantes operacionais em comparação com os outros grupos de estudo. Os grupos Est e RC tiveram um padrão de modificação semelhante. Já o grupo BI apresentou um predomínio de modificações do tipo INFLAMA. Na Figura 8 mostramos o percentual de modificações REGULA, INFLAMA ou quando não houve modificação em relação aos doadores renais saudáveis (SEM MOD) em cada um dos grupos estudados. Os indivíduos TO apresentaram o maior percentual de modificações do tipo REGULA em comparação a todos os outros grupos, em que as porcentagens de modificações foram semelhantes.

Figura 8 - Perfil de modificação da expressão de genes REGULA x INFLAMA nos diferentes grupos de estudo, por PCR em tempo Real. Os valores percentuais foram obtidos pela razão do número de modificações de expressão, REGULA, INFLAMA, ou SEM MOD (sem modificação), todos em relação à expressão nos doadores renais saudáveis. REGULA: modificações potencialmente reguladoras - aumento de expressão de genes predominantemente imunorreguladores e/ou diminuição da expressão de genes predominantemente próinflamatórios. INFLAMA: modificações potencialmente inflamatórias - aumento de expressão de genes predominantemente próinflamatórias e/ou diminuição da expressão de genes predominantemente imunorreguladores. SEM MOD: ausência de modificações predominantemente imunorreguladoras ou próinflamatórias em relação à expressão em doadores renais saudáveis. RC: Rejeição crônica (n=11); Est: estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=11); BI: baixa imunossupressão (n=5) e TO (n=4): tolerância operacional. Estão representadas as médias $\pm$ SEM.

Expressão Gênica, REGULA X INFLAMA, em dois tempos distintos.

Neste trabalho, foram analisadas 2 amostras de 22 indivíduos transplantados renais pertencentes a 4 grupos clínicos (TO, RC, Est e BI), em relação aos doadores renais saudáveis, com intervalo entre as coletas de 4 a 6 meses. Nosso objetivo neste bloco experimental foi avaliar, comparativamente, a dinâmica da expressão de um painel de genes predominantemente imunorreguladores (REGULA) e predominantemente próinflamatórios (INFLAMA) expressos, *ex vivo*, em células do sangue de indivíduos em estado de tolerância operacional (TO, n=3), rejeição crônica

(RC, n=8), estáveis com imunossupressão convencional (Est, n=8) e os indivíduos com função estável do enxerto e com baixa imunossupressão (BI, n=3) relativo à expressão nos doadores renais saudáveis (Sau, n=10). Fizemos, neste bloco experimental, 3 formas de análise: (i) a diferença entre os diferentes grupos considerando as expressões gênicas em dois tempos distintos; (ii) a variabilidade entre os 2 tempos analisados em relação à manutenção do tipo de modificação (concordância), observado no tempo 1, nos diferentes grupos de estudo; (iii) análise da estabilidade da expressão do mRNA e do tipo de modificação nos diferentes grupos de estudo. Foram analisados os genes: GATA-3, T-bet, Foxp3, IL-10, TNF, TGF- β , TGF- β R, IFN- γ e o GAPDH como controle endógeno (Figura 9). A expressão relativa foi calculada conforme descrito em material e métodos.

Nesse bloco de resultados os genes que apresentaram expressão com diferença estatística, entre os diferentes grupos, levando-se em conta a dinâmica das expressões, em 2 tempos distintos, foram: TGF- β , TGF- β R, Foxp3, T-bet, IFN- γ , TNF e GATA-3 ($p < 0,05$) (Figura 9). Apenas o gene de IL-10 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo. Para avaliar a dinâmica da expressão gênica, comparativamente nos diferentes grupos estudados, levamos em conta tanto as diferenças entre os grupos como também a variável tempo (intervalo entre as duas coletas). Foi utilizada uma análise de variância com dois fatores, *two-way ANOVA*, conforme descrito em Material e Métodos. As diferenças observadas entre os diferentes grupos estudados são referentes tanto à dinâmica da expressão gênica, em dois pontos distintos, como às diferenças

de expressão e variabilidade entre os grupos.

Na análise da expressão de Foxp3 o grupo TO apresentou níveis maiores de mRNA desse gene, em relação aos doadores renais saudáveis, e quando comparado aos grupos RC e BI ($p < 0,05$) (Figura 9A). O grupo TO apresentou uma maior expressão de TGF- β comparado aos grupos Est e BI, e de TGF- β R quando comparado a todos os outros grupos estudados (RC, Est e BI) ($p < 0,05$) (Figura 9B e 9C). O grupo RC teve uma expressão significativamente maior de TGF- β e de seu receptor quando comparado aos grupos BI e Est ($p < 0,05$). O gene GATA-3 também teve uma maior expressão no grupo TO comparativamente aos grupos RC e Est ($p < 0,05$) (Figura 9D).

Todos os genes predominantemente próinflamatórios estudados (T-bet, IFN- γ e TNF), em dois tempos distintos, apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos de estudo ($p < 0,05$). Os genes T-bet e TNF tiveram uma maior expressão no grupo TO comparativamente a todos os outros grupos: RC, Est e BI ($p < 0,05$) (Figura 9F, 9G). Já o gene IFN- γ apresentou uma expressão significativamente maior no grupo BI comparativamente a todos os outros grupos estudados (TO, RC e Est) ($p < 0,05$) (Figura 9H).

Figura 9. Análise sequencial da expressão relativa de RNAm em PBMC nos indivíduos transplantados renais, em 2 amostras (1, 2) com intervalo de tempo de 4-6 meses. As moléculas, Foxp3, GATA-3, T-bet, TGF-β, o receptor de TGF-β, IFN-γ, TNF e IL-10 foram analisadas. O índice de expressão relativa foi calculada relativamente à expressão nos indivíduos saudáveis. (A) Foxp3, (B) TGF-β, (C) TGF-βR, (D) GATA-3, (E) IL-10, (F) TNF, (G) T-bet e (H) IFN-γ. TO - Grupo tolerante operacional (n=3), BI - Grupo baixa imunossupressão (n=3), Est - Grupo estáveis e imunossupressão convencional (n=8) e RC - Grupo rejeição crônica (n=8). Diferença estatística: * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001). Estão representadas as médias ± SEM.

Tabela 8 – Expressão Gênica Relativa em indivíduos transplantados renais com rejeição crônica, em dois pontos : Balanço REGULA X INFLAMA.

Indivíduo	Foxp3	GATA3	TFG- β	TGF β R	IL-10	T-bet	TNF	IFN- γ	Predomínio de Modificação INFLAMA/REGULA
RC4 T1	0,2788	1,0326	4,488	2,6521	6,031	0,0527	2,927	7,1853	REGULA
RC4 T2	1,376	0,3552	0,777	0,302	0,652	0,332	1,1781	0,873	INFLAMA
RC5 T1	1,3352	1,3559	5,095	2,0956	30,27	0,3256	5,7096	17,3281	REGULA
RC5 T2	0,215	0,836	0,308	0,264	0,324	0,407	0,2568	1,459	INFLAMA
RC6 T1	0,209	0,27812	2,6342	1,228	6,626	0,0408	0,4303	5,3774	REGULA
RC6 T2	1,114	0,035	0,106	0,670	23,260	0,935	0,261	0,052	REGULA
RC7 T1	7,386	10,4173	8,546	1,9474	4,668	1,388	3,673	10,658	REGULA
RC7 T2	0,418	1,242	1,168	0,666	4,146	0,430	0,554	0,009	REGULA
RC13 T1	0,9496	2,5836	0,2057	1,3732	6,269	0,103	0,0599	2,5057	REGULA
RC13 T2	0,104	0,338	0,247	0,144	0,837	0,341	0,530	0,492	INFLAMA
RC24 T1	1,941	0,941	0,6941	1,935	1,951	0,4123	2,1979	0,7903	INFLAMA
RC24 T2	2,967	7,622	0,007	0,258	16,220	0,020	0,231	2,5129	REGULA
RC25 T1	0,1828	0,0479	0,202	0,8336	0,989	0,284	0,4683	0,0435	EQUI
RC25 T2	0,053	0,062	0,086	0,059	0,239	0,035	0,083	0,181	INFLAMA
RC26 T1	0,00031	0,729	0,679	4,4647	1,0948	0,852	1,0754	0,518	EQUI
RC26 T2	0,167	0,644	0,330	0,0299	0,133	0,290	0,206	0,375	REGULA
									Total de concordância
Concordância REGULA	0/8	0/8	0/8	0/8	2/8	5/8	2/8	1/8	10/64
Concordância INFLAMA	2/8	2/8	2/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	6/64
Concordância SEM MOD	0/8	2/8	0/8	2/8	0/8	0/8	0/8	0/8	4/64
Concordância Global	2/8	4/8	2/8	2/8	2/8	5/8	2/8	1/8	20/64

As moléculas TGF β , TGF- β R, IL-10, Foxp3 e GATA3 foram consideradas moléculas predominantemente imunorreguladoras (n=5). IFN- γ , TNF- α e T-bet foram consideradas predominantemente pró-inflamatórias (n=3). RC: Rejeição crônica (n=8). Os resultados foram obtidos por PCR em tempo real, normalizados referente à expressão do GAPDH e relativos à expressão nos doadores renais saudáveis. Os números em azul representam modulação do tipo REGULA e, em vermelho, modulação do tipo INFLAMA. Em marrom encontram-se os genes que não tiveram alteração em relação aos indivíduos saudáveis. REGULA: quando houve modificação ou predomínio imunorregulador, seja com aumento de moléculas reguladoras, seja com diminuição das pró-inflamatórias (Azul escuro). INFLAMA: quando houve modificação ou predomínio inflamatório, seja com aumento de moléculas pró-inflamatórias, seja com diminuição das reguladoras (Vinho). EQUI: quando o número de modificações REGULA foi igual ao número de modificações INFLAMA (Bege). SEM MOD: sem modificação predominantemente REGULA ou INFLAMA. T1: tempo 1. T2: tempo 2 (intervalo de 4-6 meses entre T1 e T2).

Ao compararmos a expressão de mRNA, em relação aos doadores renais saudáveis, nas 2 amostras, observamos que a manutenção de uma maior expressão ($IR > 2$), uma menor expressão ($IR < 0,5$) ou de uma expressão semelhante ($0,5 \leq IR \leq 2$), em relação aos doadores renais saudáveis, variou de acordo com o gene analisado. A expressão dos genes Foxp3 e T-bet foi a mais estável. Para Foxp3, os 4 grupos apresentaram uma expressão, em relação aos doadores renais saudáveis, semelhante nos dois pontos analisados (Figura 9A e 9G). O gene T-bet teve uma manutenção do estado de maior expressão, menor expressão, ou expressão semelhante em relação aos doadores renais saudáveis, em 3 dos 4 grupos analisados. Os genes TGF- β , TGF- β R, IL-10, GATA-3 e IFN- γ apresentaram um padrão de expressão, em relação aos doadores renais saudáveis, nos dois pontos analisados, semelhante em 2 dos 4 grupos analisados (Figura 9B, 9C, 9D, 9E e 9H). O gene de TNF apresentou apenas 1 grupo com um padrão de expressão semelhante, nas 2 amostras, sendo o gene em que se observou a maior alteração de expressão em relação aos indivíduos saudáveis na análise sequencial (Figura 9F).

Ademais, algumas características gerais dos grupos puderam ser observadas, quando consideramos as amostras analisadas em 2 tempos distintos: (i) O grupo dos indivíduos tolerantes operacionais apresentou uma maior expressão das moléculas predominantemente imunorreguladoras estudadas (Foxp3, GATA-3, TGF- β e TGF- β R) e predominantemente pró-inflamatórias (T-bet e TNF) em comparação aos outros grupos de estudo ($p < 0,05$) (Figura 9A-D). (ii) O grupo RC apresentou uma maior expressão de

TGF- β e TGF- β R, em relação aos grupos BI e Est (Figura 9B e 9C). (iii) A expressão dos fatores de transcrição Foxp3 e T-bet apresentaram as menores variações de alterações na expressão gênica em relação aos doadores renais saudáveis, mantendo um padrão de expressão semelhante nos 2 tempos estudados. (iv) O grupo BI apresentou uma expressão gênica de IFN- γ superior àquela observada nos grupos TO, BI e Est, e semelhante nos dois pontos estudados (em ambos os momentos ela foi maior que do que a dos doadores renais saudáveis, $IR \geq 2$). Deve-se ressaltar que esse gene, IFN- γ , teve a menor manutenção de estabilidade de expressão em relação aos doadores renais saudáveis nos outros grupos de estudo.

Também realizamos a análise individual da expressão gênica em relação aos indivíduos saudáveis, considerando os 2 pontos distintos (Tabelas 8, 9, 10 e 11). Foram utilizados os critérios de maior expressão ($IR \geq 2$) e menor expressão ($IR \leq 0,5$) em relação aos doadores renais saudáveis, conforme descrito anteriormente. Foram consideradas como modificações REGULA uma maior expressão dos genes (Foxp3, TGF- β , TGF- β R, GATA-3, IL-10) e/ou uma menor expressão dos genes (T-bet, IFN- γ e TNF), em relação aos doadores renais saudáveis. As modificações consideradas como do tipo INFLAMA foram uma maior expressão dos genes (T-bet, IFN- γ e TNF) e/ou uma menor expressão dos genes (Foxp3, TGF- β , TGF- β R, GATA-3, IL-10), em relação aos doadores renais saudáveis.

Tabela 9 – Expressão Gênica relativa em indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto e imunossupressão convencional, em dois pontos: Balanço REGULA X INFLAMA.

Indivíduo	Foxp3	GATA3	TFGβ	TFGβR	IL-10	T-bet	TNF	IFN-γ	Predomínio de Modificação INFLAMA/REGULA
Est9 T1	0,126	0,2036	2,2017	0,07323	0,0402	0,0642	0,3837	2,792	INFLAMA
Est9 T2	0,084	0,549	0,501	0,215	0,104	0,141	0,199	0,109	EQUI
Est11 T1	15,364	13,9315	0,1192	0,0674	3,5345	0,0399	0,4241	3,529	REGULA
Est11 T2	13,886	11,991	0,022	1,435	19,089	0,125	0,418	2,346	REGULA
Est12 T1	9,62079	26,215	0,03706	0,3119	14,6598	0,5631	2,429	2,1758	INFLAMA
Est12 T2	26,853	12,162	0,610	0,276	16,656	0,432	0,312	1,253	REGULA
Est17 T1	8,5263	5,35026	0,03811	0,0673	233,024	0,288	0,1057	0,13215	REGULA
Est17 T2	7,921	4,741	0,013	0,029	245,952	0,073	0,408	3,134	REGULA
Est19 T1	0,1	5,404	1,3371	1,2175	0,3179	0,14219	1,3564	2,596	INFLAMA
Est19 T2	0,195	0,781	0,302	1,189	3,268	0,192	0,556	0,545	EQUI
Est20 T1	0,07445	0,18369	0,1837	1,3675	0,2175	0,08786	0,2636	0,1578	INFLAMA
Est20 T2	0,138	0,370	0,215	0,156	1,443	0,089	0,706	0,713	INFLAMA
Est22 T1	0,257	0,5984	0,9723	0,6638	0,4008	0,0985	0,012	0,1195	REGULA
Est22 T2	0,026	0,019	0,011	0,029	0,165	0,007	0,035	0,118	INFLAMA
Est23 T1	0,81358	1,0288	1,5442	0,4297	5,1963	1,5266	3,2167	0,7959	INFLAMA
Est23 T2	0,040	0,096	0,192	0,053	0,608	0,015	0,262	0,108	INFLAMA
									Total de Concordância
Concordância REGULA	3/8	3/8	0/8	0/8	2/8	6/8	4/8	1/8	19/64
Concordância INFLAMA	4/8	1/8	3/8	4/8	2/8	0/8	0/8	1/8	15/64
Concordância SEM MOD	0/8	0/8	0/8	1/8	0/8	0/8	1/8	0/8	2/64
Concordância Global	7/8	4/8	3/8	5/8	4/8	6/8	5/8	2/8	36/64

As moléculas TGFβ, TGF-βR, IL-10, Foxp3 e GATA3 foram consideradas moléculas predominantemente imunorreguladoras (n=5). IFN-γ, TNF-α e T-bet foram consideradas predominantemente pró-inflamatórias (n=3). Est: estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=8). Os resultados foram obtidos por PCR em tempo real, normalizados referente à expressão do GAPDH e relativos à expressão nos doadores renais saudáveis. Os números em azul representam modulação do tipo REGULA e, em vermelho, modulação do tipo INFLAMA. Em marrom encontram-se os genes que não tiveram alteração em relação aos indivíduos saudáveis. REGULA: quando houve modificação ou predomínio imunorregulador, seja com aumento de moléculas reguladoras, seja com diminuição das pró-inflamatórias (Azul escuro). INFLAMA: quando houve modificação ou predomínio inflamatório, seja com aumento de moléculas pró-inflamatórias, seja com diminuição das reguladoras (Vinho). EQUI: quanto o número de modificações REGULA foi igual ao número de modificações INFLAMA (Bege). SEM MOD: sem modificação predominantemente REGULA ou INFLAMA. T1: tempo 1. T2: tempo 2 (intervalo de 4-6 meses entre T1 e T2).

Ressaltamos que não encontramos qualquer relação entre os dados clínicos/demográficos como idade, histórico de infecções, transfusões sanguíneas, entre outros, dos diferentes indivíduos estudados e o perfil de expressão gênica e modificação REGULA X INFLAMA nos 2 pontos analisados.

O grupo dos indivíduos com rejeição crônica apresentou, no tempo 2, tanto modificações do Tipo REGULA como INFLAMA (4 INFLAMA e 4 REGULA) (Tabela 8). A maior parte dos genes apresentaram, na amostra 2, uma menor expressão em comparação aos doadores renais saudáveis, com poucos genes apresentando uma maior expressão em relação doadores renais saudáveis. É importante ressaltar que em poucos genes foi observada uma expressão similar aos doadores renais saudáveis (células em marrom) (Tabela 8).

Analisando-se a concordância entre o tipo de modificação foi possível observar que os indivíduos com rejeição crônica, de uma forma geral, apresentaram poucas concordâncias, entre os 2 tempos estudados, sendo encontrada uma maior frequência de maiores concordância nos genes de T-bet (5/8) e GATA-3 (4/8). Na Figura 11 mostramos a porcentagem de manutenção/concordância entre as modificações REGULA e INFLAMA, assim como a ausência de modificação, SEM MOD, entre as 2 amostras estudadas, nos diferentes grupos de estudo.

Os indivíduos Est não apresentaram, na análise do tempo 2, um predomínio entre modificações INFLAMA ou REGULA (3 REGULA, 3

INFLAMA e 2 EQUI) (Tabela 9). Houve uma quantidade similar de genes sem modificação em comparação aos indivíduos com rejeição crônica (células em marrom) (Tabela 9). Em relação à concordância entre as expressões, observamos que os indivíduos Est tiveram um maior número de indivíduos com manutenção/concordância entre os diferentes tipos de modificações comparados ao grupo RC. Os genes Foxp3 (7/8), T-bet (6/8) e TGF- β R (5/8) apresentaram as maiores frequências de concordância entre as expressões, nos dois pontos analisados. O gene com a menor concordância foi o IFN- γ (2/8). Apesar de Foxp3 apresentar uma maior frequência de concordância entre as expressões, no grupo Est, nos dois pontos estudados, as concordâncias INFLAMA, para este gene, foram dominantes (4/7). Para o gene predominantemente inflamatório T-bet o inverso foi observado, em que a concordância dominante, para este gene, foi do tipo REGULA (6/6).

Nenhum indivíduo com baixa imunossupressão apresentou um predomínio de modificação do tipo INFLAMA (Tabela 10), na amostra 2, embora a análise do grupo tenha mostrado que a expressão de IFN- γ foi significativamente maior nesse grupo em comparação a todos os outros grupos estudados (TO, RC e Est) ($p < 0,05$) (Figura 9H). No tempo 2, o indivíduo BI21 teve um predomínio de modificações do tipo REGULA (4/8), já o BI27 e o BI30 não apresentaram predominância de um tipo de modificação na expressão dos genes avaliados, em relação aos doadores renais saudáveis (Tabela 10). Ressaltamos que o indivíduo BI27, na amostra 2, teve a expressão de todos os seus genes sem diferença em relação aos

doadores renais saudáveis (8/8). Apesar do pequeno número de indivíduos com baixa imunossupressão analisados, foi possível observar que os genes que apresentaram uma maior concordância entre os tipos de perfil de expressão entre os dois pontos analisados foram o Foxp3 (2/3), o TGF- β (3/3) e o TGF- β R (3/3).

Tabela 10 – Expressão Gênica relativa em indivíduos transplantados renais com baixa imunossupressão, em dois pontos: Balanço REGULA X INFLAMA.

Indivíduo	Foxp3	GATA3	TFG β	TFG β R	IL-10	T-bet	TNF	IFN- γ	Predomínio de Modificação INFLAMA/REGULA
BI21 T1	0,11758	0,3393	0,2475	0,2922	0,236	0,0308	0,012	0,0822	INFLAMA
BI21 T2	2,487	23,544	0,004	0,009	4,093	0,049	0,013	76,138	REGULA
BI27 T1	0,86966	1,099	0,6699	1,2746	1,2325	1,9856	0,4808	16,377	EQUI
BI27 T2	0,517	1,608	0,554	1,047	0,948	1,068	0,736	1,474	EQUI
BI30 T1	0,7685	0,7651	0,3088	0,2324	0,1066	1,3457	1,2214	0,729	INFLAMA
BI30 T2	0,663	0,483	0,467	0,1686	11,542	0,3941	0,491	0,714	EQUI
									Total de concordância
Concordância REGULA	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3	0/3	2/24
Concordância INFLAMA	0/3	0/3	2/3	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3	4/24
Concordância SEM MOD	2/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	0/3	1/3	8/24
Concordância Global	2/3	1/3	3/3	3/3	1/3	2/3	1/3	1/3	14/24

As moléculas TGF β , TGF- β R, IL-10, Foxp3 e GATA3 foram consideradas moléculas predominantemente imunorreguladoras (n=5). IFN- γ , TNF- α e T-bet foram consideradas predominantemente pró-inflamatórias (n=3). BI: baixa imunossupressão (n=3). Os resultados foram obtidos por PCR em tempo real, normalizados referente à expressão do GAPDH e relativos à expressão nos doadores renais saudáveis. Os números em azul representam modulação do tipo REGULA e, em vermelho, modulação do tipo INFLAMA. Em marrom encontram-se os genes que não tiveram alteração em relação aos doadores renais saudáveis. REGULA: quando houve modificação ou predomínio imunorregulador, seja com aumento de moléculas reguladoras, seja com diminuição das pró-inflamatórias (Azul escuro). INFLAMA: quando houve modificação ou predomínio inflamatório, seja com aumento de moléculas pró-inflamatórias, seja com diminuição das reguladoras (Vinho). EQUI: quanto o número de modificações REGULA foi igual ao número de modificações INFLAMA (Bege). SEM MOD: sem modificação predominantemente REGULA ou INFLAMA. T1: tempo 1. T2: tempo 2 (intervalo de 4-6 meses entre T1 e T2).

Tabela 11 – Expressão Gênica relativa em indivíduos transplantados renais com tolerância operacional, em dois pontos: Balanço REGULA X INFLAMA.

Indivíduo	Foxp3	GATA3	TFGβ	TFGβR	IL-10	T-bet	TNF	IFN-γ	Predomínio de Modificação INFLAMA/REGULA
TO3 T1	1,1742	5,5607	4,2569	2,3843	2,162	0,2048	3,349	4,4029	REGULA
TO3 T2	1,224	6,140	1,343	2,885	1,028	0,306	1,873	3,517	REGULA
TO8 T1	3,0689	3,7803	7,5093	2,3598	0,8449	2,8755	6,9362	6,713	REGULA
TO8 T2	3,190	6,388	3,344	1,113	10,281	9,013	7,916	0,706	REGULA
TO10 T1	14,509	35,2636	3,06	3,8924	2,014	2,3	0,4502	0,7173	REGULA
TO10 T2	55,879	61,871	2,213	1,601	2,074	0,155	0,176	0,227	REGULA
									Total de concordância
Concordância REGULA	2/3	3/3	2/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	12/24
Concordância INFLAMA	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3	0/3	2/24
Concordância SEM MOD	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/24
Concordância Global	3/3	3/3	2/3	1/3	1/3	2/3	2/3	1/3	15/24

As moléculas TGFβ, TGF-βR, IL-10, Foxp3 e GATA3 foram consideradas moléculas predominantemente imunorreguladoras (n=5). IFN-γ, TNF-α e T-bet foram consideradas predominantemente pró-inflamatórias (n=3). TO: tolerância operacional (n=3). Os resultados foram obtidos por PCR em tempo real, normalizados referente à expressão do GAPDH e relativos à expressão nos doadores renais saudáveis. Os números em azul representam modulação do tipo REGULA e, em vermelho, modulação do tipo INFLAMA. Em marrom encontram-se os genes que não tiveram alteração em relação aos doadores renais saudáveis. REGULA: quando houve modificação ou predomínio imunorregulador, seja com aumento de moléculas reguladoras, seja com diminuição das pró-inflamatórias (Azul escuro). INFLAMA: quando houve modificação ou predomínio inflamatório, seja com aumento de moléculas pró-inflamatórias, seja com diminuição das reguladoras (Vinho). EQUI: quanto o número de modificações REGULA foi igual ao número de modificações INFLAMA (Bege). SEM MOD: sem modificação predominantemente REGULA ou INFLAMA. T1: tempo 1. T2: tempo 2 (intervalo de 4-6 meses entre T1 e T2).

Os indivíduos tolerantes operacionais, diferentemente do observado em qualquer um dos outros grupos, apresentaram, no tempo 2, um predomínio apenas de modificações do tipo REGULA (3/3). Uma maior expressão dos genes tidos como predominantemente imunorreguladores foi

observada nesse grupo, diferentemente do observado nos outros grupos analisados. De uma forma geral, poucas modificações do tipo INFLAMA foram observadas nesses indivíduos (TO3 1/8, TO8 2/8 e TO10 0/8) (Tabela 11). Em relação à concordância entre os diferentes perfis de modificações, os genes Foxp3 (3/3), T-bet (2/3) e GATA-3 (3/3) apresentaram uma maior concordância entre os dois pontos estudados. Uma predominância de concordâncias do tipo REGULA também foi observada nesse grupo de indivíduos (Figura 11).

Na Figura 10 ilustramos a porcentagem de concordância entre os perfis de expressão gênica, nos dois tempos estudados, para cada um dos genes analisados, em relação aos doadores renais saudáveis, buscando-se observar a estabilidade da expressão gênica ao longo do tempo de 4-6 meses. Observamos que os fatores de transcrição (Foxp3 e T-bet) tiveram uma maior estabilidade entre os dois pontos analisados. Os genes IFN- γ e IL-10 apresentaram as menores estabilidades.

De uma forma geral, os indivíduos tolerantes operacionais tiveram um predomínio de modificações REGULA, tanto na primeira como na segunda amostra. Em contraste, os indivíduos com rejeição crônica, principalmente, e os indivíduos estáveis tiveram uma maior frequência de modificações do tipo INFLAMA quando comparados aos grupo TO.

Figura 10 - Perfil de estabilidade gênica, entre os tipos de modificações REGULA x INFLAMA, em dois pontos distintos, por PCR em tempo Real. Os valores percentuais foram obtidos pela razão do número de concordância entre as modificações de expressão, REGULA, INFLAMA, ou SEM MOD (sem modificação), considerando-se o número total de possibilidades de modificação de expressão gênica, em todos os indivíduos analisados, em dois pontos distintos, para cada gene individualmente (n=22). Todos os genes tiveram suas expressões representadas em relação à expressão nos doadores renais saudáveis. Apenas os indivíduos com análise de duas amostras, em tempos distintos, foram considerados.

Nós também analisamos se os diferentes grupos tiveram uma variação em relação aos tipos de concordâncias observados, tanto de uma forma geral como de concordâncias predominantemente REGULA, INFLAMA ou SEM MOD (sem modificação). Esse tipo de análise nos permite observar se algum grupo possui uma maior estabilidade de expressão de mRNA e modificação, em relação aos dois pontos analisados, assim como se existe o predomínio de algum tipo de estabilidade, seja para um perfil mais imunorregulador, um perfil mais inflamatório ou um perfil em equilíbrio, comparados àqueles dos indivíduos saudáveis (Figura 11).

Figura 11 - Perfil de concordância entre os tipos de modificações REGULA x INFLAMA e a ausência de modificação, SEM MOD, nos diferentes grupos de estudo, em relação a dois pontos estudados, por PCR em tempo real. Os valores percentuais foram obtidos pela razão do número de concordância das modificações REGULA, INFLAMA, ou SEM MOD (sem modificação), em relação ao total de possibilidades (número de possibilidades: grupo RC e Est = 64 e grupo BI e TO = 24). TO: tolerante operacional (n=3); BI: baixa imunossupressão (n=3); Est: função estável do enxerto e imunossupressão padrão (n=8); e RC: rejeição crônica (n=8). Todos os genes tiveram suas expressões relativas em relação à expressão nos doadores renais saudáveis.

Nós observamos que o grupo de RC apresentou uma menor manutenção/concordância entre a expressão e o tipo de modificação, analisando-se a dinâmica da expressão gênica, em dois pontos distintos, de uma forma geral. Os outros grupos, TO, BI e Est, tiveram porcentagens de manutenção/concordância entre a expressão e o tipo de modificação semelhantes entre si e maiores que o grupo RC. Ao analisarmos, individualmente, as porcentagens dos tipos de concordâncias (REGULA, INFLAMA e SEM MOD) observamos que os grupos Est e RC apresentaram um perfil semelhante, com pouca concordância do tipo SEM MOD e concordâncias do tipo INFLAMA e REGULA semelhantes. O grupo BI

apresentou uma predominância de concordância do tipo SEM MOD. Diferentemente do observado, nos outros grupos de estudo, o grupo TO teve um substancial predomínio de concordâncias do tipo REGULA, com pouca concordância do tipo INFLAMA e SEM MOD (Figura 11).

Análise da Expressão de Foxp3 em células T CD4⁺ CD25⁺

Após a separação do sangue, 1.10^6 células foram utilizadas para a marcação intracelular de Foxp3 em conjunto com marcadores para CD4 e CD25, conforme descrito em Material e Métodos.

Primeiramente delimitou-se uma região de linfócitos e, posteriormente, uma região em células T CD4⁺CD25^{Neg}, CD4⁺CD25^{Low} e CD4⁺CD25^{High}. Dentro dessas regiões fez-se a análise da expressão de Foxp3 (Figura 12).

Na Figura 13 está esquematizado como as regiões foram analisadas em 1 indivíduo representativo de cada grupo de estudo. Após a delimitação das regiões foi feito o cálculo tanto das porcentagens quanto dos números absolutos.

Iniciamos com a análise tanto do percentual como o número absoluto de células T CD4⁺ CD25⁺. O percentual e número absoluto foi calculado em células T CD4⁺ CD25⁺ e, posteriormente, em células T CD4⁺ CD25^{low} e células T CD4⁺ CD25^{High} (Figuras 14 e 15). Os números de indivíduos analisados para cada grupo foram: TO n=4; BI n=5; Est n=12; RC n=11; Sau n=10.

Figura 12. Análise representativa da expressão de Foxp3 em células T CD4⁺ do indivíduo com rejeição crônica, RC7. (A) Primeiramente delimitou-se a região de linfócitos. (B) Posteriormente, delimitou-se a região de células T CD4⁺. (C) Dentro dessa população foi delimitada a região de células CD25⁺ e Foxp3⁺. (D) Histograma mostrando a intensidade de fluorescência de Foxp3 nas regiões de células T CD4⁺ CD25^{Neg}, CD25^{Low} e CD25^{High} analisadas. MFI: mediana da intensidade de fluorescência. Para todos os indivíduos analisados foram adquiridos 200.000 eventos dentro da região de linfócitos.

As porcentagens e o número absoluto apresentaram um padrão similar nos diferentes grupos de estudo. Todos os grupos analisados parecem possuir quantidades e percentuais semelhantes dessas células, sem

apresentar relação com a evolução clínica do transplante. Nenhuma diferença estatística, entre os diferentes grupos de estudo, foi observada na análise da porcentagem e do número absoluto de células T $CD4^+$ $CD25^+$ totais, células T $CD4^+$ $CD25^{low}$ e células T $CD4^+$ $CD25^{High}$ no sangue periférico nos diferentes indivíduos transplantados renais (Figura 14 e 15).

Figura 13. Representação das regiões das populações de linfócitos $CD4^+$ / $CD25^+$ /Foxp3 analisadas nos diferentes grupos de estudo. (A) Representação das regiões de células T $CD4^+$ $CD25^+$ de um indivíduo pertencente a cada um dos grupos de estudo. Essa população foi dividida em $CD25^{High}$ e $CD25^{Low}$. (B) Representação de um indivíduo pertencente a cada um dos grupos de estudo quanto às regiões de células T $CD4^+$ $CD25^+$ Foxp3⁺. Essa população foi dividida em Foxp3⁺ $CD25^{High}$ Foxp3⁺ e Foxp3⁺ $CD25^{Low}$ Foxp3⁺. TO: transplantados renais em estado de tolerância operacional. BI: transplantados renais com baixa imunossupressão. Est: transplantados renais com função estável do enxerto e imunossupressão padrão. RC: transplantados renais com rejeição crônica. Sau: indivíduos saudáveis.

Figura 14. Análise das células T CD4⁺CD25⁺ nos diferentes grupos de estudo. (A) Porcentagem de células T CD4⁺CD25⁺ em PBMC. (B) Porcentagem de linfócitos CD4⁺ CD25^{High} no sangue dos indivíduos estudados. (C) Porcentagens de linfócitos CD4⁺ CD25^{Low} no sangue dos indivíduos estudados. TO: transplantados renais em estado de tolerância operacional (n=4). BI: transplantados renais com baixa imunossupressão (n=5). Est: transplantados renais com função estável do enxerto e imunossupressão padrão (n=12). RC: transplantados renais com rejeição crônica (n=11). Sau: indivíduos saudáveis (n=10). Nas linhas horizontais estão representadas as medianas para cada grupo.

Realizamos, posteriormente, a análise do fator de transcrição Foxp3 em células T CD4⁺ CD25⁺ do sangue periférico dos diferentes sujeitos de pesquisa.

Figura 15. Análise das células T CD4⁺CD25⁺ nos diferentes grupos de estudo. (A) Número absoluto de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ em PBMC. (B) Número absoluto de linfócitos CD4⁺ CD25^{high} no sangue dos indivíduos estudados. (C) Número absoluto de linfócitos CD4⁺ CD25^{Low} no sangue dos indivíduos estudados. O número absoluto de células foi calculado em células CD4⁺ CD25⁺ totais, células T CD4⁺ CD25^{low} e em células T CD4⁺ CD25^{high}, com base no hemograma nos diferentes grupos de estudo. TO: transplantados renais em estado de tolerância operacional (n=4). BI: transplantados renais com baixa imunossupressão (n=5). Est: transplantados renais com função estável do enxerto e imunossupressão padrão (n=12). RC: transplantados renais com rejeição crônica (n=11). Sau: indivíduos saudáveis (n=10). Nas linhas horizontais estão representadas as medianas para cada grupo.

Na análise percentual, o grupo TO e o grupo Sau apresentaram uma maior porcentagem de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ em comparação aos grupos Est e RC (p<0,05). O grupo BI teve um maior percentual comparado

ao grupo RC ($p < 0,05$). Não foi observada diferença entre os grupos Est e o RC e entre os grupos TO, BI e Sau (Figura 16A).

Figura 16. Análise das células T CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ nos diferentes grupos de estudo. (A) Porcentagem de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ em PBMC. (B) Porcentagem de linfócitos CD4⁺CD25^{High} Foxp3⁺ no sangue dos indivíduos estudados. (C) Porcentagem de linfócitos CD4⁺CD25^{Low} Foxp3⁺ no sangue dos indivíduos estudados. TO: transplantados renais em estado de tolerância operacional (n=4). BI: transplantados renais com baixa imunossupressão (n=5). Est: transplantados renais com função estável do enxerto e imunossupressão padrão (n=12). RC: transplantados renais com rejeição crônica (n=11). Sau: indivíduos saudáveis (n=10). Diferença estatística: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$). Nas linhas horizontais estão representadas as medianas para cada grupo.

A população de células T CD4⁺CD25⁺ foi dividida em duas populações celulares, uma CD25^{High} e outra CD25^{Low}, e a expressão de Foxp3 analisada nessas populações. Na população CD25^{High} apenas os grupos Sau e TO tiveram um maior percentual em comparação ao grupo RC ($p < 0,05$). Não

foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos TO, BI, Est e Sau. O grupo Est apresentou um perfil semelhante ao grupo RC nessa população celular analisada (Figura 16B). Na população de célula T $CD25^{Low}Foxp3^{+}$ foi observada uma maior diferença entre os grupos. Nessa população, os grupos TO, BI e Sau tiveram um percentual de células T $CD25^{Low}Foxp3^{+}$ semelhante e significativamente maior que os grupos Est e RC ($p<0,05$), os quais apresentaram um perfil semelhante entre si (Figura 16C).

O número absoluto de células T $CD4^{+}CD25^{+}$ expressando Foxp3 também foi calculado. Os grupos dos indivíduos TO, dos baixa imunossupressão e dos doadores renais saudáveis apresentaram um maior número de células T $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ quando comparado tanto com o grupo RC como o grupo de indivíduos estáveis com imunossupressão convencional (Figura 17A). Não observamos diferença entre o grupo TO e os grupos de BI e Sau. Também não foi observada diferença entre os grupos Est e do RC (Figura 17A).

A população de células T $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ foi dividida, conforme realizado para o cálculo percentual, em duas populações celulares, uma $CD25^{High}Foxp3^{+}$ e outra $CD25^{Low}Foxp3^{+}$ e o número absoluto calculado nessas populações (Figuras 17B e 17C). Na população $CD25^{High}Foxp3^{+}$ apenas os grupos Sau e TO tiveram um maior número de células por mm^3 de sangue em comparação ao grupo RC ($p<0,05$). O grupo Sau também teve um maior número de células quando comparado àquele do grupo dos Est ($p<0,05$) (Figura 17B). Na população de células T $CD25^{Low}Foxp3^{+}$ foi observada, conforme observado na análise percentual, uma maior diferença,

estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Nessa população os grupos TO, BI e Sau tiveram um número de absoluto de células T $CD25^{Low}Foxp3^{+}$ semelhante e significativamente maior que os grupos Est e RC ($p < 0,05$), os quais não apresentaram diferença entre si (Figura 17C).

Figura 17. Análise das células T $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$, por citometria de fluxo, nos diferentes grupos de estudo. (A) Número absoluto de linfócitos T $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ em PBMC. (B) Número absoluto de linfócitos $CD4^{+}CD25^{High}Foxp3^{+}$ no sangue dos indivíduos estudados. (C) Número absoluto de linfócitos $CD4^{+}CD25^{Low}Foxp3^{+}$ no sangue dos indivíduos estudados. O número absoluto de células foi calculado em células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ totais, células T $CD4^{+}CD25^{Low}Foxp3^{+}$ e em células T $CD4^{+}CD25^{High}Foxp3^{+}$ com base no hemograma, nos diferentes grupos de estudo. TO: transplantados renais em estado de tolerância operacional ($n=4$). BI: transplantados renais com baixa imunossupressão ($n=5$). Est: transplantados renais com função estável do enxerto e imunossupressão padrão ($n=12$). RC: transplantados renais com rejeição crônica ($n=11$). Sau: indivíduos saudáveis ($n=10$). Diferença estatística: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$). Nas linhas horizontais estão representadas as medianas para cada grupo.

Análise das vias de sinalização IL-4/STAT6 e IL-6/STAT3

Para a análise das vias de sinalização, as células do sangue foram estimuladas com IL-4 ou IL-6 a 37° C para a avaliação da fosforilação e ativação das proteínas STAT6 ou STAT3, respectivamente. Primeiramente, fizemos a otimização do número mínimo de células necessário para a realização do ensaio e, posteriormente, da cinética de ativação e uso de diferentes concentrações de estímulos. Após essa etapa, optou-se por uma concentração de 2,5ng de IL-4 e 5ng de IL-6 para estimular 2.10^6 células em um tempo de estímulo de 15 minutos. Após esse período, as células foram fixadas com paraformoldeído a 4% e permeabilizadas para a marcação intracelular e de superfície, conforme descrito em Material e Métodos. As células foram marcadas com os anticorpos anti CD3 FITC, anti CD4 PercP e anticorpos anti as determinadas proteínas fosforiladas, sendo todos os anticorpos marcados com PE. Foram realizadas duas condições, uma sem o estímulo (controle negativo) e outra com o estímulo da IL-4 ou IL-6. Foi delimitada uma região em linfócitos e uma em monócitos de acordo com o tamanho e granulosidade, e a análise da fosforilação das diferentes proteínas foi visualizada em células T $CD3^+ CD4^+$, $CD3^+ CD4^-$, $CD3^-$ e, também, na região de monócitos. Após a etapa de padronização, as vias de sinalização IL-4/STAT6 e IL-6/STAT3 foram consideradas otimizadas para a avaliação da fosforilação desses fatores de transcrição em PBMC nos sujeitos de pesquisa.

Via de Sinalização IL-6/STAT3

Para a visualização da fosforilação e ativação de STAT3 as PBMC foram estimuladas com IL-6, por 15 minutos a 37° C,. A fosforilação de STAT3 foi observada nas regiões de monócitos e células T CD3⁻, CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD4⁻(Figura 18). A porcentagem de fosforilação nas populações celulares foi determinada em comparação àquela de células não estimuladas (Figura 19).

Em todos os indivíduos analisados houve a ativação dessa via de sinalização frente ao estímulo com IL-6, em pelo menos uma das regiões estudadas (Figura 18). Nos diferentes grupos de estudo foi calculado o aumento percentual da mediana da intensidade de fluorescência (MFI) comparando-se as PBMC estimuladas e não estimuladas, nas regiões celulares de monócitos e linfócitos CD3⁻, CD3⁺ CD4⁺ e CD3⁺ CD4⁻ (Figura 19). No total, foram analisados 4 indivíduos transplantados em estado de tolerância operacional, 5 indivíduos transplantados com baixa imunossupressão, 10 indivíduos com rejeição crônica, 10 indivíduos Est, e 8 indivíduos saudáveis. O grupo dos indivíduos em tolerância operacional não apresentou diferenças quanto à capacidade de ativar essa via de sinalização quando comparado aos outros grupos de estudo, entretanto teve um padrão que se assemelhou mais ao grupo Sau em comparação a todos os outros grupos. O grupo dos indivíduos estáveis e imunossupressão convencional teve uma maior porcentagem de fosforilação de STAT3, estatisticamente significativo, na população de monócitos quando comparado com o grupo dos doadores renais saudáveis ($p < 0,05$) (Figura 20D).

Figura 18. Análise da sinalização via IL-6/STAT3 no indivíduo Est9, do grupo estável, por Citometria de Fluxo - PhosFlow. PBMC foram estimuladas com IL-6. Foram adquiridos 200.000 eventos, na região de linfócitos, e as células analisadas com base no tamanho (FSC, do inglês, “Forward Scatter”, dispersão frontal) e na granulosidade (SSC, do inglês, “Side Scatter”, dispersão lateral) (A). Foi delimitada uma região de monócitos e uma de linfócitos (A). Dentro da região de linfócitos foram selecionadas as regiões de linfócitos CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD4⁻, CD3⁻ (B). (C) Células não estimuladas. (D) Células estimuladas com IL-6. Dentro dos quadrantes estão mostradas as porcentagens de células. pSTAT3: STAT3 fosforilada.

Figura 20. Análise da fosforilação de STAT3 nas regiões celulares de linfócitos CD3⁻ (A), CD3⁺CD4⁺ (B), CD3⁺CD4⁻ (C) e de monócitos (D). O cálculo da porcentagem de aumento da mediana da intensidade de fluorescência (MFI), frente ao estímulo com IL-6, foi feito proporcionalmente à condição sem estímulo e é mostrado como porcentagem de aumento. TO: tolerância operacional (n=4); RC: rejeição crônica (n=10); Est: Estáveis com imunossupressão convencional (n=10); BI: indivíduos com baixa imunossupressão (n=5); Sau: indivíduos saudáveis (n=8).. Diferença estatística: ** (p<0,01). Nas linhas horizontais estão representadas as medianas para cada grupo.

Via de Sinalização IL-4/STAT6

A fosforilação de STAT6 foi observada nas regiões de monócitos, células T CD3⁻, CD3⁺ CD4⁺ e CD3⁺ CD4⁻ (Figura 21). A porcentagem de aumento da fosforilação foi calculada comparativamente às células não estimuladas (Figura 22).

Em todos os indivíduos analisados houve a ativação dessa via de sinalização frente ao estímulo com IL-4 (Figura 21). Nos diferentes grupos do estudo foi calculado o aumento percentual da mediana da intensidade de fluorescência (MFI) comparando-se as PBMC estimuladas e não estimuladas nas populações celulares de monócitos e células T $CD3^-$, $CD3^+ CD4^+$ e $CD3^+ CD4^-$ (Figura 22).

No total, para esta via de sinalização, foram estudados 4 indivíduos transplantados renais em estado de tolerância operacional, 8 indivíduos com rejeição crônica, 12 indivíduos estáveis com imunossupressão convencional, 5 indivíduos sob baixa imunossupressão e 10 doadores renais saudáveis. A análise da fosforilação de STAT6 nos diferentes grupos de estudo mostrou diferença estatisticamente significativa para as regiões de linfócitos e monócitos ($p < 0,05$) (Figura 23). As diferenças significativas nas populações de linfócitos foram: (i) na região de $CD3^+ CD4^+$, a fosforilação de STAT6 foi maior no grupo BI em comparação aos grupos Est e RC ($p < 0,05$), sem apresentar diferença em relação aos grupos Sau e TO (Figura 23B); (iii) na região de células T $CD3^+ CD4^-$, o grupo Sau apresentou uma maior porcentagem de fosforilação de STAT6 em comparação ao grupo Est ($p < 0,05$) (Figura 23C). Na análise da região de linfócitos $CD3^-$ o grupo TO não apresentou diferenças, estatisticamente significativas, em relação aos outros grupos estudados. De uma forma geral, os grupos RC e Est tiveram um padrão similar de ativação de STAT6 na região de linfócitos.

Figura 21. Análise da sinalização via IL-4/STAT6 do indivíduo RC13, do grupo de rejeição crônica, por Citometria de Fluxo - PhosFlow. PBMC foram estimuladas com IL-4. Foram adquiridos 200000 eventos, na região de linfócitos, e as células analisadas com base no tamanho (FSC, do inglês, “*Forward Scatter*”, dispersão frontal) e na granulosidade (SSC, do inglês, “*Side Scatter*”, dispersão lateral) (A). Foi delimitada uma região de monócitos e uma de linfócitos (A). Dentro da região de linfócitos foram selecionadas as regiões de linfócitos CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD4⁻, CD3⁻ (B). (C) Células não estimuladas. (D) Células estimuladas com IL-4. Dentro dos quadrantes estão mostrados as porcentagens de células. pSTAT6: STAT6 fosforilada.

Figura 22. Histograma representativo, do indivíduo RC13, do grupo de rejeição crônica, da análise da fosforilação de STAT6 nas regiões de linfócitos CD3⁺ (A), CD3⁺CD4⁺ (B), CD3⁺CD4⁻ (C) e de monócitos (D). Em azul – células estimuladas com IL-4 e em vermelho o controle sem estímulo. Mediana da intensidade de fluorescência (MFI). S EST: sem estímulo.

Na análise da fosforilação de STAT6 na região de monócitos, o grupo de indivíduos em tolerância operacional apresentou uma menor capacidade de fosforilar STAT6 e, conseqüentemente, de ativar essa via de sinalização quando comparado com todos os outros grupos de estudo. A menor diferença foi observada em relação ao grupo BI (Figura 23D).

Figura 23. Análise da fosforilação de STAT6 nas regiões celulares de linfócitos CD3⁺ (A), CD3⁺CD4⁺ (B), CD3⁺CD4⁻ (C) e de monócitos (D). O cálculo da porcentagem de aumento da mediana da intensidade de fluorescência (MFI), frente ao estímulo com IL-4, foi feito proporcionalmente à condição sem estímulo e é mostrado como porcentagem de aumento. TO: tolerância operacional (n=4); RC: rejeição crônica (n=8); Est: Estáveis com imunossupressão convencional (n=12); Sau: indivíduos saudáveis (n=10); BI: Baixa imunossupressão (n=5). Diferença estatística: * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001). Nas linhas horizontais estão representadas as medianas para cada grupo.

Análise da Expressão de IL-4R α e SOCS3

Devido às diferenças observadas, de forma significativa na fosforilação de STAT6 em comparação a STAT3 nos diferentes grupos de estudo iniciamos a busca para as possíveis causas desses achados.

Pelo fato de SOCS3 ser um regulador negativo da via de sinalização IL-6/STAT3 fizemos a análise da expressão dessa proteína nos diferentes grupos de estudo (Figura 24). Apesar do envolvimento de SOCS3 na regulação dessa via de sinalização, não observamos diferenças na expressão dessa proteína nos diferentes grupos de estudo.

Figura 24. Expressão gênica relativa de SOCS3 nos diferentes grupos de estudo. Estão representados quatro grupos de estudo: Rejeição crônica (RC, n=10), estáveis com imunossupressão convencional (Est, n=11), tolerantes operacionais (TO, n=4) e com baixa imunossupressão (BI, n=5). O índice de expressão relativa foi calculado em relação aos doadores renais saudáveis. Estão representadas as médias $\pm$ SEM.

A via de sinalização IL-4/STAT6 teve importantes diferenças quanto à fosforilação de STAT6 nos diferentes grupos de estudo, principalmente na região de monócitos. Realizamos, então, seja para excluir ou para confirmar, que uma reduzida capacidade de fosforilar STAT6 poderia ser devido a uma menor expressão do receptor de IL-4 na superfície celular, fizemos, por PCR em tempo real, a análise da expressão desse receptor nos diferentes grupos

de estudo. Não foi encontrada uma associação entre a expressão relativa do receptor de IL-4 e a capacidade de fosforilar STAT6, e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os diferentes grupos de estudo. Os indivíduos TO, os quais apresentaram uma capacidade de fosforilar STAT6 na região de monócitos, apresentou uma maior expressão de IL-4R α quando comparado a todos os outros grupos estudados, e o grupo BI apresentou a menor expressão de IL-4R α (Figura 25).

Figura 25. Expressão gênica relativa de IL-4R α nos diferentes grupos de estudo. Estão representados quatro grupos de estudo: Rejeição crônica (RC, n=10), estáveis com imunossupressão convencional (Est, n=11), tolerantes operacionais (TO, n=4) e com baixa imunossupressão (BI, n=5). O índice de expressão relativa foi calculado em relação aos indivíduos saudáveis. Estão representadas as médias $\pm$ SEM.* (p<0,05).

Balanco global do conjunto de resultados

De uma forma geral, os indivíduos tolerantes operacionais apresentaram um predomínio de modificações imunorreguladoras comparativamente a todos os outros grupos e, principalmente, ao grupo de rejeição crônica. Esses indivíduos apresentaram uma maior estabilidade na

expressão gênica, nos dois pontos analisados, e uma manutenção da maior expressão dos genes considerados como predominantemente imunorreguladores. Ademais, esses indivíduos tiveram uma maior quantidade e porcentagem de células T potencialmente reguladoras em comparação aos indivíduos com rejeição crônica e com função estável do enxerto e imunossupressão convencional. Finalmente, dentre as duas vias de sinalização analisadas, a via de IL-4/STAT6 na região de monócitos, no indivíduo TO teve um padrão diferenciado de fosforilação comparativamente a todos os outros grupos estudados, incluindo o grupo de doadores renais saudáveis. Na Tabela 12 mostramos um balanço global dos resultados obtidos neste trabalho.

Tabela 12 - Balanço Global dos Resultados

	TO	BI	Est	RC	Sau
Foxp3	↑	=	=	↓	NA
TGF-β	↑	↓	=	=	NA
TGF-βR	↑	↓	↓	=	NA
GATA-3	↑	=	=	=	NA
Concordância REGULA	↑	=	=	=	NA
Célula CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺	=	=	=	↓	=
Célula CD4⁺CD25^{Low}Foxp3⁺	=	=	↓	↓	=
Célula CD4⁺CD25^{High}Foxp3⁺	=	=	=	↓	=
STAT3 Mon	=	=	=	=	↓
STAT6 CD3+CD4⁺	=	↑	=	=	=
STAT6 Mon	↓	=	=	=	=

Balanço global do perfil imunorregulador estudado. Estão representados cinco grupos de estudo: Rejeição crônica (RC), estáveis com imunossupressão convencional (Est), tolerantes operacionais (TO) e com baixa imunossupressão (BI) e doadores renais saudáveis (Sau). A análise da expressão gênica foi realizada em comparação aos doadores renais saudáveis. NA: não se aplica.

5. DISCUSSÃO

O nosso objetivo, neste trabalho, foi descrever um perfil imunológico molecular em indivíduos transplantados tolerantes operacionais comparativamente àqueles com rejeição crônica, àqueles com função estável do enxerto e imunossupressão convencional e àqueles também com função estável do enxerto e baixa imunossupressão. Para este exame de dissertação de mestrado nós apresentamos os seguintes estudos realizados: (i) a análise de um painel de citocinas e fatores de transcrição por PCR em tempo real (em 2 momentos distintos), (ii) a análise das vias de sinalização IL-4/STAT6 e IL-6/STAT3 nos diferentes grupos de estudo e, (iii) a análise de expressão intracitoplasmática de Foxp3 em células T CD4⁺CD25⁺ no sangue dos diferentes grupos clínicos estudados.

Conforme descrito em material e métodos, para o agrupamento dos diferentes indivíduos nos grupos de estudo, consideramos como críticos o tempo de transplante, o nível de imunossupressão, a análise histopatológica (para o grupo de rejeição crônica-RC) e a função renal. Como parâmetro para se determinar a função renal, usou-se a creatinina sérica obtida no momento da coleta do material biológico a ser estudado. A análise da creatina nesses indivíduos, no momento da coleta, mostrou níveis séricos significativamente mais elevados nos indivíduos com rejeição crônica, destacando-se o paciente RC2 que evoluiu com perda do enxerto. Os outros grupos de estudo apresentaram valores médios de creatinina dentro dos níveis considerados normais.

A doença de base mais comum nos diferentes indivíduos transplantados renais foi a glomerulonefrite crônica, entretanto não foram encontradas relações entre as doenças de base e os parâmetros imunológicos avaliados nesse trabalho.

O desfecho individual do órgão transplantado depende, entre outros fatores, da ativação do sistema imune do indivíduo, de seu estado atual e de suas experiências imunológicas. Um receptor que apresenta uma reatividade exacerbada, por exposição prévia a diferentes aloantígenos, pode possuir uma maior predisposição a desenvolver algum tipo de rejeição. Desse modo, transfusões sanguíneas e gestações podem aumentar o potencial de respostas alogênicas, desempenhando um importante papel na evolução clínica do órgão transplantado (Brand, 2002). Contudo, não encontramos uma relação entre o número de estímulos alogênicos, como transfusões sanguíneas e gestações, com a evolução seja para rejeição ou tolerância do enxerto.

Na literatura é descrito que receptores de órgãos de doadores cadavéricos possuem uma maior tendência a desenvolver rejeição crônica do que aqueles que receberam órgãos provenientes de doadores vivos, sendo esse fator relacionado com longos tempos de isquemia e função retardada do enxerto (Terasaki *et al.*, 1995a). Também há relatos de que indivíduos receptores de órgãos provenientes de doadores vivos possuem uma maior chance de aceitar o enxerto do que indivíduos que receberam órgãos provenientes de doadores cadavéricos (Terasaki *et al.*, 1995a; Terasaki *et al.*, 1995b). Em nossos dados, tempos de isquemia prolongados

estão relacionados à função retardada do enxerto e à ocorrência de rejeição, seja crônica ou aguda. Em corroboração a essa observação, na literatura é descrito que longos tempos de isquemia e o tipo de doador, doador cadavérico, estão associados com uma maior prevalência tanto de rejeição crônica como aguda (Land, 2005).

Os maiores tempos de isquemia foram observados no grupo RC. Um maior tempo de isquemia pode provocar lesões teciduais que poderiam evoluir e induzir respostas aloimunes, culminando em um processo de rejeição. A hipótesede “sinais de perigo”, formulada pela pesquisadora Polly Matzinger, fornece uma explicação para a rápida ativação do sistema imune na ausência de sinais não próprios(Matzinger, 2002), como,por exemplo, pode explicar processos de rejeição entre gêmeos idênticos. Nesse sentido, o sistema imune responderia, em uma fase inicial, a sinais relacionados ao tecido lesionado (resposta inflamatória inespecífica) e não a aloantígenos, os quais iriam alertar o sistema imune. Esse modelo sugere que lesões inflamatórias não específicas, como consequência de procedimentos cirúrgicos, isquemia prolongada, alterações no fluxo sanguíneo ou mesmo morte cerebral poderiam ativar a imunidade inata iniciando uma resposta imune no órgão transplantado (Tullius *et al.*, 2000; Paterson *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2005). Durante a reperusão, células dendríticas residentes no enxerto são ativadas e células T CD4⁺, monócitos e macrófagos infiltram o enxerto reperfusionado, levando a uma liberação de diversas citocinas e quimiocinas (Land *et al.*, 1994; Land, 2005). Com base nesses dados, sugere-se que mecanismos precoces da imunidade inata ativados devido a

lesões teciduais podem resultar em uma resposta imune que propicie o desenvolvimento de um processo de rejeição, seja crônica ou aguda e pode ser um dos mecanismos pelos quais indivíduos que possuem função retardada do enxerto, por exemplo, possuem uma maior chance de rejeitar o órgão transplantado.

Quando analisamos os diferentes esquemas imunossupressores e a evolução do órgão transplantado não observamos diferenças significativas entre os diferentes grupos. Entretanto, em relação à realização de terapia de indução com anticorpos mono ou policlonais, observamos que 11 dos 12 indivíduos pertencentes ao grupo Est foram submetidos à indução com ATG (globulina anti-timocitaria), daclizumab (anticorpo humanizado anti-CD25) ou basilixmab (anticorpo quimérico anti-CD25). Neste nosso estudo a realização de indução com imunobiológicos não foi relacionada com uma possível indução de tolerância, pois isso não foi observado no grupo TO nem no grupo de indivíduos com baixa imunossupressão. Contudo, é descrito que a utilização do anticorpo humanizado anti-CD52 Campath, como um agente depletor de células T, promove uma expansão de células T reguladoras pós depleção, com função supressora confirmada, *in vitro* (Morris *et al.*, 2006). No entanto, este imunobiológico não foi usado nos sujeitos de pesquisa do presente trabalho. Também foi descrito que o ATG pode promover uma rápida e estável expansão de potenciais células T reguladoras, *in vitro*, assim como aumento na expressão de Foxp3 (Lopez, M. *et al.*, 2006). Não observamos um maior número de potenciais células T reguladoras com imunofenótipo de CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nos indivíduos que receberam indução

em comparação aos outros sujeitos de pesquisa. Os indivíduos com função estável do enxerto e imunossupressão convencional apresentaram tempos de transplante superiores a 3 anos e é provável que essa expansão de células T potencialmente reguladoras se estabilize após um certo período de tempo. Outro fator é que, em nosso trabalho, os indivíduos transplantados renais, submetidos à indução com imunobiológicos, não utilizaram o anticorpo humanizado Campath e, dessa forma, não podemos inferir a mesma conclusão do trabalho descrito com esse anticorpo. Assim, não conseguimos observar essa expansão, no momento em que coletamos o material biológico, de células potencialmente reguladoras apesar de Noris e colaboradores terem relatado que mesmo após 24 meses do transplante um maior número de células T reguladoras ainda podia ser observado (Noris *et al.*, 2007).

A expansão de células T reguladoras, como promovida pelo anticorpo humanizado Campath, parece não ser o único mecanismo que dirige o órgão transplantado à estabilidade e outros mecanismos podem estar envolvidos. Em trabalhos realizados em nosso grupo foi mostrado que o anticorpo anti-CD3, humanizado por nosso grupo, induziu, *in vitro*, um perfil imunorregulador com uma baixa produção de IFN- γ e uma manutenção da produção de IL-10, resultando em uma maior relação IL-10/IFN- γ em comparação ao perfil induzido pelas versões não humanizadas. Em outros trabalhos descreveram-se anticorpos humanizados com características imunorreguladoras, como os anticorpos humanizados e quiméricos construídos a partir do anticorpo murino OKT3, que possuem capacidade de

induzir e/ou expandir células com características supressoras (Ablamunits *et al.*, 2008; Yi *et al.*, 2008). Assim, existem diversos caminhos imunorreguladores e qual é o dominante, em um determinado processo, e que dita como será o desfecho do órgão transplantado ainda não é bem estabelecido. Contudo, a realização de terapias de indução com anticorpos humanizados parece ser um importante aliado na indução e manutenção de uma função estável no enxerto.

Dentro dos diferentes grupos clínicos, estudamos a expressão de genes tidos como predominantemente imunorreguladores, REGULA, (IL-10, GATA-3, TGF- β , TGF- β R e Foxp3) e predominantemente pró inflamatórios, INFLAMA, (TNF- α , T-bet e IFN- γ), em PBMC, buscando-se uma análise mais global que auxilie na identificação de um perfil imunológico diferencial nos diferentes estados clínicos.

Quando analisamos o perfil de citocinas e fatores de transcrição, por PCR em tempo real, *ex vivo*, observamos, na primeira amostra, uma maior expressão do fator de transcrição GATA-3, típico de células Th2, no grupo dos indivíduos tolerantes operacionais em comparação a todos os outros grupos estudados. No contexto de nosso trabalho, podemos interpretar que essas células poderiam ter um papel protetor por sua capacidade de suprimir as células Th1, inibindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias e sua habilidade de desencadear uma hipersensibilidade do tipo tardio. Em concordância com esta hipótese, as células do padrão Th2 foram descritas, por diversos pesquisadores, como tendo um efeito protetor em relação a processos de rejeição ao enxerto (Lee *et al.*, 2000; Waaga *et al.*, 2001;

Davidson *et al.*, 2007). Ademais, GATA-3 inibe, na região promotora, a transcrição de IFN- γ independentemente da ligação de elementoscis-reguladores (Kaminuma *et al.*, 2004). Outro fator é que GATA-3 é capaz de inibir a diferenciação de células Th1 por inibir a transcrição e ativação de STAT4 (Usui *et al.*, 2003). A interação direta entre T-bet e GATA-3 também foi relatada (Schaeffer *et al.*, 2001; Hwang *et al.*, 2005). Uma provável consequência funcional dessa interação pode ser bidirecional, permitindo que esses dois fatores de transcrição regulem um o outro. Esses mecanismos devem ser operantes, pelo menos, em células como timócitos, células T recém ativadas e ainda não diferenciadas e em células NKT invariantes, em que ambos os fatores de transcrição coexistem. Assim, GATA-3 pode, de uma forma geral, inibir uma resposta Th1, associada a processos de rejeição, tanto aguda como crônica, permitindo uma mudança no equilíbrio Th1/Th2 que pode ser benéfico na manutenção da homeostase ao órgão transplantado, observado nos grupos com tolerância operacional, no baixa imunossupressão, e naquele com função estável do enxerto e imunossupressão convencional. É importante destacar que não observamos uma associação inversa entre a expressão de GATA-3 e de IFN- γ , embora a expressão de IFN- γ tenha-se mostrado inferior à de T-bet, fator de transcrição presente em células Th1. Sugerimos que uma maior quantidade de células Th2, observada devido à maior expressão de GATA3, possa inibir células Th1, que expressam T-bet, culminando com uma redução na transcrição de IFN- γ . Isso propiciaria uma redução em respostas imunes

celulares próinflamatórias ao enxerto, podendo favorecer o estabelecimento da homeostase.

Nesse sentido, vale destacar o relato em que clones de células T geradas de pacientes com rejeição crônica, foram capazes de secretar citocinas do padrão Th1, na presença alopeptídeos HLA-DR, e que clones de células T provenientes de pacientes com função estável do enxerto secretaram citocinas do padrão Th2 (Waaga *et al.*, 2001). Isso reforça a hipótese de que uma mudança de equilíbrio entre células Th1/Th2, com predomínio de células Th2, poderia favorecer um melhor desfecho para o órgão transplantado, conforme observado nos indivíduos tolerantes operacionais. Embora o estado de função estável não signifique tolerância imunológica, esse dado reforça um possível papel das células Th2 no processo de homeostase ao enxerto. Em contrapartida a essas diferenças descritas entre os indivíduos estáveis e os indivíduos com rejeição crônica, em nossos resultados não houve diferença na expressão de GATA-3 entre o grupo Est e o RC. Ademais ao fato de não termos observado diferença entre o grupo Est e o RC, na literatura é descrito que um desvio para um perfil Th2 seria benéfico na evolução do órgão transplantado (Scully *et al.*, 1997; He *et al.*, 2001; Stremmel *et al.*, 2006; Davidson *et al.*, 2007) e pode ser um dos mecanismos pelos quais os indivíduos tolerantes operacionais conseguiram chegar a esse estado. É importante ressaltar que não há, na literatura, trabalhos sobre a expressão desse fator de transcrição em indivíduos tolerantes operacionais.

Destacamos que, em nosso estudo, a maior expressão de GATA-3 no grupo dos indivíduos tolerantes operacionais foi observada comparativamente a todos os outros grupos. O grupo dos indivíduos com função estável do enxerto e imunossupressão convencional (Est) teve uma expressão similar quando comparado com o de rejeição crônica, o que sugere que o estado de tolerância operacional e o de função estável com o uso de imunossupressão sejam distintos, embora em ambos não haja substancial agressão ao enxerto.

Apesar do equilíbrio Th1/Th2 parecer importante no desfecho do transplante, o predomínio de um determinado subtipo celular, como Th2, por exemplo, não necessariamente resultará em um aumento de citocinas Th2, como IL-4 e IL-5. Lembramos que tanto citocinas do padrão Th1 como Th2 podem ser encontradas em órgãos rejeitados e, ainda mais, muitos tipos celulares podem secretar essas citocinas, não podendo, assim, se atribuir uma maior produção de determinada citocina a um determinado tipo celular. É importante destacar que células Th2 também desempenham um importante papel no processo de reparo tecidual; suas citocinas estimulam a secreção de componentes da matriz extracelular, processos que podem estar ativos nos indivíduos com rejeição crônica (Ong *et al.*, 1999; Bhogal *et al.*, 2005; Fichtner-Feigl *et al.*, 2006; Aoudjehane *et al.*, 2008). No entanto, uma maior expressão do fator de transcrição GATA-3 no grupo dos indivíduos tolerantes operacionais não parece estar relacionada a um processo de fibrose, pois esses indivíduos não apresentam sinais de danos teciduais relevantes. Assim, é possível que a predominância de um padrão

de resposta Th2 em relação a Th1, na ausência de lesão e reparo tecidual substancial, seja benéfica para esses indivíduos em estado de tolerância operacional, em contraste dos indivíduos com rejeição crônica. É importante destacar que essa é apenas uma das vias de regulação e outros elementos imunorreguladores devem estar envolvidos nesse processo. Por isso, acreditamos que análises mais globais sejam importantes, pois o desfecho e o processo de tolerância ao enxerto dependem de diversos fatores tanto sinérgicos como antagônicos.

Os indivíduos com baixa imunossupressão apresentaram a menor expressão média de GATA-3 em comparação aos outros grupos de estudo. Isso sugere que esses indivíduos possuem um perfil diferenciado tanto em comparação ao grupo TO como o Est, com uma expressão mais semelhante aos doadores saudáveis em comparação aos outros grupos estudados. Nos indivíduos com função estável do enxerto e imunossupressão convencional, a expressão de GATA-3 pode indicar um estado intermediário de mobilização de populações Th2, entre a tolerância e a rejeição, pois mesmo sem lesão expressiva no órgão transplantado, eles possuem uma maior frequência de indivíduos com uma maior expressão de GATA-3 em relação aos saudáveis (5 de 11). No entanto, neste grupo observamos também uma maior variação de expressão desse gene nos diferentes indivíduos. Assim, o fator de transcrição GATA-3, presente em células Th2, dependendo do contexto, pode indicar um papel mais imunorregulador, possivelmente nos indivíduos TO e alguns indivíduos Est, como também auxiliar no processo de

reparo tecidual e lesão crônica do enxerto presente nos indivíduos com rejeição crônica.

A despeito de uma visão mais dominante sobre o efeito imunorregulador do padrão Th2 no transplante, há dados na literatura nos quais aponta-se um efeito mais pró-inflamatório e relacionado à fibrose. Utilizando-se um modelo animal para se avaliar o papel de células Th1 e Th2 no processo de tolerância e rejeição do enxerto, observou-se que um acúmulo inicial de IFN- γ no enxerto estava relacionado com uma boa evolução e uma maior chance do órgão ser tolerizado, enquanto que um desvio para Th2 estaria associado à rejeição crônica (Pirenne *et al.*, 2005). Além disso, as células Th2, por meio de suas citocinas, podem intensificar o processo de fibrose (Buttner *et al.*, 2004; Pirenne *et al.*, 2005; Fichtner-Feigl *et al.*, 2006; Aoudjehane *et al.*, 2008). Esses dados apontam para uma participação das células Th2 no processo de rejeição. Como alguns dos indivíduos com rejeição crônica, avaliados nesse projeto, possuem um acúmulo do transcrito GATA-3, um fator de transcrição presente em células Th2, essa pode ser uma possível interpretação da maior expressão de GATA-3 observada em alguns indivíduos com rejeição crônica relativamente aos doadores renais saudáveis. O fator de transcrição GATA-3, presente nas células Th2, pode ser um indicador de um processo de rejeição não clássico, com a participação de células da imunidade inata, os eosinófilos, e orquestrado pelas células Th2, como descrito na literatura (Martinez *et al.*, 1993a; Nolan *et al.*, 1995). Essa também pode ser uma possível explicação

do porque alguns indivíduos com rejeição crônica apresentam uma maior expressão de GATA-3 em relação aos doadores saudáveis.

Em humanos, nos órgãos em que a rejeição parece ser mediada por células Th2, observou-se um acentuado infiltrado eosinofílico tanto em indivíduos transplantados renais (Nolan *et al.*, 1995) como em transplantados hepáticos (Martinez *et al.*, 1993b) e transplantados cardíacos (Trull *et al.*, 2000). Em nosso trabalho, em que analisamos indivíduos com rejeição crônica, observamos uma maior expressão de GATA-3 quando comparada àquela do gene T-bet, sugerindo uma maior participação das células Th2 em processos crônicos, que podem desempenhar tanto funções reguladoras como inflamatórias. Em concordância com nossos achados há dados na literatura em que foi observado, em humanos, um aumento dos genes de T-bet e Fas nos enxertos renais com rejeição aguda, por PCR em tempo real, mas não na crônica, sugerindo um papel das células Th1 mais importante no processo de rejeição aguda quando comparado com a rejeição crônica (Hoffmann *et al.*, 2005).

Quando analisamos os dados na literatura a respeito do papel das células Th2 no transplante não existe um consenso. Como foi citado, existem trabalhos nos quais é indicado um papel imunorregulador desse subtipo celular e, em outros, discute-se sua contribuição no processo de rejeição. É possível que esse subtipo celular, de fato, participe de diversas formas, tanto na rejeição como na manutenção de homeostase do enxerto, variando de indivíduo para indivíduo e, também, em função do momento de evolução do transplante. Apesar disso, indivíduos tolerantes operacionais,

indivíduos com baixa imunossupressão, indivíduos com função estável do enxerto e imunossupressão convencional e indivíduos com rejeição crônica parecem possuir um perfil diferenciado quanto à expressão de GATA-3.

A expressão gênica de IL-10, uma citocina que pode ser secretada por diversos tipos celulares, como células Th2 e células T reguladoras do tipo 1, foi variada nos diferentes grupos de estudo. No entanto, é importante discutir que o grupo de rejeição crônica apresentou uma maior frequência de indivíduos com uma maior expressão gênica de IL-10 em relação aos indivíduos saudáveis (6 em 10). Isso também foi observado no grupo Est (5 em 11). Essa maior expressão pode ser devido à ativação de mecanismos imunorreguladores/anti-inflamatórios em resposta ao processo inflamatório no enxerto. Esses mecanismos poderiam envolver a expressão de IL-10 mediada pelas células reguladoras ou mesmo por uma produção de IL-10, induzida por *feedback*, frente a estímulos desencadeados pela ativação de receptores do tipo *toll*, como descrito na literatura em outros contextos (Roncarolo *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2007).

Em estudos nos quais foi comparada a resposta de um estímulo policlonal em células T CD4⁺ obtidas de indivíduos transplantados renais tolerantes operacionais com rejeição crônica, foi observada uma maior quantidade de IL-10, IL-6, IFN- γ e IL-4 nos indivíduos com rejeição crônica (Louis *et al.*, 2006). Em nosso trabalho encontramos uma maior frequência de indivíduos com uma maior expressão gênica de IL-10 em relação aos doadores renais saudáveis no grupo RC. O aumento de IL-4, descrito por Louis e colaboradores, pode ser indicativo de um possível papel das células

Th2 no processo de rejeição e/ou reparo tecidual, conforme levantamos como hipótese na interpretação de nossos resultados. Em outro artigo, analisando-se, *ex vivo*, a expressão das citocinas IL-10, IL-2, IL-13 e IFN- γ , por PCR em tempo real, em células com um repertório alterado de TCRV β , observou-se um aumento da expressão desses genes nos indivíduos com rejeição crônica, comparativamente aos tolerantes operacionais (Brouard *et al.*, 2005). Em outros trabalhos, tanto em humanos transplantados renais (Nocera *et al.*, 2004) como em camundongos transplantados cardíacos (Csencsists *et al.*, 2005), também foi descrito um aumento de citocinas Th2 no processo de rejeição crônica de transplantes.

No processo de fibrose a IL-10 pode ter um papel benéfico por limitar o reparo tecidual induzido por TGF- β (Kitani *et al.*, 2003). Nesse contexto, foi descrito que o TGF- β atua em células Th1 induzindo a expressão de IL-10 (Demols *et al.*, 2002). A IL-10, nesse contexto, teria um papel de regular o processo de fibrose, por *feedback* negativo, auxiliando na modulação do reparo tecidual (Demols *et al.*, 2002). Essa pode ser uma explicação para a constante observação de IL-10 em indivíduos transplantados renais com rejeição crônica (Brouard *et al.*, 2005; Louis *et al.*, 2006). Não sabemos se a maior expressão de IL-10 observada no grupo dos indivíduos com rejeição crônica estaria associada a um padrão de resposta Th2, atuando como moduladora de reparo tecidual, fazendo parte da fisiopatologia da rejeição crônica, ou se secretada por outras células, como por células T reguladoras ou mesmo células Th1, conforme descrito, fazendo parte da regulação negativa do processo inflamatório em curso. Lembramos que o fator de

transcrição GATA-3 teve uma menor expressão nesse grupo de indivíduos (RC) quando comparado aquela de tolerantes operacionais, e uma associação entre a expressão de IL-10 e GATA-3 não foi observada. Isto diminui a possibilidade da expressão dessa citocina, no contexto da rejeição crônica, ser devido às células Th2. Assim, outros tipos celulares podem ser os responsáveis pela secreção de IL-10, como macrófagos e células T reguladoras ou mesmo células Th1.

Ao analisarmos a expressão de TGF- β e de seu receptor, o grupo dos indivíduos tolerantes operacionais apresentou uma expressão estatisticamente maior desses genes quando comparado com o grupo dos indivíduos transplantados renais estáveis com imunossupressão convencional e, para o receptor de TGF- β também em relação ao grupo com baixa imunossupressão. Apesar de não haver diferença estatística, a expressão desse gene foi mais elevada no grupo dos indivíduos tolerantes operacionais em comparação ao grupo com rejeição crônica, embora alguns indivíduos com rejeição crônica tenham tido uma expressão semelhante aos TO. O grupo Est e, principalmente, o grupo BI apresentou, no geral, uma menor expressão desses genes. Dentro do contexto de tolerância e correlacionando-se com uma expressão elevada desses genes nos indivíduos tolerantes operacionais, o TGF- β pode, nesse grupo, participar na regulação da resposta imune de diversas formas como: (i) Inibindo a proliferação celular em células T ativadas (Kehrl *et al.*, 1986), (ii) inibindo a diferenciação de células Th1 e citotóxicas, (iii) promovendo a supressão por quando secretado pelas células T reguladoras, (iv) auxiliando na geração e

manutenção de células T reguladoras na periferia, por sua capacidade de induzir a expressão de Foxp3 pela ativação e ligação de Smad3 ao *enhancer* do gene de Foxp3 e (v) promovendo a interação de GATA-3 com Smad3, ativado pelo TGF- β , para indução da transcrição de genes alvos de GATA-3 (Blokzijl *et al.*, 2002; Tone *et al.*, 2008).

Analisando-se esses diversos mecanismos, é possível que alguns deles possam estar ativos nesse grupo de indivíduos que conseguiram chegar à homeostase sem mais apresentar processo inflamatório significativo dirigido ao enxerto. Contudo, levantamos que inúmeros mecanismos imunológicos devem estar atuantes nesses indivíduos, contribuindo na manutenção de sua homeostase.

Somando-se ao papel imunorregulador de TGF- β , que pode estar envolvido nos mecanismos responsáveis pelo processo de tolerância no grupo dos indivíduos tolerantes operacionais, essa molécula pode, também, estar relacionada ao processo de rejeição, já que desempenha um importante papel no reparo tecidual e na indução de fibrose, presente na rejeição crônica (Cornell *et al.*, 2008).

O grupo de indivíduos transplantados renais com rejeição crônica, embora sem diferença estatística, apresentou uma maior expressão de TGF- β e do seu receptor quando comparado aos grupos dos indivíduos estáveis com imunossupressão convencional, dos indivíduos com baixa imunossupressão e, em alguns indivíduos, com uma expressão maior do que aquela observada em indivíduos tolerantes operacionais.

No contexto da rejeição crônica, embora o papel imunorregulador desses genes seja importante, sua participação no processo de fibrose também deve ser considerada. O TGF- β , no microambiente do enxerto, pode promover fibrose ativando diretamente células epiteliais e mesenquimais residentes. Essas células se diferenciam em fibroblastos produtores de colágeno (Wynn, 2008). Há dados na literatura nos quais é mostrado que polimorfismos no gene de TGF- β , em indivíduos receptores de pulmão, resultam em uma produção de grandes quantidades de TGF- β e, essa maior produção, estaria associada a um maior risco em perder seus enxertos tardiamente (Awad *et al.*, 1998; Hutchinson *et al.*, 1998). Ademais, em humanos e em ratos diagnosticados com nefropatia crônica do enxerto foi observado, *in situ*, um aumento na expressão gênica e protéica de TGF- β (Shihab *et al.*, 1995; Paul *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2002).

Diversos são os trabalhos nos quais associa-se a produção de TGF- β e a evolução para rejeição aguda e/ou crônica. Em um estudo, onde 174 biópsias foram analisadas quanto à produção de TGF- β , por PCR em tempo real, observou-se que a expressão de TGF- β foi maior nas biópsias diagnosticadas com rejeição aguda ou crônica em comparação àquelas sem sinais de rejeição (Pribylova-Hribova *et al.*, 2006). Embora, em nossos dados, não tenhamos observado uma diferença estatisticamente significativa em relação ao TGF- β e o seu receptor, quando comparamos a expressão no grupo RC e no grupo Est, na análise pontual, o grupo Est parece apresentar uma menor expressão desses genes comparativamente ao grupo RC. É provável que o tamanho reduzido da nossa amostra em comparação com a

do trabalho descrito seja uma variável importante para a não observação de diferenças significativas entre os grupos. Outro fator que deve ser levado em consideração é que observamos a expressão gênica de TGF- β no sangue, diferentemente do trabalho citado acima no qual foi observada em biópsias. Uma possibilidade é que a expressão desse gene no sangue não reflita, com precisão, o que ocorre no microambiente do enxerto e, dessa forma, uma diferença estatisticamente significativa fica mais difícil de ser observada. Sugerimos que a expressão tanto de TGF- β como de seu receptor, observada no grupo RC, possa ser devido a um processo de reparo tecidual e fibrose, com produção de matriz extracelular, que pode ocorrer devido à constante agressão do sistema imune do receptor ao enxerto.

Há alguns estudos sobre a expressão de TGF- β e de IL-10 em indivíduos tolerantes operacionais. Em um estudo com 4 indivíduos tolerantes operacionais, foi observado, em um ensaio *transvivo* de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH), que em 3 deles a supressão do processo inflamatório frente a antígenos do doador era dependente de IL-10 e TGF- β , uma vez que o cultivo de células do receptor conjuntamente a aloantígenos do doador, na presença de anticorpos anti-IL-10 e anti-TGF- β , induziu a DTH (Vanbuskirk *et al.*, 2000). O grupo dos indivíduos tolerantes operacionais apresentou, em nosso trabalho, uma significativa maior expressão de TGF- β comparativamente ao grupo Est e, embora não estatisticamente significativa, também em relação aos outros grupos. Recentemente, em estudos utilizando *semicroarray*, foi identificada uma

“assinatura” do perfil tolerante operacional, também nas células mononucleares do sangue (Brouard *et al.*, 2007). Dentre os resultados obtidos por esses pesquisadores, observou-se não haver diferença entre a expressão de TGF- β entre os grupos com rejeição crônica e tolerantes operacionais, e uma menor expressão de IL-10 nos indivíduos tolerantes operacionais, quando comparada àquele dos indivíduos em rejeição crônica. Apesar disso, esses pesquisadores observaram que o TGF- β regulava a função de 27% dos genes diferentemente expressos nos indivíduos com rejeição crônica. Esse dado corrobora com os obtidos em nosso trabalho, em que não observamos diferença na expressão gênica de TGF- β entre os grupos TO e RC. Ademais, esse dado em conjunto com nossos resultados mostra que apesar de ambos os grupos de TO e RC expressarem maiores níveis de TGF- β , esse gene pode desempenhar funções diferentes. É possível que o TGF- β tenha um caráter mais imunorregulador nos indivíduos TO e um caráter mais voltado para reparo tecidual e fibrose no grupo RC.

Os menores valores individuais e médios da expressão dos genes de TGF- β e de seu receptor foram observados no grupo Est e no grupo BI, respectivamente. Nesses indivíduos, sob imunossupressão padrão ou baixa imunossupressão, o processo de homeostase na relação com o enxerto possivelmente não foi alcançado. É possível que o estado de não agressão expressiva ao enxerto deva-se, em grande parte, aos efeitos da imunossupressão, pelo menos em relação ao grupo Est. Desse modo, uma menor expressão desses genes nos parece esperada, uma vez que esses indivíduos provavelmente não possuem lesão tecidual ativa no órgão

transplantado, naquele momento. Apesar desses indivíduos não estarem em processo de rejeição, não sabemos se poderiam alcançar um estado de homeostase como o observado no grupo dos tolerantes operacionais, em que esses genes parecem estar relacionados com um processo de imunorregulação.

O processo pelo qual o TGF- β atua é dependente de sua ligação ao seu receptor. A ligação de TGF- β ao seu receptor leva à fosforilação dos fatores de transcrição Smads. Dentre esses fatores de transcrição, Smad3 é capaz de induzir a transcrição de Foxp3 (Tone *et al.*, 2008) e, em diversos trabalhos na literatura é mostrada a importância de TGF- β na geração de células T reguladoras (Baron *et al.*, 2007; Carrier *et al.*, 2007a; Andersson *et al.*, 2008; Shevach *et al.*, 2008).

Quando comparamos a expressão de Foxp3 com a de TGF- β e de seu receptor, observamos que houve um padrão semelhante de expressão desses genes. Os indivíduos tolerantes operacionais tiveram uma maior expressão de Foxp3 tanto gênica como protéica. Embora, para o mRNA não tenha sido estatisticamente significativo quando analisamos somente a primeira amostra. Em contrapartida, quando analisamos a diferença de expressão entre os grupos com as 2 amostras, encontramos uma maior expressão de mRNA de Foxp3 no grupo TO comparado ao grupo RC. Discutiremos a análise sequencial mais adiante.

Na análise da expressão dos genes pró-inflamatórios TNF- α , IFN- γ e T-bet, observamos que não houve um padrão diferenciado de expressão

entre os diferentes grupos. A expressão de T-bet, o fator de transcrição encontrado em células Th1, foi semelhante no grupo dos indivíduos com rejeição crônica e dos estáveis, e muito variada no grupo dos tolerantes operacionais. Apesar da bem documentada importância desse subtipo celular no processo de rejeição do enxerto, esses pacientes estão sob forte imunossupressão, com esteróides e/ou inibidores da calcineurina que podem promover a inibição da síntese de citocinas Th1 e diminuição do número dessas células (Pirenne *et al.*, 2005). O sirolimus e a ciclosporina A, por exemplo, promovem uma redução de IL-12 e IL-2 e, consequentemente, inibição da diferenciação de células Th1 (Libetta *et al.*, 2007). É importante destacar que algumas drogas imunossupressoras também têm um efeito inibitório nas células T reguladoras. Nossos dados sugerem que a imunossupressão pode ter um efeito deletério em relação às células T reguladoras, já que ambos os grupos em que doses convencionais de imunossupressores foram utilizadas (RC e Est) apresentaram uma redução no número de células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. Apesar dessa observação, não é possível apontar qual imunossupressor associa-se mais com a diminuição dessas células, uma vez que os indivíduos transplantados renais fazem uso de 2 ou mais drogas imunossupressoras e níveis semelhantes de células foram observadas entre os indivíduos.

A despeito dos múltiplos mecanismos nas respostas ao enxerto, acreditamos que a análise global da expressão gênica de moléculas relacionadas à imunorregulação/inflamação possa fornecer informações a respeito de respostas dominantes em um indivíduo ou em um determinado

grupo de indivíduos. Análises globais não levam em conta o estudo de um único gene/molécula, mas sim de um conjunto, permitindo a análise de efeitos aditivos e mesmo antagônicos desses diferentes genes. Nesse tipo de análise consideramos 2 tipos de modificações, sendo do tipo REGULA (maior expressão de genes predominantemente imunorreguladores e/ou menor expressão de genes predominantemente inflamatórios em relação aos doadores saudáveis) e do tipo INFLAMA (maior expressão de genes predominantemente inflamatórios e/ou menor expressão de genes predominantemente imunorreguladores em relação aos doadores saudáveis). Também classificamos de EQUI quando houve equilíbrio entre modificações do tipo REGULA e INFLAMA em um determinado indivíduo e como SEM MOD quando não houve modificações, apresentando um perfil semelhante aos doadores renais saudáveis. Os grupos RC e Est apresentaram um predomínio de modificações tanto do tipo INFLAMA como do tipo REGULA. O grupo BI um predomínio de modificações do tipo INFLAMA e EQUI e o grupo TO apresentou apenas predomínio de modificações do tipo REGULA. Os indivíduos TO apresentaram um perfil imunorregulador predominante e diferente de todos os outros grupos estudados. Esse perfil foi confirmado quando se faz um cálculo da porcentagem de modificações em cada grupo e observamos que, enquanto os outros grupos tiveram um perfil semelhante de modificações, o grupo TO apresentou uma maior porcentagem de modificações do tipo REGULA e as menores porcentagens de modificações do tipo INFLAMA. Com base nesse dado interpretamos que esses indivíduos possuem uma dominância de

ativação de mecanismos imunorreguladores, os quais os diferencia dos outros grupos de estudo, utilizando-se do painel molecular proposto em nosso estudo. Esse predomínio REGULA poderia ser um fator pelo qual esses indivíduos atingiram um estado de tolerância ao enxerto e sugere que diversos são os fatores envolvidos nesse processo.

Alguns dos indivíduos transplantados renais foram, posteriormente, analisados de forma sequencial, em dois pontos, com intervalos de 4 a 6 meses entre as coletas. Esse tipo de análise pode trazer informações relacionadas à estabilidade do perfil da resposta imune do indivíduo, provavelmente envolvida na resposta ao enxerto, e de como ela pode ser modulada ao longo do tempo. Considerando que a resposta imune é construída com base nas experiências imunológicas de cada indivíduo, acreditamos que este estado imunológico de não agressão ao enxerto envolva também um processo dinâmico que deve apresentar modificações, à medida que o indivíduo vive novas experiências imunológicas. Assim, realizamos uma análise, em 2 tempos distintos, visando acrescentar, a discussão, como o sistema imune desses indivíduos mantém este estado de equilíbrio em relação ao órgão transplantado, durante uma fase de sua vida. Vale destacar a importância deste tipo de análise, uma vez que a não estabilidade do estado imunorregulador pode alterar o estado de homeostase ao enxerto.

Nós, neste bloco experimental, analisamos 22 indivíduos transplantados renais buscando-se observar a estabilidade da expressão dos genes analisados anteriormente, de forma pontual. Também analisamos

a concordância ou discordância entre os tipos de modificação, entre o tempo 1 e o tempo 2, descritas anteriormente de modo pontual, nos diferentes grupos de estudo. Todos os genes analisados apresentaram modificações na sua expressão. Dentre todos os genes estudados em dois tempos, nos diferentes grupos de estudo, apenas o gene de IL-10 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo. A análise de dois pontos distintos nos permitiu observar diferenças estatisticamente significativas que não puderam ser observadas apenas na análise pontual, como por exemplo para gene de Foxp3. Acreditamos, baseados nessa observação, que a análise de dois ou mais pontos distintos, em indivíduos transplantados renais, possa ser uma ferramenta importante ao permitir a identificação de novos parâmetros não evidentes numa análise pontual.

Os genes de TGF β e de TGF- β R tiveram um perfil de modificação semelhante, entre os dois tempos analisados, nos diferentes grupos de estudo o que indica que esses genes são regulados de forma semelhante. Os indivíduos tolerantes operacionais apresentaram, levando-se em conta os tempos 1 e 2, uma maior expressão de TGF- β e TGF- β R comparativamente aos grupos Est e BI. Em comparação ao grupo RC, o grupo TO apresentou uma maior expressão apenas do gene de TGF- β R. Observamos também tanto para o gene de TGF- β como TGF- β R que o grupo RC apresentou uma maior expressão, estatisticamente significativa, comparado aos grupos Est e BI. Essa diferença não foi observada na análise pontual, novamente apontando a importância de se analisar pontos distintos, uma vez que parece fornecer maior poder discriminador. Esse dado reforça

nossa observação de que o TGF- β , no grupo RC, pode atuar desempenhando um importante papel no processo de reparo tecidual e fibrose, conforme discutido anteriormente.

Os indivíduos tolerantes operacionais apresentaram uma maior expressão de GATA-3, nos dois pontos analisados, em comparação aos grupos RC e Est. Esta observação reitera a importância desse fator de transcrição, presente em células T do padrão Th2, no processo de tolerância ao órgão transplantado, conforme discutido anteriormente. Outro fator importante a ser ressaltado é que os indivíduos com baixa imunossupressão tiveram um aumento na expressão de GATA3, comparando-se a primeira com a segunda coleta, não apresentando diferença estatística em comparação ao grupo TO.

O gene de Foxp3 apresentou uma maior expressão no grupo TO em comparação ao RC e BI. Esse dado confirma o resultado observado na análise por citometria de fluxo, discutido posteriormente.

Na análise dos genes pró-inflamatórios, considerando-se 2 tempo distintos, o IFN- γ teve uma maior expressão no grupo BI, estatisticamente significativa, comparado a todos os outros grupos de estudo e, os genes T-bet e TNF tiveram uma maior expressão no grupo TO comparativamente a todos os outros grupos de estudo. É importante destacar que apesar do gene T-bet regular a expressão de IFN- γ (Szabo *et al.*, 2002), no grupo TO houve uma diminuição da expressão de IFN- γ no tempo 2, enquanto que houve um aumento na expressão de T-bet em comparação ao tempo 1, neste mesmo

tempo 2. A mesma observação pode ser feita para o grupo BI, em que o T-bet encontrou-se diminuído no tempo 2 e o IFN- γ aumentado, em comparação ao tempo 1. Isso mostra que não houve uma relação direta entre a expressão de T-bet e IFN- γ . É possível que, apesar de terem uma expressão de T-bet maior do que os outros grupos, essas células não estejam ativadas, uma vez que houve uma diminuição na expressão de IFN- γ . Além disso, o IFN- γ é regulado por T-bet em células CD4 e NK, mas não necessariamente em células CD8. Assim, não podemos excluir que essa população esteja secretando o IFN- γ no grupo dos indivíduos BI (Szabo *et al.*, 2002). Devemos ressaltar que a observação de maiores expressões de genes pró-inflamatórios em indivíduos TO e BI, quando as 2 amostras foram analisadas simultaneamente, parece contraditória com a característica de um possível estado de tolerância nesses indivíduos. Contudo, algumas questões podem ser trazidas para esta discussão: (i) Alvarez e colaboradores, utilizando ensaios de proliferação, relataram que indivíduos tolerantes operacionais apresentaram uma menor capacidade proliferativa frente a células provenientes de seus doadores, mas não de células provenientes de um terceiro partido (Alvarez *et al.*, 2004). Esse dado sugere que a resposta reguladora direcionada ao enxerto é específica e indivíduos tolerantes operacionais podem responder normalmente a outros antígenos, como os provenientes de microorganismos, sem que isso resulte em uma resposta inflamatória dirigida ao enxerto. (ii) os indivíduos pertencentes aos grupos Est e RC estão sob imunossupressão convencional que pode limitar a secreção de citocinas inflamatórias, diferentemente dos grupos TO e BI.

(iii) Uma maior expressão desses genes pró-inflamatórios analisados pode ser combatível com o estado mais regulador observado no grupo TO, uma vez que a maior diferença pode estar na ativação de genes imunorreguladores. (iv) dois dos três indivíduos pertencentes ao grupo BI apresentam infecções pós transplante como hepatite B e C e infecção do trato urinário que podem levar à indução da produção de IFN- γ , observada nesse grupo. Acreditamos que, apesar de esses indivíduos possuírem um aumento de mRNA para moléculas predominantemente próinflamatórias, essa resposta não estaria relacionada ao enxerto e sim a outros estados imunológicos que esses indivíduos poderiam apresentar.

Quando analisamos os resultados no tempo 2, de forma pontual, como fizemos para a amostra 1, observamos que os indivíduos tolerantes operacionais tiveram um predomínio de modificações do tipo REGULA em comparação a todos os outros grupos estudados. Esse predomínio também foi observado no tempo 1. Essa predominância de modificações predominantemente imunorreguladoras pode propiciar o desenvolvimento de um microambiente mais tolerogênico comparado aos outros grupos de estudo o que poderia facilitar o desfecho para um estado de tolerância operacional.

A análise de amostras provenientes de dois momentos distintos nos permite avaliar uma manutenção ou concordância entre os tipos de modificações e inferir se uma determinada modificação de expressão gênica é estável ou não em um determinado indivíduo ou grupo clínico. Nós observamos que os indivíduos com rejeição crônica apresentaram a menor

concordância entre os tipo diferentes tipos de modificações. Esses indivíduos também não apresentaram predomínio de concordância, seja ela relacionada a uma modificação REGULA, uma modificação INFLAMA ou mesmo à não modificação (SEM MOD). Os grupos Est, BI e TO apresentaram uma concordância global semelhante, contudo com variações no tipo de concordância dominante. O grupo Est, apesar de ter uma maior concordância, entre os diferentes genes comparado ao grupo RC, não apresentou nenhuma predominância em relação ao tipo de concordância, seja REGULA, INFLAMA ou SEM MOD. O grupo BI foi o que se mostrou mais semelhante aos doadores renais saudáveis, pois teve uma predominância de concordância do tipo SEM MOD, entre os dois tempos analisados. O grupo dos indivíduos tolerantes operacionais, diferentemente do observado nos outros grupos de estudo, teve um predomínio de concordâncias de modificações de expressão gênica do tipo REGULA, quando comparamos as 2 amostras. Juntos, esses resultados sugerem que o estado de não agressão ao enxerto parece estar relacionado a uma maior estabilidade da expressão gênica ao longo do tempo, principalmente para as modificações do tipo REGULA. É provável que o predomínio de concordâncias SEM MOD observado no grupo BI represente um estado intermediário entre o grupo Est e TO, uma vez que, nesses três grupos, um estado de não agressão ao enxerto parece ter sido atingido.

Nós também analisamos a expressão protéica de Foxp3 em células CD4⁺CD25⁺. A expressão de Foxp3 foi analisada tanto em células T CD4⁺CD25^{High} como CD4⁺CD25^{Low}, assim como somando-se as duas

populações, total de CD4⁺CD25⁺. Não encontramos, na literatura, trabalhos com a análise da expressão protéica de Foxp3 em células T CD4⁺CD25⁺ em indivíduos tolerantes operacionais. Visando uma comparação de nossos resultados com a literatura relacionada, nós começamos pela análise das células T CD4⁺CD25^{High} tanto em relação à porcentagem quanto ao número absoluto dessas células. Diferentemente do que é descrito na literatura, em que os indivíduos tolerantes operacionais possuem um maior número de células T CD4⁺CD25^{High} em relação a indivíduos com rejeição crônica (Louis *et al.*, 2006), não observamos diferenças, nem no número absoluto nem na porcentagem, entre os diferentes grupos, nesta população. Também não observamos diferenças nos números absolutos e porcentagens das células T CD4⁺CD25^{Low} e CD4⁺CD25⁺. Apesar de não termos observado diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos, o grupo RC teve uma menor porcentagem e número absoluto de células T CD4⁺CD25⁺, sendo isso também observado quando essa população foi analisada separadamente em CD25^{High} e CD25^{Low}. Realizamos, subsequentemente, a análise da expressão de Foxp3 nesses tipos celulares.

Na literatura, o aumento de Foxp3 em indivíduos tolerantes operacionais, comparativamente a indivíduos com rejeição crônica, foi descrito apenas analisando-se a expressão de mRNA de Foxp3 em células T CD4⁺ obtidas de PBMC tanto no transplante renal (Louis *et al.*, 2006) como no hepático (Pons *et al.*, 2008). Louis e colaboradores analisaram 4 indivíduos tolerantes operacionais e relataram que a expressão de Foxp3 foi semelhante àquela de indivíduos saudáveis. Contudo, indivíduos com

rejeição crônica apresentaram uma menor expressão gênica de Foxp3, comparativamente aos indivíduos tolerantes operacionais (Louis *et al.*, 2006). Nossos dados corroboram esses resultados em que os indivíduos tolerantes operacionais apresentaram uma porcentagem e número absoluto de células maiores que o grupo RC e semelhante ao grupo de doadores saudáveis e de baixa imunossupressão. Além disso, no presente trabalho, um maior número absoluto e porcentagem, estatisticamente significativa, de células T $CD25^{Low}Foxp3^{+}$ foi observada nos indivíduos tolerantes operacionais, naqueles com baixa imunossupressão e nos doadores renais saudáveis, comparativamente aos grupos RC e Est.

Devemos considerar que a expressão de Foxp3 pode ser induzida em células T humanas ativadas, como já descrito (Mantel *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). Dessa forma, apesar de sua importância na atividade reguladora, em humanos o Foxp3 não é um marcador exclusivo de células T reguladoras, diferentemente de camundongos (Ziegler, 2006; Wang *et al.*, 2007). Assim, os pacientes que possuem uma maior quantidade de células T ativadas circulantes, poderiam, em tese, apresentar um aumento transitório na expressão de Foxp3, por ativação de populações linfocitárias.

As células T $CD4^{+}CD25^{High}Foxp3^{+}$ são consideradas como células potencialmente reguladoras. Lembramos que, em nosso trabalho, o fator de transcrição Foxp3 também foi encontrado em parte das células T $CD4^{+}CD25^{Low}$. Porém foi diferente do observado para a população de células T $CD4^{+}CD25^{High}$, em que a maior parte dessas expressou o fator de transcrição Foxp3. Outros dois fatores a serem considerados são: (i) as

células T ativadas podem expressar Foxp3 transitoriamente, mecanismo sugerido como tendo importância no processo de regulação negativa após ativação da célula T (Mantel *et al.*, 2006; Tran *et al.*, 2007; Ziegler, 2007); (ii) há relatos na literatura de que células T reguladoras adaptativas $CD4^+CD25^{Low}Foxp3^+$, provenientes de indivíduos tolerantes transplantados renais, transferidas em conjunto com APC, linfócitos T $CD4^+$ e alopeptídeos, para a pata de um animal SCID, em um ensaio *transvivo* de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH), suprimiram a DTH (Xu *et al.*, 2007). Devido a esses relatos e a observação de que Foxp3 é expresso em células $CD25^{Low}$ realizamos também uma análise das células T $CD4^+CD25^{Low}Foxp3^+$. Nós observamos uma maior diferença entre os diferentes grupos na população de células T $CD4^+CD25^{Low}Foxp3^+$. Os indivíduos com rejeição crônica e os indivíduos com função estável do enxerto e imunossupressão convencional apresentaram uma menor porcentagem e número dessas células em comparação aos outros grupos de estudo. Sugerimos que essa população deva ter um papel no processo de não agressão ao enxerto e também que, como nessa população maiores diferenças terem sido observadas, essas células possam ser mais sensíveis aos efeitos deletérios da imunossupressão.

O grupo dos indivíduos com rejeição crônica apresentou o menor percentual e número absoluto de células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. Isso também foi observado quando dividimos essa população em $CD25^{Low}$ e $CD25^{High}$. Não sabemos se essa menor quantidade de células potencialmente imunorreguladoras em indivíduos com rejeição crônica pode ser devido a um

recrutamento dessas células da periferia para o enxerto - foco do processo inflamatório - como parte dos mecanismos de regulação do processo de inflamatório no enxerto. Aumentos na expressão de Foxp3 no enxerto em processos de rejeição já foram descritos na literatura. Em processos de rejeição aguda, em indivíduos transplantados renais, foi observado um aumento tanto de células T CD4⁺ como da expressão de Foxp3 no aloenxerto (Veronese *et al.*, 2007). Um aumento de Foxp3 também foi observado na urina de pacientes com rejeição aguda e crônica (Muthukumar *et al.*, 2005). É possível que a diminuição observada nos indivíduos com rejeição crônica possa ser devido a um recrutamento de células T reguladoras ao foco inflamatório, provocando uma diminuição dessa população celular no sangue. Em contrapartida a essa hipótese interpretamos, em nosso estudo, que a diminuição dessa população pode estar relacionada com o uso de imunossupressão, já que o grupo de indivíduos com função estável do enxerto e imunossupressão convencional também apresentou uma diminuição dessa população linfocitária no sangue e, aparentemente, esse grupo não possui foco inflamatório no rim transplantado.

Quando olhamos em conjunto a expressão, *ex vivo*, dos genes de TGF- β , do receptor de TGF- β , de GATA-3 e proteína de Foxp3, observamos que essas moléculas, participantes de importantes etapas de imunorregulação, estão mais expressas no grupo de indivíduos tolerantes operacionais comparativamente aos outros grupos de estudo. Pode-se concluir que esses indivíduos possuem um estado imunológico com

predomínio de expressão de moléculas mais relacionadas com imunorregulação. No entanto, não podemos afirmar se esses fatores são, de fato, responsáveis pelo processo de tolerância, *in vivo*.

A história das experiências imunológicas do indivíduo pode ter importância no desfecho do transplante. Ademais, uma maior memória de linfócitos efetores resulta em uma maior barreira à tolerância ao enxerto (Adams *et al.*, 2003). Como os pacientes desse estudo possuem experiências imunes distintas, alguns com múltiplas transfusões e painéis de reatividade variados, esses fatores poderiam ser importantes no entendimento de como o indivíduo desenvolve uma resposta ao aloenxerto. Apesar das diferenças clínicas, não encontramos uma relação entre uma possível maior reatividade e um perfil mais inflamatório, por exemplo. Clinicamente, como já descrito, apenas os fatores como a função retardada do enxerto, rejeição aguda e terapia de indução parecem ter uma associação com a evolução para rejeição crônica ou função estável do enxerto.

Outro ponto analisado nesse projeto foi a ativação de determinadas vias de sinalização. Dentre as vias de sinalização escolhidas para estudo, nesse projeto, a ativação das vias de sinalização intracelular IL-6/STAT3 e IL-4/STAT6 foram testadas nos diferentes grupos de estudo. Apesar do pequeno número de indivíduos analisados, foi possível observar que os indivíduos tolerantes operacionais possuem um perfil diferenciado dos outros grupos quando analisamos essas vias de sinalização, tanto em linfócitos como na região de monócitos, na análise por FACS.

A via IL-6/STAT3 foi estudada em 38 indivíduos, sendo 4 pertencentes ao grupo dos tolerantes operacionais, 10 pertencentes ao grupo dos indivíduos com rejeição crônica, 11 pertencentes ao grupo dos indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto e imunossupressão convencional, 5 pertencentes ao grupo dos indivíduos com baixa imunossupressão e 8 pertencentes ao grupo dos doadores renais saudáveis. Na análise dessa via de sinalização, não foi observada diferença estatística na região de linfócitos nos diferentes grupos de estudo. Na região de monócitos observamos uma diferença estatística entre o grupo Est e o Sau (doadores renais saudáveis). O grupo Sau apresentou a menor capacidade de ativar essa via de sinalização. Vale destacar que apesar de não termos usado um marcador para monócitos, como CD14, por incompatibilidade com a técnica PhosFlow, as regiões de monócitos tiveram sempre uma porcentagem de células T CD3⁺ inferiores a 1%, em todos os indivíduos analisados.

Os indivíduos tolerantes operacionais mostraram uma capacidade reduzida de ativar essa via de sinalização, frente ao estímulo com IL-6, na região de monócitos, embora não estatisticamente significativa. É importante ressaltar que na região de monócitos, o grupo TO teve um padrão de fosforilação semelhante ao grupo Sau. A fosforilação de STATs é um indicativo de que esses fatores de transcrição participarão na ativação de múltiplos promotores, uma vez que, quando fosforiladas em suas tirosinas, formam dímeros e translocam para o núcleo, governando a transcrição de diversos genes (Turkson *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000). É descrito que a

ativação de STAT3 em células dendríticas tem um importante papel tolerogênico por manter seu estado de imaturidade, já que pode ser fosforilada em resposta a IL-10 em DC, e que a ausência de sinalização por STAT3 pode causar um aumento na síntese de citocinas pró-inflamatórias (Park *et al.*, 2004). Esse achado nos leva a interpretar que os indivíduos tolerantes operacionais possam estar mais susceptíveis a desencadear respostas pró-inflamatórias devido a uma menor capacidade de fosforilar STAT3 na região de monócitos. Embora monócitos sejam diferentes de células dendríticas, essas células podem se diferenciar nessa população celular (DC). Assim, a menor capacidade de fosforilar STAT3, observada nessa população, poderia ser semelhante ao que seria observado em células dendríticas diferenciadas. Outro fator que corrobora esta nossa interpretação é o fato da IL-10 sinalizar e limitar a resposta de linfócitos e macrófagos via ativação de STAT3 (Finbloom *et al.*, 1995; Crepaldi *et al.*, 2001; Niemand *et al.*, 2003). Ademais, a sinalização via STAT3 também aumenta a expressão de genes relacionados com imunorregulação (TGF- β e IL-10) como também genes pró-inflamatórios (TNF, IFN- γ e IL-12) (Stepkowski *et al.*, 2008) indicando que STAT3 pode participar tanto de respostas inflamatórias como imunorreguladoras.

Nesse sentido, lembramos que tanto a IL-6 e a IL-10 podem levar à ativação de STAT3. Porém, a IL-10 é uma citocina predominantemente imunorreguladora e a IL-6 pró-inflamatória. Assim, as respostas finais da ativação dessa via de sinalização, para um desfecho imunorregulador ou inflamatório, têm sido atribuída, em grande parte, à regulação mediada por

SOCS3 (Yasukawa *et al.*, 2003). A SOCS3 inibe a fosforilação de STAT3 e pode ser induzida via TCR ou mesmo como *feedback* negativo pela própria STAT3 (Yasukawa *et al.*, 2003). Por essa razão, realizamos a análise da expressão de SOCS3, por PCR em tempo real, em PBMC nos diferentes grupos de estudo, buscando-se identificar uma possível associação entre a fosforilação de STAT3 e a expressão de SOCS3. Os nossos resultados não mostraram uma relação entre a expressão de SOCS3 e a fosforilação de STAT3 entre os diferentes grupos de estudo. É possível que SOCS3, no contexto do transplante, não tenha uma importância na regulação dessa via de sinalização. Contudo, observamos a expressão de SOCS3 em PBMC e não podemos excluir a hipótese de que essa proteína possa ser expressa e ter importância apenas em um determinado subtipo leucocitário, de forma semelhante ao que observamos para STAT3 na região de monócitos.

Ademais, a ativação de STAT3 em linfócitos T está relacionada a uma inibição no desenvolvimento de células T reguladoras (Huber *et al.*, 2008). Devido à ação de STAT3 na geração de células T reguladoras, uma hipótese é que SOCS3 poderia, devido a sua capacidade de inibir a fosforilação de STAT3, auxiliar na geração de células T reguladoras. Apesar dessa hipótese, SOCS3 também é descrito como um regulador negativo da fosforilação e ativação de SMAD3 e animais deficientes em SOCS3 apresentam uma expansão na população de células T reguladoras dependentemente de TGF- β (Matsumura *et al.*, 2007). Apesar desses dados, não observamos diferenças, na população de linfócitos, referentes à fosforilação de STAT3, expressão de Foxp3 e, também, na expressão de

SOCS3 em PBMC nos diferentes grupos de estudo. É possível que essa via de sinalização não tenha uma participação dominante no que diz respeito à evolução e desfecho do órgão transplantado ou neste momento do processo que analisamos.

Deve-se ressaltar que, apesar da associação entre a sinalização via STAT3 e a sinalização via SMAD3, ativada por TGF- β , e a característica dessas vias serem reguladas por SOCS3, não foi observada uma associação entre a fosforilação de STAT3 e a expressão de SOCS3 e de TGF- β . Observamos uma maior porcentagem de fosforilação, na região de monócitos, de STAT3 no grupo Est em comparação ao grupo Sau. Outro fator a ser descrito é que o grupo Sau e o TO apresentaram uma menor capacidade de fosforilar STAT3 na população de monócitos quando comparados aos outros grupos de estudo. Diante desse resultado, vale a pena trazer para a discussão que a via de sinalização de STAT3, além de estimular a produção de TGF- β pode, em sinergismo com esse fator de crescimento, induzir a produção de VEGF (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*) podendo estimular angiogênese, fator presente em processos de reparo tecidual (Chen *et al.*, 2008). Assim, apesar da redução da fosforilação de STAT3 nos indivíduos tolerantes operacionais, a expressão de TGF- β manteve-se alta, indicando que essa produção parece ocorrer por um mecanismo independente de STAT3 e não relacionada com reparo tecidual.

Outra via analisada nos diferentes grupos de estudo foi a IL-4/STAT6. Nessa via, observamos uma grande quantidade de STAT6 fosforilada, após o estímulo, em todos os grupos estudados. Isso está de acordo com os dados na literatura em que, apesar dessa via polarizar para uma resposta Th2, praticamente todos os linfócitos, tanto de memória como *naive* expressam STAT6 (Lund *et al.*, 2003).

O estudo dessa via é importante para se avaliar como os pacientes respondem a um estímulo polarizador para uma resposta Th2, uma vez que os indivíduos tolerantes operacionais tiveram uma maior expressão de GATA-3 em comparação a todos os outros grupos de estudo, e auxiliar na interpretação dos dados obtidos na PCR em tempo real. Além disso, apesar de contraditórios, há dados na literatura nos quais é apontado um envolvimento dessa via de sinalização na expressão de Foxp3 e na ontogenia de células T reguladoras (Sanchez-Guajardo *et al.*, 2007). Foi observado que a ausência de STAT6 em camundongos impede a geração de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e que camundongos transgênicos expressando uma forma ativa constitutiva de STAT6 têm um aumento de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, quando comparados com camundongos selvagens (Sanchez-Guajardo *et al.*, 2007). Em outro trabalho é mostrado que a expressão de Foxp3 mediada por TGF- β é inibida na presença IL-4 pela ligação de STAT6 a um silenciador presente em um *enhancer* do gene de Foxp3 (Takaki *et al.*, 2008). Além disso, estudos nos quais é analisada a relação entre células Th1 e Th2 com a expressão de Foxp3, foi descrito que ambos os tipos celulares inibem a expressão de Foxp3 e diferenciação de

células T reguladoras, indicando que as vias de sinalização e fatores de transcrição presentes nas células Th1 e Th2 parecem ter um efeito antagônico na expressão de Foxp3(Wei *et al.*, 2007).

Em nosso trabalho, a via IL-4/STAT6 foi estudada em 4 indivíduos transplantados renais em estado de tolerância operacional, 8 indivíduos com rejeição crônica, 12 indivíduos com função estável do enxerto e imunossupressão convencional, 10 doadores saudáveis e 5 indivíduos transplantados renais com baixa imunossupressão. Dessa forma, esperávamos observar diferenças na fosforilação de STAT6, nos diferentes grupos de estudo, nas populações de linfócitos CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD4⁻ e CD3⁻. Observamos diferenças estatísticas nas populações de linfócitos T tanto CD4⁺ como CD4⁻. Na população de células T CD3⁺CD4⁺, o grupo BI teve uma maior capacidade de fosforilar STAT6, estatisticamente significativa, quando comparado aos grupos Est, RC e Sau. Apesar de não apresentar diferença estatística, esse grupo também apresentou uma maior fosforilação de STAT6 em comparação ao grupo TO. Apesar de o grupo BI não ter apresentado uma elevada expressão de GATA-3, pode ser que essa maior capacidade de fosforilar STAT6 em comparação aos outros grupos possa oferecer uma vantagem, por inibir a diferenciação de células Th1.

Na região de monócitos, os indivíduos tolerantes operacionais tiveram uma menor capacidade de fosforilar STAT6 quando comparados com todos os outros grupos de estudo.

O fator de transcrição STAT6 interage com NF κ B, e a estimulação com IL-4 antagoniza a indução de genes por TNF- α (Bennett *et al.*, 1997). Essa pode ser uma possível explicação para a elevada produção de TNF observada no grupo TO em comparação aos outros grupos de estudo. STAT6 regula a expressão de diversos genes envolvidos nas respostas imunes, como MHC-II, moléculas de adesão, pró-colágeno, CD11b e CD86 em macrófagos e monócitos (Boothby *et al.*, 1988; Bennett *et al.*, 1997; Mchugh *et al.*, 2001; Buttner *et al.*, 2004; Deszo *et al.*, 2004). A menor fosforilação observada no grupo dos indivíduos tolerantes operacionais pode implicar em uma menor quantidade de monócitos expressando MHC-II e produzindo de óxido nítrico, além de poder limitar a diferenciação de monócitos em células dendríticas, por ter uma menor habilidade de ativar essa via de sinalização (Sakamoto *et al.*, 1995; Takeda *et al.*, 1996; Den Dekker *et al.*, 2008). Os indivíduos tolerantes operacionais, dessa forma, poderiam ter uma menor expressão de moléculas reguladas por IL-4/STAT6, relacionadas com a apresentação antigênica, e importantes no decorrer de respostas imunes ao enxerto, acrescentando mais um possível mecanismo pelo qual a homeostase é atingida nesse grupo de indivíduos.

O estudo desses fatores de transcrição, STAT3 e 6, no contexto de transplante é muito escasso. Em modelo animal de tolerância vs. rejeição não foram observadas diferenças de fosforilação em STAT1, STAT4, STAT5 e STAT6 (Metcalf *et al.*, 2000). Contudo, esses estudos analisaram cultura de esplenócitos, não sendo realizada a análise em diferentes populações de linfócitos em que a ativação dessas vias poderia ser regulada de forma

diferenciada. Em outro estudo, em modelo animal, mostrou-se que o aumento da sobrevida do enxerto cardíaco frente ao tratamento com CTLA4-Ig era dependente da via de sinalização STAT6 .

A diferença observada no grupo TO em relação aos outros grupos de estudo indica que essa via de sinalização na região de monócitos pode desempenhar um importante papel na indução de tolerância ao enxerto. Em busca das possíveis causas dessa menor capacidade de fosforilação, iniciamos a análise da expressão do receptor de IL-4 em PBMC nos diferentes grupos de estudo. A análise da expressão do receptor de IL-4 mostrou que essa menor capacidade de fosforilar STAT6 não parece estar relacionada com uma possível menor expressão do receptor, uma vez que, , o grupo TO apresentou uma maior expressão média desse gene quando comparado aos outros grupos de estudo. No entanto, como analisamos PBMC e não uma população purificada de monócitos, não podemos descartar a possibilidade de monócitos terem uma menor expressão na cadeia α do receptor de IL-4.

Destacamos que outros mecanismos podem ser os responsáveis por essa reduzida fosforilação. A proteína SOCS1 regula essa via de sinalização, inibindo a fosforilação de STAT6 e poderia ter sua expressão aumentada nos indivíduos tolerantes operacionais (Losman, J. *et al.*, 1999; Losman, J. A. *et al.*, 1999). É importante mencionar que 3 dos 4 indivíduos tolerantes operacionais tiveram uma expressão de IFN- γ maior que os doadores saudáveis e é descrito que essa citocina pode suprimir a

fosforilação de STAT6 por inibir seu recrutamento ao receptor de IL-4 (Huang *et al.*, 2005). Apesar disto não ter sido observado em outros indivíduos que possuem uma expressão maior do que os indivíduos saudáveis não se pode excluir completamente essa possibilidade.

Em resumo, nós observamos que os diferentes grupos apresentam um padrão diferenciado na expressão tanto de citocinas e fatores de transcrição como na sinalização intracelular. As duas vias de sinalização analisadas mostram que os diferentes grupos de estudo possuem capacidades diferentes de responderem a estímulos ativadores de STAT3 (IL-6) e STAT6 (IL-4). Nós observamos também que os indivíduos tolerantes operacionais expressam mais transcritos de TGF- β , TGF- β R e GATA-3, assim como a proteína Foxp3 em células CD4⁺CD25⁺, quando comparados aos outros grupos do nosso estudo. Os indivíduos com rejeição crônica tiveram uma menor expressão protéica de Foxp3 em células CD4⁺CD25⁺, sendo que essa expressão foi próxima da expressão no grupo Est. Quando analisamos esses dados em conjunto podemos sugerir que as células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ parecem desempenhar um importante papel na manutenção do estado de não agressão do enxerto.

Os meios pelos quais a tolerância é atingida em modelos animais são bem descritos e estabelecidos e uma variedade de mecanismos estão envolvidos. Mesmo em modelos animais, em que a diversidade genética é menor pelo uso de linhagens isogênicas, existe uma variedade de meios de indução de tolerância com diferentes desfechos. Quando se tenta aplicar os conhecimentos gerados em modelos animais em humanos, essa tradução

de conhecimento ainda não é bem sucedida. Um dos fatores que dificultam essa tradução é a grande diversidade genética observada em humanos. É bem possível que os caminhos pelos quais a tolerância é atingida variem muito de pessoa para pessoa.

Existem múltiplos caminhos e desfechos clínicos no transplante. Alguns indivíduos rejeitam o enxerto de imediato, outros levam anos, outros, após desenvolver episódios de rejeição acabam atingindo uma função estável com o auxílio de imunossupressão e outros têm uma evolução muito boa do órgão mesmo quando, por conta própria, deixam de usar imunossupressores. Este é um grupo bem raro que alcança o processo de tolerância após a suspensão do uso de qualquer imunossupressão. Isso mostra que o desfecho do órgão transplantado pode variar muito de pessoa para pessoa e que existe diferentes caminhos pelos quais uma pessoa alcança a homeostase no contexto do transplante. Assim, buscamos, neste trabalho, fazer uma análise mais global para que, com um maior número de parâmetros, possamos entender um pouco mais sobre como o processo de tolerância a um aloenxerto ocorre em humanos.

Nós observamos que, com uma análise de múltiplos genes, tanto predominantemente reguladores como predominantemente inflamatórios, os indivíduos tolerantes operacionais possuem um predomínio de modificações imunorreguladoras. Isso pode contribuir no estabelecimento de um microambiente mais propício ao desenvolvimento de tolerância, conforme ocorreu nesses indivíduos. Esse perfil parece possuir uma estabilidade, uma vez que quando analisado em dois pontos distintos, foi mantido um perfil

predominantemente imunorregulador. As vias de sinalização analisadas mostram que os indivíduos tolerantes operacionais possuem capacidades distintas de responder, a estímulos externos, em comparação aos outros grupos de estudo. É provável que essas vias, principalmente a via IL-4/STAT6 em monócitos, participem diretamente do estado de tolerância observado nos indivíduos tolerantes operacionais. Não sabemos quais as respostas biológicas frente a esse perfil molecular diferenciado observado em relação as vias de sinalização. Os próximos passos de investigação devem incluir a análise do desfecho imunológico dessas vias de sinalização, diferencialmente ativadas, nos indivíduos tolerantes operacionais. Outro papel a ser avaliado é a contribuição de GATA3 e, conseqüentemente, das células Th2 no estabelecimento de um estado imunorregulador observado nos indivíduos tolerantes operacionais.

Acreditamos que a principal mensagem, após o estudo de indivíduos transplantados renais em estado de tolerância operacional, nessa dissertação de mestrado, seja que, apesar de existirem múltiplos caminhos para o estabelecimento de tolerância no contexto do transplante humano, o estudo de múltiplas vias de sinalização em conjunto com expressão gênica é necessário para se entender como esses indivíduos respondem de forma dinâmica a diferentes estímulos o que pode auxiliar na compreensão dos mecanismos pelos quais a tolerância imunológica no transplante humano pode ser atingida.

6. CONCLUSÕES

1. O painel de moléculas REGULA/INFLAMA analisado nos permitiu determinar um perfil imunológico molecular diferencial, com características predominantemente imunorreguladoras para o grupo de indivíduos tolerantes operacionais. Com base em nossos dados, sugerimos que essas moléculas sejam relevantes e, talvez, dominantes neste estado de homeostase no contexto do transplante renal humano.
2. A discriminação de um perfil imunológico molecular diferencial nos indivíduos em tolerância operacional, nas células mononucleares do sangue, nos permite dizer que este estado de homeostase no transplante renal tem repercussão sistêmica, não sendo confinado apenas no microambiente do enxerto.
3. O perfil diferencial de fosforilação das vias de sinalização IL-4/STAT6 e IL-6/STAT3, em linfócitos e monócitos, nos indivíduos com tolerância operacional e nos diferentes grupos, nos permite interpretar que essas vias sejam mobilizadas distintamente em subtipos celulares na tolerância operacional, podendo desempenhar um papel tanto na função efetora e diferenciação de linfócitos e monócitos.

4. A significativa redução do número de células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ nos indivíduos com rejeição crônica (RC) e naqueles com função estável do enxerto e imunossupressão convencional (Est) nos permite interpretar que esse tipo de população é diretamente afetada pelo uso de diferentes drogas imunossupressoras.
5. O significativo maior número de células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ nos indivíduos tolerantes operacionais e naquelas com baixa imunossupressão nos permite sugerir que essas células possam ter atividades reguladoras e desempenhar um papel importante no estabelecimento de um estado de não agressão ao órgão transplantado.
6. O fator de transcrição GATA-3, específico de linfócitos do tipo Th2, parece desempenhar um papel importante na indução/manutenção do estado de tolerância operacional. Isso nos permite sugerir que um desvio que favoreça uma polarização do tipo Th2 possa ter uma importância na manutenção de um estado com características imunorreguladoras nos indivíduos tolerantes operacionais.

ANEXOS

Anexo A: Dados clínicos individuais.

Anexo B: Curvas de dissociações.

ANEXO A

Dados clínicos individuais

Tabela 13 – Dados demográficos clínicos dos Receptores do transplante renal.

	Idade	sexo	Doença de base	Tipo de diálise	Tempo de diálise (meses)	Tempo de Transplante (anos)	Número de Tx	Número de transfusões	Número de gestações
RC1	45	M	Glomerulonefrite crônica	Hemodiálise	ND	9	1	0	3
RC2	48	F	Glomerulonefrite crônica	ND	ND	10	1	0	NA
RC4	46	M	Glomerulonefrite crônica	ND	ND	4	1	8	NA
RC5	35	M	Glomerulonefrite crônica	Hemodiálise	60	7	1	0	NA
RC6	65	M	Insuficiência renal sem causa definida	ND	ND	9	1	20	NA
RC7	59	M	Insuficiência renal sem causa definida	Hemodiálise	52	7	1	0	NA
RC13	28	F	Glomerulonefrite crônica	Hemodiálise	12	10	1	1	0
RC24	21	M	Insuficiência renal sem causa definida	Hemodiálise	10	6	1	2	NA
RC25	51	M	Glomerulonefrite crônica	Hemodiálise	55	13	1	2	NA
RC26	55	M	Nefroesclerose hipertensiva	Hemodiálise + CAPD	46	4	1	0	NA
RC32	28	M	Nefropatia de refluxo	Hemodiálise	48	12	1	0	NA

Tx, Transplante; TO: Tolerância operacional; BI: Baixa Imunossupressão; Est: Função estável do enxerto e imunossupressão convencional; RC: Rejeição crônica; M: Masculino; F: Feminino; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; MMF: Micofenolato mofetil ; MPS Micofenolato sódico; ; Rapa: Rapamicina; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona. As drogas imunossupressoras estão representadas por mg/Kg. NA: não se aplica; ND: não disponível; NC: não consta. CAPD: Diálise peritoneal ambulatorial contínua.

Tabela 13 (Continuação) – Dados demográficos clínicos dos Receptores do transplante renal.

	Data de nascimento/Idade	sexo	Doença de base	Tipo de diálise	Tempo de diálise (meses)	Transplante (anos)	Número de Tx	Número de transfusões	Número de gestações
TO3	54	M	Glomerulonefrite membrano proliferativo	ND	ND	23	1	ND	NA
TO8	42	M	Glomerulonefrite crônica	Hemodiálise	24	5	2	2	NA
TO10	43	F	Nefropatia Diabética	ND	ND	7	1	0	2
T16	49	F	Glomerulonefrite crônica	Diálise Peritoneal	54	23	1	>50	0
BI21	62	M	Pielonefrite	ND	ND	20	1	0	NA
B27	47	F	Glomerulonefrite crônica	Hemodiálise	60	22	1	>5	0
BI29	79	M	Nefropatia isquêmica	Hemodiálise	6	2	1	1	0
BI30	56	F	Insuficiência renal sem causa definida	Hemodiálise	64	11	1	10	3
BI34	64	F	Glomerulonefrite crônica	Hemodiálise	11	22	1	2	3

Tx, Transplante; TO: Tolerância operacional; BI: Baixa Imunossupressão; Est: Função estável do enxerto e imunossupressão convencional; RC: Rejeição crônica; M: Masculino; F: Feminino; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; MMF: Micofenolato mofetil ; MPS Micofenolato sódico; ; Rapa: Rapamicina; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona. As drogas imunossupressoras estão representadas por mg/Kg. NA: não se aplica; ND: não disponível; NC: não consta. CAPD: Diálise peritoneal ambulatorial contínua.

Tabela 14 – Dados demográficos e clínicos do doador/enxerto.

	Tipo do Doador	Idade do Doador	Sexo do Doador	Tempo de Isquemia (horas)	Disparidades HLA	Função retardada do enxerto
RC1	VIVO NR	31	F	ND	4	Não
RC2	CADAVERICO	31	F	ND	5	Sim
RC4	CADAVERICO	47	F	0	6	Sim
RC5	CADAVERICO	20	M	26	6	Sim
RC6	VIVO FILHA	33	F	0,5	3	Não
RC7	CADAVERICO	49	F	14	6	Sim
RC13	VIVO PAI	54	M	0,4	2	Sim
RC24	CADAVERICO	10	M	11	5	Não
RC25	CADAVERICO	62	M	24	6	Sim
RC26	VIVO NR	31	M	3	5	Não
RC32	CADAVERICO	11	F	11	4	Sim
Est9	CADAVERICO	20	M	22	3	ND
Est211	VIVO IRMÃO	45	M	1	6	Sim
Est12	VIVO NR	30	F	0,75	6	Não
Est14	VIVO IRMÃ	26	F	0,8	3	Não
Est19	VIVO IRMÃO	26	M	1	3	Não

Tx, Transplante; TO: Tolerância operacional; BI: Baixa Imunossupressão; Est: Função estável do enxerto e imunossupressão convencional; RC: Rejeição crônica; M: Masculino; F: Feminino; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; MMF: Micofenolato mofetil ; MPS Micofenolato sódico; ; Rapa: Rapamicina; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona. As drogas imunossupressoras estão representadas por mg/Kg. NA: não se aplica; ND: não disponível; NC: não consta. CAPD: Diálise peritoneal ambulatorial contínua.

Tabela 14 (Continuação) – Dados demográficos e clínicos do doador/enxerto.

	Tipo do Doador	Idade do Doador	Sexo do Doador	Tempo de Isquemia (horas)	Disparidades HLA	Função retardada do enxerto
Est20	VIVO PRIMA	32	F	0,69	5	Não
Est22	VIVO IRMÃ	26	F	0,8	3	Não
Est23	VIVO IRMÃO	30	M	1,2	3	Não
Est28	VIVO IRMÃO	58	M	0,44	3	Não
Est31	VIVO IRMÃ	48	F	0,55	3	Não
Est17	CADAVERICO	37	M	1	3	Sim
Est33	VIVO NR	38	M	0,5	5	Não
TO3	VIVO NR	ND	ND	ND	3	Não
TO8	CADAVERICO	63	M	16	4	Sim
TO10	VIVO IRMÃ	36	F	1	0	Não
T16	VIVO IRMÃ	41	F	0	0	Não
BI21	VIVO IRMÃ	59	F	0	3	Não
B27	VIVO IRMÃ	37	F	1	3	Não
BI29	VIVO NR	38	M	1	4	Não
BI30	CADAVERICO	19	M	11	5	Não

Tx, Transplante; TO: Tolerância operacional; BI: Baixa Imunossupressão; Est: Função estável do enxerto e imunossupressão convencional; RC: Rejeição crônica; M: Masculino; F: Feminino; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; MMF: Micofenolato mofetil ; MPS Micofenolato sódico; ; Rapa: Rapamicina; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona. As drogas imunossupressoras estão representadas por mg/Kg. NA: não se aplica; ND: não disponível; NC: não consta. CAPD: Diálise peritoneal ambulatorial contínua.

Tabela 15 – Dados da evolução clínica dos indivíduos transplantados renais.

	Episódio de Rejeição Aguda	Comorbidades	Rejeição Crônica	Data Última Biópsia	Histologia
RC1	Não	Mioma, HPV, anemia, hiertensão arterial, cisto no ovário	Sim	12.03.06	Nefropatia crônica do enxerto, banff 2A
RC2	Sim	Hipertensão arterial, hérnia incisional	Sim 07/07 - Perda do enxerto	03.07.07	07.2007 - Perda do enxerto
RC4	Sim	ND	Sim	19.12.05	Nefropatia crônica do enxerto Banff II, fibrose focal
RC5	Não	Hepatite C, Herpes simples, candidíase, amidalite	Sim	26.09.04	Nefropatia crônica do enxerto, grau I de Banff, arterioloesclerose hialia, C4D+
RC6	Sim	ND	Sim	22.05.06	Nefropatia crônica do enxerto Banff I, Fibrose focal
RC7	Sim	Pneumonia - 20/05/05, 16/06/05, infecção trato urinário	Sim	24.04.06	Biópsia marginal pela classificação de Banff, Rejeição crônica vascular
RC13	Sim	Citomegalia, condiloma acuminado, pneumonia, herpes simples	Sim	09.11.06	Nefropatia crônica com glomerulopatia do transplante, C4d positivo
RC24	Sim	Amidalite	Sim	06.03.06	Nefropatia crônica do enxerto Banff I.

Tx, Transplante; TO: Tolerância operacional; BI: Baixa Imunossupressão; Est: Função estável do enxerto e imunossupressão convencional; RC: Rejeição crônica; M: Masculino; F: Feminino; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; MMF: Micofenolato mofetil; MPS Micofenolato sódico; Rapa: Rapamicina; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona. As drogas imunossupressoras estão representadas por mg/Kg. NA: não se aplica; ND: não disponível; NC: não consta. CAPD: Diálise peritoneal ambulatorial contínua.

Tabela 15 (Continuação) – Dados da evolução clínica dos indivíduos transplantados renais.

	Episódio de Rejeição Aguda	Comorbidades	Rejeição Crônica	Data Última Biópsia	Histologia
RC25	Sim	Pneumonia lobar, Herpes Zoster	Sim	05.03.07	Arteriolaesclerose hialina extensa, atrofia e fibrose focais
RC26	Não	Apendicite com choque séptico, Herpes Zoster cutâneo	Sim	05.07.06	Nefropatia crônica com C4d positivo, atrofia e fibrose focais com capilarite de cailares peritubulares
RC32	Sim	Septicemia (infecção urinária), hepatite C, tuberculose	Sim	19.09.02	Nefropatia crônica do enxerto, banff 2A, nefrotoxicidade por ciclosporina

Tx, Transplante; TO: Tolerância operacional; BI: Baixa Imunossupressão; Est: Função estável do enxerto e imunossupressão convencional; RC: Rejeição crônica; M: Masculino; F: Feminino; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; MMF: Micofenolato mofetil ; MPS Micofenolato sódico; ; Rapa: Rapamicina; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona. As drogas imunossupressoras estão representadas por mg/Kg. NA: não se aplica; ND: não disponível; NC: não consta. CAPD: Diálise peritoneal ambulatorial contínua.

Tabela 15 – Dados da evolução clínica dos indivíduos transplantados renais.

Episódio de Rejeição Aguda		Comorbidades	Rejeição Crônica
Est9	Não	NC	Não
Est11	Sim	Infecção do trato urinário, micose superficial,	Não
Est12	Não	Candidíase esofágica, infecção das vias aéreas superiores, CMV	Não
Est14	Não	NC	Não
Est19	Sim	Herpes, traqueibronquite, infecção trato urinário, sinusite,	Não
Est20	Não	NC	Não
Est22	Não	NC	Não
Est23	Sim, perda do primeiro enxerto	NC	Não
Est28	Não	Celulite	Não
Est31	Sim	Candidíase , adenocarcinoma de próstata	Não
Est17	Não	CMV, Infecção das vias aéreas, herpes Zoster, infecção trato urinário	Não
Est33	Não	NC	Não

Tx, Transplante; TO: Tolerância operacional; BI: Baixa Imunossupressão; Est: Função estável do enxerto e imunossupressão convencional; RC: Rejeição crônica; M: Masculino; F: Feminino; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; MMF: Micofenolato mofetil ; MPS Micofenolato sódico; ; Rapa: Rapamicina; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona. As drogas imunossupressoras estão representadas por mg/Kg. NA: não se aplica; ND: não disponível; NC: não consta. CAPD: Diálise peritoneal ambulatorial contínua.

Tabela 15 (Continuação) – Dados da evolução clínica dos indivíduos transplantados renais.

	Episódio de Rejeição Aguda (S/N)	Comorbidades	Rejeição Crônica (S/N)
TO3	Não	Hipertensão arterial, obesidade	Não
TO8	Sim	Hepatite B e C	Não
TO1 0	Não	Múltiplos abscessos perianal, infarto agudo miocárdio com angioplastia, abscesso de mama	Não
T16	Não	NC	Não
BI21	Não	Carcinoma basocelular, prostatite crônica, infecção do trato urinário de repetição, carcinoma espino celular	Não
B27	Sim	NC	Não
BI29	Não	tumor renal, carcinoma de células claras, insuficiência coronariana (pré tx), herpes zoster	Não
BI30	Sim	Hepatite B e C pós transplante, uveíte por toxoplasmose	Não
BI34	Não	NC	

Tx, Transplante; TO: Tolerância operacional; BI: Baixa Imunossupressão; Est: Função estável do enxerto e imunossupressão convencional; RC: Rejeição crônica; M: Masculino; F: Feminino; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; MMF: Micofenolato mofetil ; MPS Micofenolato sódico; ; Rapa: Rapamicina; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona. As drogas imunossupressoras estão representadas por mg/Kg. NA: não se aplica; ND: não disponível; NC: não consta. CAPD: Diálise peritoneal ambulatorial contínua.

Tabela 16 – Uso de Drogas imunossupressoras

	Inicial	Terapia de Indução	Indução/Fármaco	Imunossupressão atual (mg/Kg)
RC1	ND	ND	ND	Aza (ND); Cya (ND); Pred (ND)
RC2	Cya, Aza, Pred	ND	ND	Rapa (ND); Pred (ND)
RC4	ND	ND	ND	Pred (0,1); MMF (19,72); FK (0,04)
RC5	Ciclo, MMF, Pred	Sim	ATG	Cya (1,43); Pred (0,07); MPS (15,45)
RC6	ND	ND	ND	Cya (1,56); Pred (0,12); MMF (23,44)
RC7	Aza, Pred e Cya	Sim	Basilixmab	Pred (0,09); FK (0,05); MPS (25,26)
RC13	Cya, Pred e Aza	Não	NA	Pred (0,08); FK (0,13); Myfortic (11,84)
RC24	Pred, Tacro, MMF	Sim	Daclizumab	MPS (17,65); Tacro (0,07); Pred (0,09)
RC25	Ciclo, Aza, Pred	Não	NA	Pred (0,07); Rapa (0,01); Myfortic (10,5)
RC26	Cya, Pred e MMF	Sim	Daclizumab	Cya (1,99); Pred (0,07); Myfortic (14,3)
RC32	Ciclo, Aza, Pred	Não	NA	MPS (24,83), pred (0,13)

Tx, Transplante; TO: Tolerância operacional; BI: Baixa Imunossupressão; Est: Função estável do enxerto e imunossupressão convencional; RC: Rejeição crônica; M: Masculino; F: Feminino; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; MMF: Micofenolato mofetil ; MPS Micofenolato sódico; ; Rapa: Rapamicina; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona. As drogas imunossupressoras estão representadas por mg/Kg. NA: não se aplica; ND: não disponível; NC: não consta. CAPD: Diálise peritoneal ambulatorial contínua.

Tabela 16 (Continuação) – Uso de Drogas imunossupressoras

	Inicial	Terapia de Indução	Indução/Fármaco	Imunossupressão atual (mg/Kg)
Est9	Pred, MMF, Tacro	Sim	Basilixmab	Pred (0,08); MMF (32,68); FK (0,03)
Est11	Pred, MMF, Tacro	Sim	Daclizumab	Pred (0,11); MPS (15,25); Tacro (0,13)
Est12	Pred, Tacro e MPS	Sim	Daclizumab	Pred (0,07); Tacro (0,08); MPS (14,5)
Est14	Pred, tacro, MMF	Sim	Basilixmab	Pred (0,07); FK (0,05); Myfortic (14,34)
Est19	Pred, Tacro, MPS	Sim	Daclizumab	Pred (0,09); FK (0,07); Myfortic (18,91)
Est20	Pred, MMF, Tacro	Sim	Basilixmab	MMF (17,13); Tacro (0,07); Pred (0,09)
Est22	Pred, Tacro e MMF	Sim	Basilixmab	Pred (0,07), Tacro (0,06), MPS (21,6)
Est23	Pred, tacro, MPS	Sim	ATG e imunoglobulina (IVIG)	Pred (0,11); Aza (2,17); Tacro (0,09)
Est28	Pred,Aza	Não	NA	Aza (1,57); Pred (0,11)
Est31	Pred, MMF, tacro	Sim	Daclizumab	MPS (19,92), tacro (0,04), Pred (0,07)
Est17	Pred, Tacro, MMf	Sim	Basilixmab	Pred (0,07); FK (0,04); Myfortic (14,59)
Est33	Pred, tacro, MPS	Sim	Daclizumab	Tacro (0,06); pred (0,08); MMF (32,71)

Tx, Transplante; TO: Tolerância operacional; BI: Baixa Imunossupressão; Est: Função estável do enxerto e imunossupressão convencional; RC: Rejeição crônica; M: Masculino; F: Feminino; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; MMF: Micofenolato mofetil ; MPS Micofenolato sódico; ; Rapa: Rapamicina; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona. As drogas imunossupressoras estão representadas por mg/Kg. NA: não se aplica; ND: não disponível; NC: não consta. CAPD: Diálise peritoneal ambulatorial contínua.

Tabela 16 (Continuação) – Uso de Drogas imunossupressoras

	Inicial	Terapia de Indução	Indução/Fármaco	Imunossupressão atual (mg/Kg)
TO3	ND	ND	ND	Sem IS desde 2002
TO8	Pred, Tacro, MMF	Sim	Basilixmab	Sem IS desde 22/7/2006
TO10	Cya, Aza e Pred	Não	NA	Sem imunossupressão desde maio 2003
T16	Aza e Pred	Não	NA	Sem imunossupressão desde mar 2000
BI21	ND	ND	ND	Pred (0,05); Aza (1,05)
B27	Aza e Pred	Não	NA	Aza (1,98); Pred (0,07)
BI29	Pred, tacro, MPS	Sim	Basilixmab	Tacro (0,05); Pred (0,06)
BI30	Ciclo, aza, pred	Não	NA	Pred (0,11); Ciclo (1,76)
BI34	ND	ND	BD	MMF (12); Pred (0,12)

Tx, Transplante; TO: Tolerância operacional; BI: Baixa Imunossupressão; Est: Função estável do enxerto e imunossupressão convencional; RC: Rejeição crônica; M: Masculino; F: Feminino; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; MMF: Micofenolato mofetil ; MPS Micofenolato sódico; ; Rapa: Rapamicina; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona. As drogas imunossupressoras estão representadas por mg/Kg. NA: não se aplica; ND: não disponível; NC: não consta. CAPD: Diálise peritoneal ambulatorial contínua.

Tabela 17 – Dados sobre a Evolução dos Transplantados Renais.

	Função Renal 1º ano			Função Renal 5º ano			Função Renal atual		
	Creatinin a Sérica	Clearence Creatinina	Proteinúria (g/24h)	Creatinina Sérica	Clearence Creatinina	Proteinúria (g/24h)	Creatinina Sérica	Clearence Creatinina	Proteinúria (g/24h)
RC1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	ND	ND
RC2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5,8	ND	ND
RC4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,21	46,71	<0,05
RC5	1,5	53,7	<0,05	1,66	58	0,13	1,54	67,6	<0,05
RC6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,34	50,25	ND
RC7	2,2	34,05	0,46	1,69	40,07	0,55	1,95	33,87	0,29
RC13	1,1	79,2	0,75	1,6	57,37	0,5	1,67	54,3	1,2
RC24	1	11,7	<0,05	1,81	67,8	0,17	1,81	79,1	0,25
RC25	2,9	33,18	0,34	2,8	34,36	<0,05	2,43	34,89	0,3
RC26	1,1	90,99	0,25	ND	ND	ND	1,61	54,73	1,32
RC32	1,8	50,48	0,1	1,6	56,8	0,3	1,34	62,37	1

Tx, Transplante; TO: Tolerância operacional; BI: Baixa Imunossupressão; Est: Função estável do enxerto e imunossupressão convencional; RC: Rejeição crônica; M: Masculino; F: Feminino; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; MMF: Micofenolato mofetil ; MPS Micofenolato sódico; ; Rapa: Rapamicina; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona. As drogas imunossupressoras estão representadas por mg/Kg. NA: não se aplica; ND: não disponível; NC: não consta. CAPD: Diálise peritoneal ambulatorial contínua.

Tabela 17 (Continuação) – Dados sobre a Evolução dos Transplantados Renais.

	Função Renal 1º ano			Função Renal 5º ano			Função Renal atual		
	Creatinin a Sérica	Clearence Creatinina	Proteinúria (g/24h)	Creatinina Sérica	Clearence Creatinina	Proteinúria (g/24h)	Creatinina Sérica	Clearence Creatinina	Proteinúria (g/24h)
Est9	1	85,8	<0,05	ND	ND	ND	0,9	86,9	<0,05
Est11	1,7	67,4	<0,05	ND	ND	ND	1,51	69,4	<0,05
Est12	0,89	97,63	<0,05	ND	ND	ND	1,05	83,76	<0,05
Est14	1,07	78,48	<0,05	ND	ND	ND	0,79	105,5	0,11
Est17	0,78	99,16	ND	ND	ND	ND	0,92	83,56	ND
Est19	0,7	102,6	<0,05	ND	ND	ND	0,71	105,3	0,08
Est20	1,08	91	0,09	ND	ND	ND	1,01	98,7	<0,05
Est22	0,83	102,53	<0,05	ND	ND	ND	1,04	80,95	<0,05
Est23	0,65	93,56	<0,05	ND	ND	ND	0,69	81,79	0,13
Est28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,23	90,34	<0,05
Est31	1,3	65,81	<0,05	1,37	61,82	<0,05	1,28	65,89	0,25
Est33	0,91	72,97	<0,05	ND	ND	ND	0,85	<0,05	<0,05

Tx, Transplante; TO: Tolerância operacional; BI: Baixa Imunossupressão; Est: Função estável do enxerto e imunossupressão convencional; RC: Rejeição crônica; M: Masculino; F: Feminino; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; MMF: Micofenolato mofetil ; MPS Micofenolato sódico; ; Rapa: Rapamicina; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona. As drogas imunossupressoras estão representadas por mg/Kg. NA: não se aplica; ND: não disponível; NC: não consta. CAPD: Diálise peritoneal ambulatorial contínua.

Tabela 17 (Continuação) – Dados sobre a Evolução dos Transplantados Renais.

	Função Renal 1º ano			Função Renal 5º ano			Função Renal atual		
	Creatinin a Sérica	Clearence Creatinina	Proteinúria (g/24h)	Creatinina Sérica	Clearence Creatinina	Proteinúria (g/24h)	Creatinina Sérica	Clearence Creatinina	Proteinúria (g/24h)
TO8	1,5	53,9	<0,05	ND	ND	ND	1,62	53,2	<0,05
TO10	0,9	109,57	<0,05	0,94	96,98	0,11g	0,89	102,7	<0,05
T16	0,6	93	<0,05	0,7	81	0,07	0,8	85,05	<0,05
BI21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,44	72,4	<0,05
B27	0,65	112	ND	1	69	ND	0,86	80,55	<0,05
BI29	1,19	53,65	<0,05	ND	ND	ND	1,27	49,32	<0,05
BI30	1,3	40,74	<0,05	1,5	38,03	<0,05	0,79	70,05	<0,05
BI34	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,7	ND	ND

Tx, Transplante; TO: Tolerância operacional; BI: Baixa Imunossupressão; Est: Função estável do enxerto e imunossupressão convencional; RC: Rejeição crônica; M: Masculino; F: Feminino; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; MMF: Micofenolato mofetil ; MPS Micofenolato sódico; ; Rapa: Rapamicina; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona. As drogas imunossupressoras estão representadas por mg/Kg. NA: não se aplica; ND: não disponível; NC: não consta. CAPD: Diálise peritoneal ambulatorial contínua.

ANEXO B

Curvas de Dissociação

Figura 26. Curva de dissociação. Dissociação do amplicon com um pico único, preenchendo um dos critérios de validade da PCR em tempo real (descritos em material e métodos). (A) Foxp3, (B) TGF- β , (C) TGF- β R, (D) GATA-3, (E) IL-10, (F) T-bet, (G) TNF, (H) GAPDH, (I) IL-4R α , (J) SOCS3 e (K) IFN- γ .

7. BIBLIOGRAFIA

- ABLAMUNITS, V.; HEROLD, K. C. Generation and function of human regulatory CD8⁺ T cells induced by a humanized OKT3 monoclonal antibody hOKT3gamma1 (Ala-Ala). *Hum Immunol*, v. 69, n. 11, p. 732-6, Nov 2008.
- ADAMS, A. B. *et al.* Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J Clin Invest*, v. 111, n. 12, p. 1887-95, Jun 2003.
- AGNELLO, D.; LANKFORD, C. S.; BREM, J.; MORINOBU, A.; GADINA, M.; O'SHEA, J. J.; FRUCHT, D. M. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol*, v. 23, n. 3, p. 147-61, May 2003.
- ALLISON, A. C.; EUGUI, E. M. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*, v. 47, n. 2-3, p. 85-118, May 2000.
- ALVAREZ, C. M.; PARIS, S. C.; ARANGO, L.; ARBELAEZ, M.; GARCIA, L. F. Kidney transplant patients with long-term graft survival have altered expression of molecules associated with T-cell activation. *Transplantation*, v. 78, n. 10, p. 1541-7, Nov 27 2004.
- ANDERSON, M. S.; VENANZI, E. S.; CHEN, Z.; BERZINS, S. P.; BENOIST, C.; MATHIS, D. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity*, v. 23, n. 2, p. 227-39, Aug 2005.
- ANDERSON, M. S. *et al.* Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*, v. 298, n. 5597, p. 1395-401, Nov 15 2002.
- ANDERSON, P. O. *et al.* Persistent antigenic stimulation alters the transcription program in T cells, resulting in antigen-specific tolerance. *Eur J Immunol*, v. 36, n. 6, p. 1374-85, Jun 2006.
- ANDERSSON, J.; TRAN, D. Q.; PESU, M.; DAVIDSON, T. S.; RAMSEY, H.; O'SHEA, J. J.; SHEVACH, E. M. CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF- β -dependent manner. *J Exp Med*, Aug 18 2008.
- ANDRADE, C. F.; WADDELL, T. K.; KESHAVJEE, S.; LIU, M. Innate immunity and organ transplantation: the potential role of toll-like receptors. *Am J Transplant*, v. 5, n. 5, p. 969-75, May 2005.
- AOUDJEHANE, L. *et al.* Interleukin-4 induces the activation and collagen production of cultured human intrahepatic fibroblasts via the STAT-6 pathway. *Lab Invest*, v. 88, n. 9, p. 973-85, Sep 2008.

- APOSTOLOU, I.; SARUKHAN, A.; KLEIN, L.; VON BOEHMER, H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol*, v. 3, n. 8, p. 756-63, Aug 2002.
- ASHTON-CHESS, J.; BROUARD, S.; SOULILLOU, J. P. Is clinical tolerance realistic in the next decade? *Transpl Int*, v. 19, n. 7, p. 539-48, Jul 2006.
- AWAD, M. R.; EL-GAMEL, A.; HASLETON, P.; TURNER, D. M.; SINNOTT, P. J.; HUTCHINSON, I. V. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation*, v. 66, n. 8, p. 1014-20, Oct 27 1998.
- BAAN, C. C. *et al.* Differential effect of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the induction of FOXP3 in human T cells. *Transplantation*, v. 80, n. 1, p. 110-7, Jul 15 2005.
- BARON, U. *et al.* DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol*, v. 37, n. 9, p. 2378-89, Sep 2007.
- BARRON, L.; KNOECHEL, B.; LOHR, J.; ABBAS, A. K. Cutting edge: contributions of apoptosis and anergy to systemic T cell tolerance. *J Immunol*, v. 180, n. 5, p. 2762-6, Mar 1 2008.
- BATTAGLIA, M.; STABILINI, A.; MIGLIAVACCA, B.; HOREJS-HOECK, J.; KAUPPER, T.; RONCAROLO, M. G. Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol*, v. 177, n. 12, p. 8338-47, Dec 15 2006.
- BEILKE, J. N.; KUHL, N. R.; VAN KAER, L.; GILL, R. G. NK cells promote islet allograft tolerance via a perforin-dependent mechanism. *Nat Med*, v. 11, n. 10, p. 1059-65, Oct 2005.
- BENNETT, B. L.; CRUZ, R.; LACSON, R. G.; MANNING, A. M. Interleukin-4 suppression of tumor necrosis factor alpha-stimulated E-selectin gene transcription is mediated by STAT6 antagonism of NF-kappaB. *J Biol Chem*, v. 272, n. 15, p. 10212-9, Apr 11 1997.
- BERLANDA, M. *et al.* Clinical operational tolerance after kidney transplantation: a short literature review. *Transplant Proc*, v. 40, n. 6, p. 1847-51, Jul-Aug 2008.
- BETTELLI, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, v. 441, n. 7090, p. 235-8, May 11 2006.

- BETTELLI, E.; DASTRANGE, M.; OUKKA, M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, n. 14, p. 5138-43, Apr 5 2005.
- BHOGAL, R. K.; STOICA, C. M.; MCGAHA, T. L.; BONA, C. A. Molecular aspects of regulation of collagen gene expression in fibrosis. *J Clin Immunol*, v. 25, n. 6, p. 592-603, Nov 2005.
- BLOKZIJL, A.; TEN DIJKE, P.; IBANEZ, C. F. Physical and functional interaction between GATA-3 and Smad3 allows TGF-beta regulation of GATA target genes. *Curr Biol*, v. 12, n. 1, p. 35-45, Jan 8 2002.
- BLUESTONE, J. A. Is CTLA-4 a master switch for peripheral T cell tolerance? *J Immunol*, v. 158, n. 5, p. 1989-93, Mar 1 1997.
- BOOTHBY, M.; GRAVALLESE, E.; LIOU, H. C.; GLIMCHER, L. H. A DNA binding protein regulated by IL-4 and by differentiation in B cells. *Science*, v. 242, n. 4885, p. 1559-62, Dec 16 1988.
- BOPP, T. *et al.* Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med*, v. 204, n. 6, p. 1303-10, Jun 11 2007.
- BRAND, A. Immunological aspects of blood transfusions. *Transpl Immunol*, v. 10, n. 2-3, p. 183-90, Aug 2002.
- BROUARD, S. *et al.* Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am J Transplant*, v. 5, n. 2, p. 330-40, Feb 2005.
- BROUARD, S. *et al.* Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, n. 39, p. 15448-53, Sep 25 2007.
- BURCHILL, M. A.; YANG, J.; VOGTENHUBER, C.; BLAZAR, B. R.; FARRAR, M. A. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol*, v. 178, n. 1, p. 280-90, Jan 1 2007.
- BUTTNER, C.; SKUPIN, A.; RIEBER, E. P. Transcriptional activation of the type I collagen genes COL1A1 and COL1A2 in fibroblasts by interleukin-4: analysis of the functional collagen promoter sequences. *J Cell Physiol*, v. 198, n. 2, p. 248-58, Feb 2004.
- CARRIER, Y.; YUAN, J.; KUCHROO, V. K.; WEINER, H. L. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by

- Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J Immunol*, v. 178, n. 1, p. 179-85, Jan 1 2007a.
- CARRIER, Y.; YUAN, J.; KUCHROO, V. K.; WEINER, H. L. Th3 cells in peripheral tolerance. II. TGF-beta-transgenic Th3 cells rescue IL-2-deficient mice from autoimmunity. *J Immunol*, v. 178, n. 1, p. 172-8, Jan 1 2007b.
- CHATTOPADHYAY, S.; MEHROTRA, S.; CHHABRA, A.; HEGDE, U.; MUKHERJI, B.; CHAKRABORTY, N. G. Effect of CD4+CD25+ and CD4+CD25- T regulatory cells on the generation of cytolytic T cell response to a self but human tumor-associated epitope in vitro. *J Immunol*, v. 176, n. 2, p. 984-90, Jan 15 2006.
- CHEN, T. C.; COBBOLD, S. P.; FAIRCHILD, P. J.; WALDMANN, H. Generation of anergic and regulatory T cells following prolonged exposure to a harmless antigen. *J Immunol*, v. 172, n. 10, p. 5900-7, May 15 2004.
- CHEN, Y.; INOBE, J.; MARKS, R.; GONNELLA, P.; KUCHROO, V. K.; WEINER, H. L. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature*, v. 376, n. 6536, p. 177-80, Jul 13 1995.
- 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.
- CHEN, Z.; HAN, Z. C. STAT3: a critical transcription activator in angiogenesis. *Med Res Rev*, v. 28, n. 2, p. 185-200, Mar 2008.
- CHIODETTI, L.; CHOI, S.; BARBER, D. L.; SCHWARTZ, R. H. Adaptive tolerance and clonal anergy are distinct biochemical states. *J Immunol*, v. 176, n. 4, p. 2279-91, Feb 15 2006.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, v. 162, n. 1, p. 156-9, Apr 1987.
- COENEN, J. J.; KOENEN, H. J.; VAN RIJSEN, E.; KASRAN, A.; BOON, L.; HILBRANDS, L. B.; JOOSTEN, I. Rapamycin, not cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of CD4+ CD25+ FoxP3+ T cells. *Bone Marrow Transplant*, v. 39, n. 9, p. 537-45, May 2007.
- COHEN, I. R. The cognitive paradigm and the immunological homunculus. *Immunol Today*, v. 13, n. 12, p. 490-4, Dec 1992.

- COHEN, I. R. Biomarkers, self-antigens and the immunological homunculus. *J Autoimmun*, v. 29, n. 4, p. 246-9, Dec 2007.
- COHEN, I. R.; YOUNG, D. B. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol Today*, v. 12, n. 4, p. 105-10, Apr 1991.
- COLLISON, L. W. *et al.* The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, v. 450, n. 7169, p. 566-9, Nov 22 2007.
- CORNELL, L. D.; SMITH, R. N.; COLVIN, R. B. Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *Annu Rev Pathol*, v. 3, p. 189-220, 2008.
- COSMI, L. *et al.* Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood*, v. 102, n. 12, p. 4107-14, Dec 1 2003.
- COUTINHO, A.; HORI, S.; CARVALHO, T.; CARAMALHO, I.; DEMENGEOT, J. Regulatory T cells: the physiology of autoreactivity in dominant tolerance and "quality control" of immune responses. *Immunol Rev*, v. 182, p. 89-98, Aug 2001.
- COZZO, C.; LERMAN, M. A.; BOESTEANU, A.; LARKIN, J., 3RD; JORDAN, M. S.; CATON, A. J. Selection of CD4+CD25+ regulatory T cells by self-peptides. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 293, p. 3-23, 2005.
- CREPALDI, L. *et al.* Up-regulation of IL-10R1 expression is required to render human neutrophils fully responsive to IL-10. *J Immunol*, v. 167, n. 4, p. 2312-22, Aug 15 2001.
- CUA, D. J. *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, v. 421, n. 6924, p. 744-8, Feb 13 2003.
- DAS, G.; SHERIDAN, S.; JANEWAY, C. A., JR. The source of early IFN-gamma that plays a role in Th1 priming. *J Immunol*, v. 167, n. 4, p. 2004-10, Aug 15 2001.
- DAVIDSON, C.; VERMA, N. D.; ROBINSON, C. M.; PLAIN, K. M.; TRAN, G. T.; HODGKINSON, S. J.; HALL, B. M. IL-13 prolongs allograft survival: association with inhibition of macrophage cytokine activation. *Transpl Immunol*, v. 17, n. 3, p. 178-86, Apr 2007.
- DEAGLIO, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*, v. 204, n. 6, p. 1257-65, Jun 11 2007.

- DEMIRKIRAN, A.; HENDRIKX, T. K.; BAAN, C. C.; VAN DER LAAN, L. J.
Impact of immunosuppressive drugs on CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells: does in vitro evidence translate to the clinical setting? *Transplantation*, v. 85, n. 6, p. 783-9, Mar 27 2008.
- DEMOLS, A.; VAN LAETHEM, J. L.; QUERTINMONT, E.; DEGRAEF, C.; DELHAYE, M.; GEERTS, A.; DEVIERE, J. Endogenous interleukin-10 modulates fibrosis and regeneration in experimental chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v. 282, n. 6, p. G1105-12, Jun 2002.
- DEN DEKKER, E. *et al.* Monocyte cell surface glycosaminoglycans positively modulate IL-4-induced differentiation toward dendritic cells. *J Immunol*, v. 180, n. 6, p. 3680-8, Mar 15 2008.
- DESZO, E. L.; BRAKE, D. K.; KELLEY, K. W.; FREUND, G. G. IL-4-dependent CD86 expression requires JAK/STAT6 activation and is negatively regulated by PKCdelta. *Cell Signal*, v. 16, n. 2, p. 271-80, Feb 2004.
- DIECKMANN, D.; PLOTTNER, H.; BERCHTOLD, S.; BERGER, T.; SCHULER, G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*, v. 193, n. 11, p. 1303-10, Jun 4 2001.
- DIEHN, M. *et al.* Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, n. 18, p. 11796-801, Sep 3 2002.
- DOLMETSCH, R. E.; LEWIS, R. S.; GOODNOW, C. C.; HEALY, J. I. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature*, v. 386, n. 6627, p. 855-8, Apr 24 1997.
- FICHTNER-FEIGL, S.; STROBER, W.; KAWAKAMI, K.; PURI, R. K.; KITANI, A. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med*, v. 12, n. 1, p. 99-106, Jan 2006.
- FILACI, G. *et al.* Nonantigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes originate from CD8+CD28- T cells and inhibit both T-cell proliferation and CTL function. *Hum Immunol*, v. 65, n. 2, p. 142-56, Feb 2004.
- FINBLOOM, D. S.; WINESTOCK, K. D. IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol*, v. 155, n. 3, p. 1079-90, Aug 1 1995.

- FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, v. 4, n. 4, p. 330-6, Apr 2003.
- FURTADO, G. C.; CUROTTO DE LAFAILLE, M. A.; KUTCHUKHIDZE, N.; LAFAILLE, J. J. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med*, v. 196, n. 6, p. 851-7, Sep 16 2002.
- GAME, D. S.; HERNANDEZ-FUENTES, M. P.; LECHLER, R. I. Everolimus and basiliximab permit suppression by human CD4+CD25+ cells in vitro. *Am J Transplant*, v. 5, n. 3, p. 454-64, Mar 2005.
- GAO, W.; LU, Y.; EL ESSAWY, B.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K.; STROM, T. B. Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *Am J Transplant*, v. 7, n. 7, p. 1722-32, Jul 2007.
- GARRETT, W. S. *et al.* Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell*, v. 131, n. 1, p. 33-45, Oct 5 2007.
- GLIMCHER, L. H.; TOWNSEND, M. J.; SULLIVAN, B. M.; LORD, G. M. Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nat Rev Immunol*, v. 4, n. 11, p. 900-11, Nov 2004.
- GOLDRATH, A. W.; HEDRICK, S. M. Central tolerance matters. *Immunity*, v. 23, n. 2, p. 113-4, Aug 2005.
- GREENWALD, R. J.; BOUSSIOTIS, V. A.; LORSBACH, R. B.; ABBAS, A. K.; SHARPE, A. H. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity*, v. 14, n. 2, p. 145-55, Feb 2001.
- GROUX, H.; O'GARRA, A.; BIGLER, M.; ROULEAU, M.; ANTONENKO, S.; DE VRIES, J. E.; RONCAROLO, M. G. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, v. 389, n. 6652, p. 737-42, Oct 16 1997.
- GRUNDSTROM, S.; ANDERSON, P.; SCHEIPERS, P.; SUNDSTEDT, A. Bcl-3 and NFkappaB p50-p50 homodimers act as transcriptional repressors in tolerant CD4+ T cells. *J Biol Chem*, v. 279, n. 9, p. 8460-8, Feb 27 2004.
- GUMMERT, J. F.; BARTEN, M. J.; SHERWOOD, S. W.; VAN GELDER, T.; MORRIS, R. E. Pharmacodynamics of immunosuppression by mycophenolic acid: inhibition of both lymphocyte proliferation and activation correlates with pharmacokinetics. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 291, n. 3, p. 1100-12, Dec 1999.

- HARRINGTON, L. E.; HATTON, R. D.; MANGAN, P. R.; TURNER, H.; MURPHY, T. L.; MURPHY, K. M.; WEAVER, C. T. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, v. 6, n. 11, p. 1123-32, Nov 2005.
- HE, X. Y.; VERMA, N.; CHEN, J.; ROBINSON, C.; BOYD, R.; HALL, B. M. IL-5 prolongs allograft survival by downregulating IL-2 and IFN-gamma cytokines. *Transplant Proc*, v. 33, n. 1-2, p. 703-4, Feb-Mar 2001.
- HENDRIKS, R. W.; NAWIJN, M. C.; ENGEL, J. D.; VAN DOORNINCK, H.; GROSVELD, F.; KARIS, A. Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus. *Eur J Immunol*, v. 29, n. 6, p. 1912-8, Jun 1999.
- HERRERA, O. B.; GOLSHAYAN, D.; TIBBOTT, R.; SALCIDO OCHOA, F.; JAMES, M. J.; MARELLI-BERG, F. M.; LECHLER, R. I. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol*, v. 173, n. 8, p. 4828-37, Oct 15 2004.
- HOFFMANN, S. C. *et al.* Functionally significant renal allograft rejection is defined by transcriptional criteria. *Am J Transplant*, v. 5, n. 3, p. 573-81, Mar 2005.
- HU, X.; CHEN, J.; WANG, L.; IVASHKIV, L. B. Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *J Leukoc Biol*, v. 82, n. 2, p. 237-43, Aug 2007.
- HUANG, Z.; XIN, J.; COLEMAN, J.; HUANG, H. IFN-gamma suppresses STAT6 phosphorylation by inhibiting its recruitment to the IL-4 receptor. *J Immunol*, v. 174, n. 3, p. 1332-7, Feb 1 2005.
- HUBER, M. *et al.* IL-27 inhibits the development of regulatory T cells via STAT3. *Int Immunol*, v. 20, n. 2, p. 223-34, Feb 2008.
- HUTCHINSON, I. V.; TURNER, D. M.; SANKARAN, D.; AWAD, M. R.; SINNOTT, P. J. Influence of cytokine genotypes on allograft rejection. *Transplant Proc*, v. 30, n. 3, p. 862-3, May 1998.
- HWANG, E. S.; SZABO, S. J.; SCHWARTZBERG, P. L.; GLIMCHER, L. H. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science*, v. 307, n. 5708, p. 430-3, Jan 21 2005.
- IVANOV, I. *et al.* The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell*, v. 126, n. 6, p. 1121-33, Sep 22 2006.

- IVANOV, II; ZHOU, L.; LITTMAN, D. R. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol*, v. 19, n. 6, p. 409-17, Dec 2007.
- JORDAN, M. S. *et al.* Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol*, v. 2, n. 4, p. 301-6, Apr 2001.
- KAMINUMA, O. *et al.* GATA-3 suppresses IFN-gamma promoter activity independently of binding to cis-regulatory elements. *FEBS Lett*, v. 570, n. 1-3, p. 63-8, Jul 16 2004.
- KAPP, J. A.; KAPP, L. M.; MCKENNA, K. C. Gammadelta T cells play an essential role in several forms of tolerance. *Immunol Res*, v. 29, n. 1-3, p. 93-102, 2004a.
- KAPP, J. A.; KAPP, L. M.; MCKENNA, K. C.; LAKE, J. P. gammadelta T-cell clones from intestinal intraepithelial lymphocytes inhibit development of CTL responses ex vivo. *Immunology*, v. 111, n. 2, p. 155-64, Feb 2004b.
- KEHRL, J. H. *et al.* Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med*, v. 163, n. 5, p. 1037-50, May 1 1986.
- KILLAR, L.; MACDONALD, G.; WEST, J.; WOODS, A.; BOTTOMLY, K. Cloned, Ia-restricted T cells that do not produce interleukin 4(IL 4)/B cell stimulatory factor 1(BSF-1) fail to help antigen-specific B cells. *J Immunol*, v. 138, n. 6, p. 1674-9, Mar 15 1987.
- KINGSLEY, C. I.; KARIM, M.; BUSHELL, A. R.; WOOD, K. J. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol*, v. 168, n. 3, p. 1080-6, Feb 1 2002.
- KITANI, A.; FUSS, I.; NAKAMURA, K.; KUMAKI, F.; USUI, T.; STROBER, W. Transforming growth factor (TGF)-beta1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF-beta1-mediated fibrosis. *J Exp Med*, v. 198, n. 8, p. 1179-88, Oct 20 2003.
- KNOECHEL, B.; LOHR, J.; ZHU, S.; WONG, L.; HU, D.; AUSUBEL, L.; ABBAS, A. K. Functional and molecular comparison of anergic and regulatory T lymphocytes. *J Immunol*, v. 176, n. 11, p. 6473-83, Jun 1 2006.
- KREIJVELD, E.; KOENEN, H. J.; KLASSEN, I. S.; HILBRANDS, L. B.; JOOSTEN, I. Following anti-CD25 treatment, a functional CD4+CD25+ regulatory T-cell pool is present in renal transplant recipients. *Am J Transplant*, v. 7, n. 1, p. 249-55, Jan 2007.

- LAND, W. *et al.* The beneficial effect of human recombinant superoxide dismutase on acute and chronic rejection events in recipients of cadaveric renal transplants. *Transplantation*, v. 57, n. 2, p. 211-7, Jan 1994.
- LAND, W. G. The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. *Transplantation*, v. 79, n. 5, p. 505-14, Mar 15 2005.
- LE GROS, G.; BEN-SASSON, S. Z.; SEDER, R.; FINKELMAN, F. D.; PAUL, W. E. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med*, v. 172, n. 3, p. 921-9, Sep 1 1990.
- LEE, W. C.; JENG, L. B.; CHIANG, Y. J.; WANG, H. C.; HUANG, C. C. Dendritic cell progenitors prolong allograft survival through T-helper 2 deviation of the Th1/Th2 paradigm. *Transplant Proc*, v. 32, n. 7, p. 2076-7, Nov 2000.
- LI, S.; WEIDENFELD, J.; MORRISEY, E. E. Transcriptional and DNA binding activity of the Foxp1/2/4 family is modulated by heterotypic and homotypic protein interactions. *Mol Cell Biol*, v. 24, n. 2, p. 809-22, Jan 2004.
- LIBETTA, C.; SEPE, V.; ZUCCHI, M.; PORTALUPI, V.; MELONI, F.; RAMPINO, T.; DAL CANTON, A. The effect of sirolimus- or cyclosporine-based immunosuppression effects on T-cell subsets in vivo. *Kidney Int*, v. 72, n. 1, p. 114-20, Jul 2007.
- LIGHVANI, A. A. *et al.* T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, n. 26, p. 15137-42, Dec 18 2001.
- LIN, L.; HRON, J. D.; PENG, S. L. Regulation of NF-kappaB, Th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor Foxo3a. *Immunity*, v. 21, n. 2, p. 203-13, Aug 2004.
- LOPEZ, M.; CLARKSON, M. R.; ALBIN, M.; SAYEGH, M. H.; NAJAFIAN, N. A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol*, v. 17, n. 10, p. 2844-53, Oct 2006.
- LOPEZ, M. M.; VALENZUELA, J. E.; ALVAREZ, F. C.; LOPEZ-ALVAREZ, M. R.; CECILIA, G. S.; PARICIO, P. P. Long-term problems related to immunosuppression. *Transpl Immunol*, v. 17, n. 1, p. 31-5, Dec 2006.

- LOSMAN, J. *et al.* IL-4 signaling is regulated through the recruitment of phosphatases, kinases, and SOCS proteins to the receptor complex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, v. 64, p. 405-16, 1999.
- LOSMAN, J. A.; CHEN, X. P.; HILTON, D.; ROTHMAN, P. Cutting edge: SOCS-1 is a potent inhibitor of IL-4 signal transduction. *J Immunol*, v. 162, n. 7, p. 3770-4, Apr 1 1999.
- LOUIS, S. *et al.* Contrasting CD25^{hi}CD4⁺T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation*, v. 81, n. 3, p. 398-407, Feb 15 2006.
- LUNA, E. *et al.* Diversity of physiological cell reactivity to heat shock protein 60 in different mouse strains. *Cell Stress Chaperones*, v. 12, n. 2, p. 112-22, Summer 2007.
- LUND, R. J.; YLIKOSKI, E. K.; AITTOKALLIO, T.; NEVALAINEN, O.; LAHESMAA, R. Kinetics and STAT4- or STAT6-mediated regulation of genes involved in lymphocyte polarization to Th1 and Th2 cells. *Eur J Immunol*, v. 33, n. 4, p. 1105-16, Apr 2003.
- MACIAN, F.; IM, S. H.; GARCIA-COZAR, F. J.; RAO, A. T-cell anergy. *Curr Opin Immunol*, v. 16, n. 2, p. 209-16, Apr 2004.
- MANAVALAN, J. S. *et al.* Alloantigen specific CD8⁺CD28⁻ FOXP3⁺ T suppressor cells induce ILT3⁺ ILT4⁺ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol*, v. 16, n. 8, p. 1055-68, Aug 2004.
- MANGAN, P. R. *et al.* Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*, v. 441, n. 7090, p. 231-4, May 11 2006.
- MANTEL, P. Y.; OUAKED, N.; RUCKERT, B.; KARAGIANNIDIS, C.; WELZ, R.; BLASER, K.; SCHMIDT-WEBER, C. B. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol*, v. 176, n. 6, p. 3593-602, Mar 15 2006.
- MARTIN-FONTECHA, A.; THOMSEN, L. L.; BRETT, S.; GERARD, C.; LIPP, M.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol*, v. 5, n. 12, p. 1260-5, Dec 2004.
- MARTINEZ, O. M.; KRAMS, S. M.; VILLANUEVA, J. C.; FERRELL, L.; LAKE, J.; ROBERTS, J. P.; ASCHER, N. L. Intra-graft eosinophilia and interleukin-5 mRNA accompany liver allograft rejection. *Transplant Proc*, v. 25, n. 1 Pt 1, p. 126-7, Feb 1993a.
- MARTINEZ, O. M.; VILLANUEVA, J. C.; LAKE, J.; ROBERTS, J. P.; ASCHER, N. L.; KRAMS, S. M. IL-2 and IL-5 gene expression in

- response to alloantigen in liver allograft recipients and in vitro. *Transplantation*, v. 55, n. 5, p. 1159-66, May 1993b.
- MATHUR, A. N. *et al.* Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *J Immunol*, v. 178, n. 8, p. 4901-7, Apr 15 2007.
- MATSUMURA, Y. *et al.* Selective expansion of foxp3-positive regulatory T cells and immunosuppression by suppressors of cytokine signaling 3-deficient dendritic cells. *J Immunol*, v. 179, n. 4, p. 2170-9, Aug 15 2007.
- MATZINGER, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*, v. 296, n. 5566, p. 301-5, Apr 12 2002.
- MCGEACHY, M. J.; CUA, D. J. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity*, v. 28, n. 4, p. 445-53, Apr 2008.
- MCHUGH, K. P.; KITAZAWA, S.; TEITELBAUM, S. L.; ROSS, F. P. Cloning and characterization of the murine beta(3) integrin gene promoter: identification of an interleukin-4 responsive element and regulation by STAT-6. *J Cell Biochem*, v. 81, n. 2, p. 320-32, Mar 26 2001.
- METCALFE, S.; MOFFATT-BRUCE, S. An ex vivo model of tolerance vs. rejection: comparison of different signal transducers and activators of transcription, STAT1, STAT4, STAT5 and STAT6. *Clin Chem Lab Med*, v. 38, n. 11, p. 1195-9, Nov 2000.
- MILLER, J. F.; HEATH, W. R. Self-ignorance in the peripheral T-cell pool. *Immunol Rev*, v. 133, p. 131-50, Jun 1993.
- MORRIS, P. J.; RUSSELL, N. K. Alemtuzumab (Campath-1H): a systematic review in organ transplantation. *Transplantation*, v. 81, n. 10, p. 1361-7, May 27 2006.
- MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, v. 136, n. 7, p. 2348-57, Apr 1 1986.
- MUCIDA, D.; PARK, Y.; KIM, G.; TUROVSKAYA, O.; SCOTT, I.; KRONENBERG, M.; CHEROUTRE, H. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, v. 317, n. 5835, p. 256-60, Jul 13 2007.
- MUTHUKUMAR, T. *et al.* Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med*, v. 353, n. 22, p. 2342-51, Dec 1 2005.

- NIEMAND, C. *et al.* Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol*, v. 170, n. 6, p. 3263-72, Mar 15 2003.
- NOCERA, A. *et al.* Cytokine mRNA expression in chronically rejected human renal allografts. *Clin Transplant*, v. 18, n. 5, p. 564-70, Oct 2004.
- NOLAN, C. R.; SAENZ, K. P.; THOMAS, C. A., 3RD; MURPHY, K. D. Role of the eosinophil in chronic vascular rejection of renal allografts. *Am J Kidney Dis*, v. 26, n. 4, p. 634-42, Oct 1995.
- NORIS, M. *et al.* Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs. *J Am Soc Nephrol*, v. 18, n. 3, p. 1007-18, Mar 2007.
- OLIVEIRA, S. G.; OLIVEIRA, I. B.; ABENSUR, H.; ARAUJO, M. R.; ROMAO, J. E.; NORONHA, I. L. Differential expression of cytokines, growth factors, and alpha-smooth muscle actin in renal allograft biopsies. *Transplant Proc*, v. 34, n. 2, p. 479-81, Mar 2002.
- ONG, C. J.; IP, S.; TEH, S. J.; WONG, C.; JIRIK, F. R.; GRUSBY, M. J.; TEH, H. S. A role for T helper 2 cells in mediating skin fibrosis in tight-skin mice. *Cell Immunol*, v. 196, n. 1, p. 60-8, Aug 25 1999.
- PACHOLCZYK, R.; IGNATOWICZ, H.; KRAJ, P.; IGNATOWICZ, L. Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells. *Immunity*, v. 25, n. 2, p. 249-59, Aug 2006.
- PACHOLCZYK, R.; KERN, J.; SINGH, N.; IWASHIMA, M.; KRAJ, P.; IGNATOWICZ, L. Nonself-antigens are the cognate specificities of Foxp3+ regulatory T cells. *Immunity*, v. 27, n. 3, p. 493-504, Sep 2007.
- PANDIYAN, P.; ZHENG, L.; ISHIHARA, S.; REED, J.; LENARDO, M. J. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*, v. 8, n. 12, p. 1353-62, Dec 2007.
- PANDOLFI, P. P. *et al.* Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat Genet*, v. 11, n. 1, p. 40-4, Sep 1995.
- PARK, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, v. 6, n. 11, p. 1133-41, Nov 2005.
- PARK, S. J. *et al.* IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol*, v. 173, n. 6, p. 3844-54, Sep 15 2004.

- PATERSON, H. M. *et al.* Injury primes the innate immune system for enhanced Toll-like receptor reactivity. *J Immunol*, v. 171, n. 3, p. 1473-83, Aug 1 2003.
- PAUL, L. C.; SAITO, K.; DAVIDOFF, A.; BENEDIKTSSON, H. Growth factor transcripts in rat renal transplants. *Am J Kidney Dis*, v. 28, n. 3, p. 441-50, Sep 1996.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, v. 29, n. 9, p. e45, May 1 2001.
- PICCIRILLO, C. A.; SHEVACH, E. M. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol*, v. 167, n. 3, p. 1137-40, Aug 1 2001.
- PIRENNE, J.; KITADE, H.; KAWAI, M.; KOSHIBA, T.; VAN DAMME, B.; MATHIEU, C.; WAER, M. Regulatory cells, TH1/TH2 unbalance, and antibody-induced chronic rejection in operational tolerance induced by donor-specific blood transfusion. *Transplantation*, v. 79, n. 3 Suppl, p. S25-7, Feb 15 2005.
- POLANCZYK, M. J.; CARSON, B. D.; SUBRAMANIAN, S.; AFENTOULIS, M.; VANDENBARK, A. A.; ZIEGLER, S. F.; OFFNER, H. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *J Immunol*, v. 173, n. 4, p. 2227-30, Aug 15 2004.
- PONS, J. A. *et al.* FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal. *Transplantation*, v. 86, n. 10, p. 1370-8, Nov 27 2008.
- PRIBYLOVA-HRIBOVA, P.; KOTSCH, K.; LODEREROVA, A.; VIKLICKY, O.; VITKO, S.; VOLK, H. D.; LACHA, J. TGF-beta1 mRNA upregulation influences chronic renal allograft dysfunction. *Kidney Int*, v. 69, n. 10, p. 1872-9, May 2006.
- QIN, S.; COBBOLD, S. P.; POPE, H.; ELLIOTT, J.; KIOUSSIS, D.; DAVIES, J.; WALDMANN, H. "Infectious" transplantation tolerance. *Science*, v. 259, n. 5097, p. 974-7, Feb 12 1993.
- READ, S. *et al.* Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol*, v. 177, n. 7, p. 4376-83, Oct 1 2006.
- ROCHA, P. N.; PLUMB, T. J.; CROWLEY, S. D.; COFFMAN, T. M. Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunol Rev*, v. 196, p. 51-64, Dec 2003.

- ROMBALL, C. G.; WEIGLE, W. O. Cytokines in the induction and circumvention of peripheral tolerance. *J Interferon Cytokine Res*, v. 19, n. 6, p. 671-8, Jun 1999.
- RONCAROLO, M. G.; GREGORI, S.; BATTAGLIA, M.; BACCHETTA, R.; FLEISCHHAUER, K.; LEVINGS, M. K. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev*, v. 212, p. 28-50, Aug 2006.
- 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.
- SAKAMOTO, O.; HASHIYAMA, M.; MINTY, A.; ANDO, M.; SUDA, T. Interleukin-13 selectively suppresses the growth of human macrophage progenitors at the late stage. *Blood*, v. 85, n. 12, p. 3487-93, Jun 15 1995.
- SALAMA, A. D.; WOMER, K. L.; SAYEGH, M. H. Clinical transplantation tolerance: many rivers to cross. *J Immunol*, v. 178, n. 9, p. 5419-23, May 1 2007.
- SANCHEZ-GUAJARDO, V.; TANCHOT, C.; O'MALLEY, J. T.; KAPLAN, M. H.; GARCIA, S.; FREITAS, A. A. Agonist-driven development of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells requires a second signal mediated by Stat6. *J Immunol*, v. 178, n. 12, p. 7550-6, Jun 15 2007.
- SAWITZKI, B. *et al.* Identification of gene markers for the prediction of allograft rejection or permanent acceptance. *Am J Transplant*, v. 7, n. 5, p. 1091-102, May 2007.
- SCHAEFFER, E. M. *et al.* Mutation of Tec family kinases alters T helper cell differentiation. *Nat Immunol*, v. 2, n. 12, p. 1183-8, Dec 2001.
- SCHWENGER, G. T.; MORDVINOV, V. A.; SANDERSON, C. J. Transcription factor GATA-3 is involved in repression of promoter activity of the human interleukin-4 gene. *Biochemistry (Mosc)*, v. 70, n. 9, p. 1065-9, Sep 2005.
- SCULLY, R.; COBBOLD, S. P.; MELLOR, A. L.; WISSING, M.; ARNOLD, B.; WALDMANN, H. A role for Th2 cytokines in the suppression of CD8+ T cell-mediated graft rejection. *Eur J Immunol*, v. 27, n. 7, p. 1663-70, Jul 1997.

- SEINO, K. I. *et al.* Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, n. 5, p. 2577-81, Feb 27 2001.
- SETOGUCHI, R.; HORI, S.; TAKAHASHI, T.; SAKAGUCHI, S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med*, v. 201, n. 5, p. 723-35, Mar 7 2005.
- SHARMA, M. D. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest*, v. 117, n. 9, p. 2570-82, Sep 2007.
- SHEVACH, E. M.; TRAN, D. Q.; DAVIDSON, T. S.; ANDERSSON, J. The critical contribution of TGF-beta to the induction of Foxp3 expression and regulatory T cell function. *Eur J Immunol*, v. 38, n. 4, p. 915-7, Apr 2008.
- SHIHAB, F. S.; YAMAMOTO, T.; NAST, C. C.; COHEN, A. H.; NOBLE, N. A.; GOLD, L. I.; BORDER, W. A. Transforming growth factor-beta and matrix protein expression in acute and chronic rejection of human renal allografts. *J Am Soc Nephrol*, v. 6, n. 2, p. 286-94, Aug 1995.
- SOLEZ, K. *et al.* Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant*, v. 7, n. 3, p. 518-26, Mar 2007.
- STAPLES, K. J.; SMALLIE, T.; WILLIAMS, L. M.; FOEY, A.; BURKE, B.; FOXWELL, B. M.; ZIEGLER-HEITBROCK, L. IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3. *J Immunol*, v. 178, n. 8, p. 4779-85, Apr 15 2007.
- STEINMAN, L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med*, v. 13, n. 2, p. 139-45, Feb 2007.
- STEPKOWSKI, S. M.; CHEN, W.; ROSS, J. A.; NAGY, Z. S.; KIRKEN, R. A. STAT3: an important regulator of multiple cytokine functions. *Transplantation*, v. 85, n. 10, p. 1372-7, May 27 2008.
- STRAUSS, L.; WHITESIDE, T. L.; KNIGHTS, A.; BERGMANN, C.; KNUTH, A.; ZIPPELIUS, A. Selective survival of naturally occurring human CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells cultured with rapamycin. *J Immunol*, v. 178, n. 1, p. 320-9, Jan 1 2007.
- STREMMEL, C.; SIENEL, W.; EGGELING, S.; PASSLICK, B.; SLAVIN, A. Inhibition of T cell homing by down-regulation of CD62L and the induction of a Th-2 response as a method to prevent acute allograft

- rejection in mice. *Eur J Cardiothorac Surg*, v. 30, n. 2, p. 362-9, Aug 2006.
- SZABO, S. J.; KIM, S. T.; COSTA, G. L.; ZHANG, X.; FATHMAN, C. G.; GLIMCHER, L. H. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, v. 100, n. 6, p. 655-69, Mar 17 2000.
- SZABO, S. J.; SULLIVAN, B. M.; STEMMANN, C.; SATOSKAR, A. R.; SLECKMAN, B. P.; GLIMCHER, L. H. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science*, v. 295, n. 5553, p. 338-42, Jan 11 2002.
- TAKAKI, H. *et al.* STAT6 Inhibits TGF-beta1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. *J Biol Chem*, v. 283, n. 22, p. 14955-62, May 30 2008.
- TAKEDA, K.; KAISHO, T.; YOSHIDA, N.; TAKEDA, J.; KISHIMOTO, T.; AKIRA, S. Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J Immunol*, v. 161, n. 9, p. 4652-60, Nov 1 1998.
- TAKEDA, K.; KAMANAKA, M.; TANAKA, T.; KISHIMOTO, T.; AKIRA, S. Impaired IL-13-mediated functions of macrophages in STAT6-deficient mice. *J Immunol*, v. 157, n. 8, p. 3220-2, Oct 15 1996.
- TERASAKI, P. I.; CECKA, J. M.; GJERTSON, D. W.; TAKEMOTO, S. High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N Engl J Med*, v. 333, n. 6, p. 333-6, Aug 10 1995a.
- TERASAKI, P. I.; GJERTSON, D. W.; CECKA, J. M.; TAKEMOTO, S. Proposed HLA matching scheme for improved cadaveric kidney allocation. *Transplant Proc*, v. 27, n. 1, p. 61-3, Feb 1995b.
- THOMSON, A. W.; WOO, J.; YAO, G. Z.; TODO, S.; STARZL, T. E.; ZEEVI, A. Effects of combined administration of FK 506 and the purine biosynthesis inhibitors mizoribine or mycophenolic acid on lymphocyte DNA synthesis and T cell activation molecule expression in human mixed lymphocyte cultures. *Transpl Immunol*, v. 1, n. 2, p. 146-50, 1993.
- TONE, Y.; FURUUCHI, K.; KOJIMA, Y.; TYKOCINSKI, M. L.; GREENE, M. I.; TONE, M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol*, v. 9, n. 2, p. 194-202, Feb 2008.
- TRAN, D. Q.; RAMSEY, H.; SHEVACH, E. M. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not

- confer a regulatory phenotype. *Blood*, v. 110, n. 8, p. 2983-90, Oct 15 2007.
- TRULL, A. K. *et al.* Randomized trial of blood eosinophil count monitoring as a guide to corticosteroid dosage adjustment after heart transplantation. *Transplantation*, v. 70, n. 5, p. 802-9, Sep 15 2000.
- TULLIUS, S. G. *et al.* Contribution of prolonged ischemia and donor age to chronic renal allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol*, v. 11, n. 7, p. 1317-24, Jul 2000.
- TURKSON, J. *et al.* Requirement for Ras/Rac1-mediated p38 and c-Jun N-terminal kinase signaling in Stat3 transcriptional activity induced by the Src oncoprotein. *Mol Cell Biol*, v. 19, n. 11, p. 7519-28, Nov 1999.
- USUI, T.; NISHIKOMORI, R.; KITANI, A.; STROBER, W. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity*, v. 18, n. 3, p. 415-28, Mar 2003.
- USUI, T.; PREISS, J. C.; KANNO, Y.; YAO, Z. J.; BREM, J. H.; O'SHEA, J. J.; STROBER, W. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J Exp Med*, v. 203, n. 3, p. 755-66, Mar 20 2006.
- VANBUSKIRK, A. M. *et al.* Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest*, v. 106, n. 1, p. 145-55, Jul 2000.
- VELDHOEN, M.; HOCKING, R. J.; ATKINS, C. J.; LOCKSLEY, R. M.; STOCKINGER, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, v. 24, n. 2, p. 179-89, Feb 2006.
- VERONESE, F. *et al.* Pathological and clinical correlates of FOXP3+ cells in renal allografts during acute rejection. *Am J Transplant*, v. 7, n. 4, p. 914-22, Apr 2007.
- WAAGA, A. M. *et al.* Regulatory functions of self-restricted MHC class II alloptide-specific Th2 clones in vivo. *J Clin Invest*, v. 107, n. 7, p. 909-16, Apr 2001.
- WALDMANN, H. Tolerance can be infectious. *Nat Immunol*, v. 9, n. 9, p. 1001-3, Sep 2008.
- WALDMANN, H.; COBBOLD, S. How do monoclonal antibodies induce tolerance? A role for infectious tolerance? *Annu Rev Immunol*, v. 16, p. 619-44, 1998.

- WALKER, M. R.; KASPROWICZ, D. J.; GERSUK, V. H.; BENARD, A.; VAN LANDEGHEN, M.; BUCKNER, J. H.; ZIEGLER, S. F. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest*, v. 112, n. 9, p. 1437-43, Nov 2003.
- WANG, J.; IOAN-FACSINAY, A.; VAN DER VOORT, E. I.; HUIZINGA, T. W.; TOES, R. E. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol*, v. 37, n. 1, p. 129-38, Jan 2007.
- WEI, J.; DURAMAD, O.; PERNG, O. A.; REINER, S. L.; LIU, Y. J.; QIN, F. X. Antagonistic nature of T helper 1/2 developmental programs in opposing peripheral induction of Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, n. 46, p. 18169-74, Nov 13 2007.
- WIEDERRECHT, G.; MARTIN, M. M.; SIGAL, N. H.; SIEKIERKA, J. J. Isolation of a human cDNA encoding a 25 kDa FK-506 and rapamycin binding protein. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 185, n. 1, p. 298-303, May 29 1992.
- WIEDERRECHT, G. J.; SABERS, C. J.; BRUNN, G. J.; MARTIN, M. M.; DUMONT, F. J.; ABRAHAM, R. T. Mechanism of action of rapamycin: new insights into the regulation of G1-phase progression in eukaryotic cells. *Prog Cell Cycle Res*, v. 1, p. 53-71, 1995.
- WILSON, N. J. *et al.* Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*, v. 8, n. 9, p. 950-7, Sep 2007.
- WU, Y. *et al.* FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, v. 126, n. 2, p. 375-87, Jul 28 2006.
- WYNN, T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*, v. 214, n. 2, p. 199-210, Jan 2008.
- XU, Q. *et al.* Human CD4+CD25^{low} adaptive T regulatory cells suppress delayed-type hypersensitivity during transplant tolerance. *J Immunol*, v. 178, n. 6, p. 3983-95, Mar 15 2007.
- YASUKAWA, H. *et al.* IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol*, v. 4, n. 6, p. 551-6, Jun 2003.
- YI, H.; ZHANG, J.; ZHAO, Y. The effects of antibody treatment on regulatory CD4(+)CD25(+) T cells. *Transpl Immunol*, v. 19, n. 1, p. 37-44, Apr 2008.
- YOU, S.; LEFORBAN, B.; GARCIA, C.; BACH, J. F.; BLUESTONE, J. A.; CHATENAUD, L. Adaptive TGF-beta-dependent regulatory T cells

control autoimmune diabetes and are a privileged target of anti-CD3 antibody treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, n. 15, p. 6335-40, Apr 10 2007.

ZEISER, R. *et al.* Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood*, v. 108, n. 1, p. 390-9, Jul 1 2006.

ZHANG, D. H.; COHN, L.; RAY, P.; BOTTOMLY, K.; RAY, A. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem*, v. 272, n. 34, p. 21597-603, Aug 22 1997.

ZHANG, Y. *et al.* Activation of Stat3 in v-Src-transformed fibroblasts requires cooperation of Jak1 kinase activity. *J Biol Chem*, v. 275, n. 32, p. 24935-44, Aug 11 2000.

ZHENG, W.; FLAVELL, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, v. 89, n. 4, p. 587-96, May 16 1997.

ZHOU, P. *et al.* Role of STAT4 and STAT6 signaling in allograft rejection and CTLA4-Ig-mediated tolerance. *J Immunol*, v. 165, n. 10, p. 5580-7, Nov 15 2000.

ZHU, J.; YAMANE, H.; COTE-SIERRA, J.; GUO, L.; PAUL, W. E. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res*, v. 16, n. 1, p. 3-10, Jan 2006.

ZIEGLER, S. F. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol*, v. 24, p. 209-26, 2006.

ZIEGLER, S. F. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur J Immunol*, v. 37, n. 1, p. 21-3, Jan 2007.

APÊNDICE

Apêndice A: Termo de consentimento livre e esclarecido

Apêndice B: Aprovação do projeto pelaCAPPesq

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 saudáveis, 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. Salva-guarda 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)

Apêndice B

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 **0468/08**, intitulado: "**ESTUDO DO PERFIL MOLECULAR TRANSCRICIONAL EM PACIENTES TRANSPLANTADOS COM "TOLERÂNCIA OPERACIONAL"**," apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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: **Veronica Coelho**

Pesquisador (a) Executante: **Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira**

CAPPesq, 12 de Setembro de 2008

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