Susanne Carolinne Penha Ferreira

**Detecção de estruturas renais reconhecidas por
anticorpos não-HLA envolvidos na rejeição humoral
em pacientes transplantados renais**

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

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Kalil

**São Paulo
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ferreira, Susanne Carolinne Penha

Detecção de estruturas renais reconhecidas por anticorpos não-HLA envolvidos na rejeição humoral em pacientes transplantados renais / Susanne Carolinne Penha Ferreira. -- São Paulo, 2008.

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

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Jorge Elias Kalil Filho.

Descritores: 1.Anticorpos 2.Transplante de rim 3.Rejeição de enxerto

USP/FM/SBD-347/08

Candidato(a):

Susanne Carolinne Penha
Ferreira

Título da Dissertação:

Detecção de estruturas renais
reconhecidas por anticorpos
não-HLA envolvidos na rejeição
humoral em pacientes
transplantados renais.

A comissão julgadora dos trabalhos de Dissertação de mestrado, em
sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o (a) candidato (a):

(   ) Aprovado (a)

(   ) Reprovado (a)

1) Examinador (a) _____

2) Examinador (a) _____

3) Presidente _____

*“Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor...
Lembre-se: se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor, com ele
conquistará o mundo.”*

Albert Einstein

Agradecimentos

Ao Prof^o. Dr. Jorge Kalil, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho sob a sua orientação, tenho muita honra de carregar o seu nome como meu orientador. Gostaria ainda de enaltecer todos os seus excelentes conhecimentos científicos, conselhos, idéias e as valiosas sugestões apresentadas, que constituíram uma condição essencial para os resultados apresentados. Muito obrigada

Ao Dr. Nicolas Panajotopoulos, pela orientação científica e por estar ao meu lado em todas as etapas deste trabalho. Obrigada pela ajuda disponibilizada.

Agradeço o chefe do laboratório HLA, Hércio Rodrigues, por ter disponibilizado o setor para o desenvolvimento do trabalho e, principalmente, por ser uma pessoa tão prestativa comigo. Obrigada.

Aproveito e agradeço as pessoas que compõem o laboratório HLA, que convivi por 4 anos e que tenho um carinho especial: Ivete, Yoni, Sandra, Marcelo, Olga, Célia, Mário, Cláudia, Germano, Carlos e Gisele. É o grupo mais animado do laboratório, eu tenho certeza que eu fiquei no lugar certo. Obrigada por terem me ajudado, sem vocês este trabalho com certeza não seria concluído.

Neste parágrafo, quero agradecer em especial a minha amiga Carla, que ela sabe que sem ela eu não teria conseguido terminar o meu mestrado. Você foi uma pessoa que me incentivou, ajudou, foi minha conselheira em todos os momentos. Estive do meu lado dos momentos mais felizes aos mais tristes. Obrigada, só Deus para retribuir o que você fez por mim.

Quero agradecer minhas amigas Keity, Carol, Maísa, Bia, Geórgia (ôxe!), Lin, Samantha, Natalie, Adriana, Luciana Nogueira e Patrícia pela amizade, ajuda e por tornarem meus dias mais agradáveis. Vou carregar vocês para sempre no meu coração.

Obrigada a todos os grupos do laboratório (Chagas, Vacina, Transplante, Vascular), pois em todos os momentos que precisei, estavam sempre solícitos e com certeza foram cruciais durante o desenvolvimento do trabalho.

Obrigada a todos os chefes de grupo: Verônica Coelho, Edécio Cunha e Luiza Guilherme por serem sempre tão prestativos, e sempre dispostos a ajudar.

A Ana Garippo que me ajudou muito para obtenção de fotos tão bonitas do teste de imunofluorescência, além de ser uma pessoa muito meiga, paciente e que me ajudou muito com sugestões e conselhos.

A Rose, pelas conversas, conselhos, dicas importantíssimas, pela sua amizade. Você é uma pessoa muito especial. Obrigada por tudo.

A Kellen e a Simone Fonseca, que não estão mais no laboratório, mas me auxiliaram muito quando estavam presentes.

Agradeço o Dr. Paulo Gutierrez, pelas sugestões ao trabalho, por estar sempre disposto a me ajudar. Eu lembro que no início do trabalho nada dava certo e você me incentivava e hoje eu digo que foi muito por essa dose de estímulo que me fez continuar naquele momento. Obrigada por tudo Dr. Paulo, eu o admiro muito, não só como profissional, mas principalmente como pessoa.

A Dra. Myrthes por sempre me ouvir com tanta paciência, me aconselhar em alguns momentos críticos que passei, pelas sugestões na minha qualificação. A senhora é uma pessoa muito especial, obrigada.

Ao Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas, que confeccionaram as lâminas para o trabalho.

A Dra. Irene Noronha, por ter me auxiliado na identificação das estruturas renais e por ter cedido parte das biópsias do trabalho. Obrigada pelo carinho.

Ao Dr. Luís Moura, da Escola Paulista de Medicina, que me ajudou muito para obtenção dos resultados do trabalho.

Ao Dr. William, da Unidade de Transplante Renal, que me cedeu algumas biópsias para o trabalho.

A Tânia, Gisele, Sonia e Sr. Jair, por sempre me ajudarem com tanto empenho.

A Dra. Flávia Nascimento, foi minha orientadora na iniciação científica e que apesar de estar distante, me ajudou em toda minha vida acadêmica e se hoje eu consegui chegar aonde cheguei, foi graças a você! Muito obrigada, minha eterna orientadora.

A FAPESP pela bolsa concedida e pela verba da reserva técnica que foi suficiente para as despesas do trabalho.

Agradeço a minha família, minha mãe, meus irmãos, meus sobrinhos que são pessoas que estão me apoiando sempre e me fazem sentir a pessoa mais amada do mundo, eu amo vocês.

Deixei por último a pessoa que eu considero a mais importante neste agradecimento, o meu marido Sérgio, que eu amo tanto. É o meu companheiro de todas as horas, sempre me escutou e aconselhou com as

palavras certas nas horas certas, às vezes simplesmente me oferecia um colo que tanto me confortava e me fazia sentir protegida. Sem dúvida nenhuma, você é uma dádiva que Deus colocou no meu caminho e que hoje eu não imagino minha vida sem você. Obrigada por você existir.

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTAS

Abreviaturas

Figuras

Tabelas

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Transplante e o Sistema HLA.....	1
1.2 Bases imunológicas da rejeição	4
1.3 Rejeição mediada por anticorpos no transplante	7
1.4 Sistema de antígenos secundários no transplante.....	10
1.4.1 MICA.....	11
1.4.2 Sistema endotelial	11
2. OBJETIVOS	20
2.1 Geral	20
2.2 Específicos	20
3. MÉTODOS.....	21
3.1 Pacientes.....	21
3.2 Obtenção de amostras biológicas	21
3.2.1. Fragmentos de baço ou linfonodo	21
3.2.2. Fragmentos renais.....	22
3.2.3. Sangue periférico	22

3.3 Análise histopatológica.....	22
3.4 Obtenção dos eluatos renais.....	24
3.5 Dosagem de proteínas totais nos eluatos	26
3.6 Dosagem de IgG e IgM totais nos eluatos.....	26
3.7 Separação de linfócitos totais a partir de sangue periférico	27
3.8 Separação de linfócitos T e B.....	28
3.9 Tratamento do soro com ditiotretol (DTT).....	29
3.10 Prova-cruzada contra linfócitos T e B.....	30
3.11 Prova-cruzada contra linfócitos T com antiglobulina humana (AGH)	31
3.12 Reatividade contra Painei (PRA).....	32
3.13 Células da Linhagem Eahy.926.....	33
3.14 Pesquisa de anticorpos anti-célula endotelial.....	34
3.14.1 Em indivíduos saudáveis	34
3.14.2 Em eluatos renais	36
3.15 Imunofluorescência	37
3.15.1 Obtenção dos tecidos renais saudáveis	37
3.15.2 Congelamento dos tecidos renais saudáveis.....	37
3.15.3 Padronização da imunofluorescência	37
3.16 Pesquisa anticorpo anti-MICA	42
4. RESULTADOS	45
4.1 Avaliação Imunológica	45
4.2 Dosagem de proteínas e imunoglobulinas IgG e IgM nos eluatos renais	45
4.3 Pesquisa de anticorpos anti-HLA	46

4.4 Pesquisa de anticorpos não-HLA utilizando como fonte antigênica a linhagem EAHY. 926	47
4.5 Imunofluorescência Indireta (IFI).....	49
4.5.1 Padronização da imunofluorescência	49
4.5.2 Detecção de estrutura(s) renal(is) reconhecida(s) por anticorpos não-HLA presentes nos eluatos.....	51
4.6 Pesquisa de anticorpos anti-MICA	71
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS	85
7. ANEXOS.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
8. APÊNDICES	

Lista de Abreviaturas

- AACE- anticorpos anti-célula endotelial
- ADCC- do inglês *antibody dependent cell mediated cytotoxicity*
- AGH- do inglês *Human Antiglobulin*
- APC- do inglês *antigen presenting cell*
- CDC- citotoxicidade dependente de complemento
- CE- Célula Endotelial
- DMEM- do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO- dimetilsufóxido
- DTT- dtiotreitol
- EDTA- sal di-sódico do ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA- do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
- EM- Endotélio Monócito
- FACS- do inglês *Fluorescence-Activated Cell Sorter*
- FITC- do inglês *Fluorescein isothiocyanate*
- FSC- do inglês, *forward scatted*
- HLA- do inglês *Human Leukocyte Antigens*
- HUVECs- do inglês *Human umbilical vein endothelial cells*),
- IVIg- do inglês *Intravenous immune globulin*
- MICA - do inglês *MHC class I chain-related protein A*
- MHC- do inglês *Major Histocompatibility Complex*
- MIF- mediana de intensidade de fluorescência
- PBMC- do inglês *peripheral blood mononuclear cells*
- PBS- Tampão Salina Fosfato
- PE- do inglês *Phycoerythrin*

- PC- prova cruzada
- PRA- reatividade contra painel
- q.s.p- quantidade suficiente para
- RPE- do inglês *R-Phycoeritrina*
- RPMI- do inglês *Roswell Park Memorial Institute*
- RVA- rejeição vascular aguda
- SFB- soro fetal bovino
- SSC- do inglês, *side scatterd*
- TCR- do inglês *T cell receptor*
- Tx- Transplante
- VEC- do inglês *vascular endothelial cell*

Lista de Figuras

- Figura 1.** Pesquisa de anticorpos IgG anti-célula endotelial em eluatos renais por citometria de fluxo.....
- Figura 2.** Pesquisa de anticorpos IgM anti-célula endotelial em eluatos renais por citometria de fluxo.....
- Figura 3.** Teste para estabelecer o controle negativo da reação. Imunofluorescência indireta em corte histológico renal sadio utilizando conjugado IgG anti-humano conjugado com FITC.....
- Figura 4.** Teste para estabelecer o controle positivo da reação. Imunofluorescência indireta em corte histológico renal sadio utilizando conjugado IgG anti-humano conjugado com FITC.....
- Figura 5.** Imunofluorescência indireta dos eluatos renais utilizando anti-IgG-humano conjugado com FITC.....
- Figura 6.** Imunofluorescência indireta nas amostras de eluatos renais utilizando anti-IgM-humano conjugado com R-PE.....
- Figura 7.** Ensaio de colocalização utilizando anti-IgG-humano conjugado com FITC e anti-IgM-humano conjugado com R-PE por imunofluorescência indireta nas amostras de eluatos renais.....
- Figura 8.** Ensaio de colocalização utilizando anti-IgG-humano conjugado com FITC e anti-CD31 conjugado com R-PE por imunofluorescência indireta nas amostras de eluatos renais.....
- Figura 9.** Ensaio de colocalização utilizando anti-IgM-humano conjugado com R-PE e anti-CD31 conjugado com FITC por imunofluorescência indireta nas amostras de eluatos renais.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Análise histopatológica das biópsias renais.....

Tabela 2. Concentração de imunoglobulinas dos eluatos renais....

Tabela 3. Intensidade de fluorescência nas estruturas renais avaliadas. Resultados dos testes utilizando marcador anti-IgG humano conjugado com FITC.....

Tabela 4. Intensidade de fluorescência nas estruturas renais avaliadas. Resultados dos testes utilizando marcador anti-IgM humano conjugado com R-PE.....

Resumo

Ferreira SCP. Detecção de estruturas renais reconhecidas por anticorpos não-HLA envolvidos na rejeição humoral em pacientes transplantados renais [dissertação]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006.

O transplante de órgãos é hoje uma opção de tratamento de várias doenças terminais. Apesar de todos os progressos no campo do transplante, o principal problema enfrentado ainda é a rejeição. As principais moléculas responsáveis pela resposta alogeneica e subsequente rejeição ao enxerto, são os antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês *Human Leucocyte Antigens*). Porém, existem evidências que anticorpos dirigidos a antígenos não-HLA estão associados com rejeição de transplantes. Neste estudo, foi investigada a presença de anticorpos anti-célula endotelial (AAEC) em 11 pacientes que perderam seus rins transplantados devido à rejeição humoral irreversível e em 2 com perda por trombose de veia renal. A ausência de anticorpos anti-HLA contra o doador foi verificada antes do transplante, da rejeição e antes e depois da transplantectomia, através da realização de provas cruzadas usando as técnicas mais sensíveis. Anticorpos não-HLA presentes em nove eluatos reagiram com EAHy.926. Eluatos positivos e negativos contra linhagem EAHy.926 foram testados contra cortes histológicos de 6 rins sadios para detecção de quais estruturas renais são reconhecidas por esses anticorpos. A reação foi avaliada pelo método de imunofluorescência indireta. Dos 13 eluatos testados, 4 (isotipo IgG) e 5 (isotipo IgM) reagiram com forte fluorescência nos glomérulos e endotélio arterial, mas não foi verificada reação na cápsula de Bowman e no epitélio tubular. Não foi observado polimorfismo na reatividade dos eluatos. Em conclusão, verificamos que os anticorpos não-HLA têm um importante papel na rejeição humoral. Estes estão reconhecendo antígenos de um sistema provavelmente não-polimórfico nas células de endoteliais presentes, principalmente, nos capilares glomerulares.

Summary

Ferreira SCP. Detection of renal structures recognized by non-HLA antibodies involved in the humoral rejection in patients with renal transplants [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006.

The transplant of organs is today an option of treatment to several terminal diseases. In spite of all the progress in the field of the transplants, the rejection remains a problem to be solved. The main target molecules for the allogenic response and subsequent allograft rejection are the human leukocyte antigens (HLA). However, there are growing evidences that non-HLA antibodies are associated with transplant rejection. In this study it was investigated the presence of anti-endothelial cell antibodies (AECA) in 11 patients who had early lost their transplanted kidney by irreversible humoral rejection and in 2 ones from renal venal thrombosis. The absence of anti-HLA antibodies against the donor was verified by the negativity of crossmatches performed using the most sensitive assays, at the transplant, at the rejection, and before and after the transplantectomy. Antibodies from 9 eluates bound to EAHy.926. Positive and negatives eluates were tested against frozen sections from 6 normal kidneys in order to define the structures to which they were reactive. The reactivity was identified by indirect immunofluorescence method. From 13 eluates evaluated, 4 (isotipe IgG) and 5 (isotipe IgM) reacted to the glomerulus and renal arterial endothelium with intense fluorescence but they did not react to the Bowman's capsule and tubular epithelium. No polymorphism was observed in eluates reactivity. In conclusion, we have shown that non-HLA antibodies may represent a cause of the humoral rejection. These antibodies are probably recognizing antigens of a nonpolymorphic system in endothelial cells present, mainly, in the glomerular capillaries.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Transplante e o Sistema HLA

O transplante de tecidos e órgãos é hoje uma importante, senão única alternativa de tratamento para uma variedade de doenças terminais. Com relação às necessidades de transplante renal, há relatos de que em torno de 50% dos pacientes que ingressam em diálise poderiam beneficiar-se do transplante (1). No Brasil, em 2006, foram realizados 3.281 transplantes renais, segundo dados da Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (2).

Apesar de todos os avanços no campo dos transplantes, o principal problema enfrentado ainda é a rejeição. A rejeição consiste em uma série de eventos de caráter imunológico e não-imunológico, que se não controlados, podem levar perda da função do enxerto.

Um avanço fundamental para a área de transplantes derivou da descoberta de Jean Dausset, em 1952, sobre a presença de anticorpos específicos para proteínas na superfície de leucócitos, o que levou a definição dos antígenos de histocompatibilidade HLA (*Human Leukocyte Antigen*) possibilitando o conhecimento da relação antigênica entre indivíduos distintos (3).

O sistema HLA é extremamente polimórfico, suas moléculas são glicoproteínas que estão presentes na superfície da membrana celular (4). Estas moléculas são codificadas por um grupo de genes codominantes

localizados no braço curto do cromossomo 6 humano. Os genes do sistema HLA têm sido didaticamente agrupados em três regiões: classe I, II e III de acordo com a sua estrutura e função na resposta imune (5-7). No campo do transplante, somente as classes I e II são relevantes.

A região de classe I engloba os *loci* HLA-A, -B e -C que codificam as moléculas clássicas de histocompatibilidade que estão expressas na superfície de todas as células nucleadas, inclusive células endoteliais. Estas são constituídas de uma cadeia pesada altamente polimórfica (α) de peso molecular equivalente a 45 kDa associada a uma cadeia leve, β 2-microglobulina não-polimórfica, de peso molecular igual a 12 kDa, codificada por um gene localizado no cromossomo humano 15 (8). Estão presentes em todas as células nucleadas do organismo e acomodam na sua fenda peptídeos com aproximadamente 9-11 resíduos de aminoácidos, oriundos de proteínas endógenas (vírus, proteínas citoplasmáticas). Os fragmentos peptídicos associados a moléculas de classe I são geralmente reconhecidos pelos linfócitos T CD8+ (9, 10).

Em contraste, a região de classe II composta pelos *loci* HLA-DR, -DQ e -DP, codificam as moléculas de histocompatibilidade que têm uma distribuição mais limitada. Estas moléculas estão expressas constitutivamente na superfície de células B, dendríticas (DCs) e células endoteliais microvasculares (esta última se aplica em humanos, mas não em ratos) e em outras células que dependem de estímulos ou ativação transcripcional para a expressarem (11). As moléculas HLA de classe II são constituídas por 2 cadeias, α e β de 31-34 kDa e 29-32 kDa,

respectivamente, sendo a cadeia beta a que mais contribui para o polimorfismo. Ao contrário das moléculas HLA de classe I, as extremidades da fenda de ligação de peptídeos nas moléculas de classe II são abertas, acomodando peptídeos que variam de 10 a 30 resíduos de aminoácidos que são derivados quase sempre de proteínas exógenas. Os fragmentos peptídicos associados a moléculas de classe II são geralmente reconhecidos pelos linfócitos T CD4+ (9, 10).

A região de classe III não codifica moléculas de histocompatibilidade, e sim outras moléculas, como os fatores de necrose tumoral, as proteínas C4, C2 e o fator B do sistema complemento, proteína de choque térmico e as enzimas 21-hidroxilase.

As moléculas HLA de classe I e II são extremamente polimórficas (mais de 1.600 alelos em humanos), ou seja, podem apresentar-se com várias configurações (seqüências de aminoácidos) diferentes. O polimorfismo desse sistema garante que o repertório antigênico de um indivíduo seja totalmente diferente de outro e permite o sistema imunológico reconhecer antígenos *self* e *non-self* (6).

O processo de rejeição mediado por anticorpos no transplante tem como principal alvo os antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) denominado HLA no homem. Essas moléculas estão presentes na superfície das células dos órgãos ou tecidos transplantados, e dessa forma, acessíveis ao sistema imune do receptor (12), participando diretamente no controle genético (13), das interações celulares e regulação da resposta imune.

1.2 Bases imunológicas da rejeição

O processo de reconhecimento de antígenos transplantados é conhecido como alorreconhecimento, e tem como evento central o reconhecimento do aloantígeno via MHC pelo receptor de célula T (TCR do inglês *T cell receptor*).

No contexto do transplante, células apresentadoras de antígenos (APCs do inglês, *antigen presenting cell*), tais como células dendríticas, podem sensibilizar células T alorreativas por três diferentes vias, não mutuamente exclusivas: direta, indireta e semi-direta. Na via direta de alorreconhecimento, as células T do receptor reconhecem o complexo MHC-peptídeo intacto na superfície das células APCs do doador (14, 15). Acredita-se que a via direta tem um importante papel durante a fase precoce da rejeição do enxerto, devido à presença de leucócitos “passageiros”, células sangüíneas que estariam de passagem no órgão transplantado e que apresentariam antígenos do doador deflagrando a resposta alo-específica.

Na via indireta de alorreconhecimento, as células T do receptor reconhecem peptídeos do doador processados e apresentados pelas APCs do receptor (16, 17). Recentemente, tem sido descrita a via semi-direta de alorreconhecimento, a qual consiste na transferência de moléculas MHC intactas das APCs do doador (células dendríticas são as mais descritas) para APCs do receptor. Esse mecanismo de transferência provavelmente envolve contato celular (18) e outros mecanismos também são implicados como liberação e captação de pequenas vesículas (exossomas) (19). Dessa

maneira, as APCs do receptor podem apresentar antígenos do doador diretamente a células T (20). O papel da via semi-direta de alorreconhecimento na rejeição clínica ainda é desconhecido (21).

O contato entre células APCs e linfócitos T requer dois sinais de estimulação para ativar a resposta imune. O primeiro sinal consiste no reconhecimento dos aloantígenos via complexo MHC-peptídeo presente na superfície das células apresentadoras de antígenos APC pelo receptor de células T do receptor. O segundo sinal (sinais co-estimulatórios), fundamental para sinalização celular, consiste na interação de moléculas acessórias presente nas APCs, tais como B7 (B7-1 e B7-2 que correspondem aos ligantes CD80 e CD86), CD40 e OX40L em células dendríticas, e seus respectivos ligantes na membrana das células T, CD28, CD40L e OX40 (22). As moléculas co-estimulatórias B7 e CD40 parecem ter um papel crucial nas respostas alorreativas. Trabalhos em camundongos e até primatas demonstram que o bloqueio das moléculas B7 e CD40 no momento do transplante previne a rejeição do aloenxerto e induz células T alorreativas a anergia (23, 24).

Uma vez que todo o processo de alo-reconhecimento e ativação celular foi estabelecido, os linfócitos T alo-reativos passam a desencadear os mecanismos efetores da resposta imune que levam a rejeição.

Didaticamente a resposta imune pode ser dividida em dois grupos: resposta imune celular e resposta imune humoral. A distinção entre processos humorais e celulares nem sempre são tão evidentes e, na maioria das rejeições, ambos os mecanismos parecem estar atuantes, podendo-se

identificar tanto agressão celular direta ao órgão como a presença de anticorpos dirigidos contra antígenos de superfície do enxerto (25).

Na resposta imune celular os linfócitos T CD8+ uma vez ativados adquirem atividade citotóxica podendo assim destruir as células-alvo do enxerto através de pelo menos duas vias descritas: a via da perforina/granzima e a via do sistema Fas/Fas-ligante (FasL). Qualquer via considerada, resulta na morte da célula alvo por apoptose (26, 27). Perforina/granzima são proteínas citolíticas que criam poros na membrana da célula alvo levando à morte por lise celular, essa via é o primeiro mecanismo utilizado por células CD8 e natural Killer (NK)(28). O Fas é uma proteína de superfície da família dos TNFs (fator de necrose tumoral inglês *Tumor Necrosis Factor*), constitutivamente expresso na superfície da maioria das células. A interação Fas/FasL ativa a cascata das caspases induzindo a apoptose da célula alvo (28).

A maioria das rejeições agudas é predominantemente causada por células devido à ação dos linfócitos T CD8+ citotóxicos e das células NK ou por reações de sensibilidade tardia, e são facilmente revertidas com tratamento imunossupressor clássico adequado (29).

Na resposta imune humoral a ativação dos linfócitos B e sua diferenciação em células secretoras de anticorpos é desencadeada pelo antígeno, e usualmente requer células T auxiliares CD4+. As células T podem promover a expansão clonal de células B de memória, *switch* de classe de anticorpos, afinidade e maturação por várias citocinas derivadas de células T e fatores co-estimulatórios que reconhecem receptores de

superfície das células B, tais como ICOS (co-estimulador induzido por células T), CD40L e CD80 e CD86. As células B se diferenciam em plasmócitos que migram para a medula óssea onde serão produzidos os anticorpos específicos (6, 30).

1.3 Rejeição mediada por anticorpos no transplante

A rejeição mediada por anticorpos, também chamada de rejeição humoral, foi primeiramente observada em pacientes que haviam recebido rins incompatíveis para o sistema ABO. Os enxertos eram freqüentemente perdidos por rejeição hiperaguda (31). Desta forma, os transplantes renais passaram a seguir as regras de compatibilidade de transfusão sangüínea, evitando-se assim este tipo de rejeição. Recentemente foram descritos casos de transplantes realizados com sucesso entre pares ABO incompatíveis e que receberam terapia para redução dos títulos de anticorpos pré-transplante. Mas, estes transplantes ainda não são habituais em nossos dias e são, classicamente, contra-indicados (32).

Depois do grupo sangüíneo ABO, os antígenos do sistema HLA são os principais alvos de respostas imunes aos órgãos transplantados. A produção de aloanticorpos HLA-específicos depende da exposição prévia a essas moléculas como na gravidez, transfusões sanguíneas ou transplantes prévios. A presença de anticorpos anti-HLA classe I do isotipo IgG contra os linfócitos do doador está associada com a perda imediata do enxerto (rejeição hiperaguda) (11). Com a introdução do método de

microlinfocitotoxicidade dependente de complemento (CDC), que consiste na detecção no soro do receptor de anticorpos pré-formados específicos para os antígenos HLA do doador, esse tipo de rejeição tornou-se uma complicação extremamente rara nos dias de hoje (33, 34).

Monteiro *et al.*, (1997), em um estudo cooperativo entre a Unidade de Transplante Renal do Hospital das Clínicas e o Laboratório de Imunologia do Transplante do InCor, analisando soros pré- e pós-transplante renal de 124 pacientes e ao avaliarem a relevância clínica da detecção de anticorpo anti-HLA isotipo IgG classe I pela técnica de ELISA demonstraram que a presença destes anticorpos é o principal fator de risco para diminuição da sobrevida do enxerto em 1 ano (35).

Outros estudos também analisaram a resposta humoral após o transplante renal e detectaram anticorpos anti-HLA antes da rejeição crônica ou da falência do enxerto sugerindo que os mesmos podem ser responsáveis pela disfunção do enxerto e que sua monitorização prospectiva pode ser um marcador precoce e não invasivo, ajudando no diagnóstico e na terapêutica precoce da rejeição (36) (37, 38).

O resultado positivo da prova cruzada era, antigamente, considerado como uma forte contra-indicação para realização do transplante. No entanto, ao longo dos anos, novas técnicas de prova cruzada foram aprimoradas no sentido de aumentar a sensibilidade do teste, bem como melhor caracterizar os alvos e os isotipos dos anticorpos encontrados no soro dos pacientes, tendo como consequência a possibilidade de se realizar com sucesso transplantes mesmo na presença de autoanticorpos e anticorpos anti-HLA

do isotipo IgM (39), já que esses anticorpos parecem não ser deletérios para o órgão transplantado.

A relevância clínica das rejeições mediadas por anticorpos ganhou muita atenção nos últimos anos. Com o desenvolvimento dos ensaios de fase sólida e da técnica de citometria de fluxo, a detecção dos anticorpos no pré e no pós-transplante renal levou à pesquisa dos riscos e das implicações destes anticorpos na evolução clínica do enxerto. Estes avanços tecnológicos combinados com o melhor entendimento da estrutura dos epítomos dos antígenos HLA tem resultado em uma maior eficiência para determinar a compatibilidade entre par doador-receptor (40).

A recente incorporação do marcador C4d na avaliação morfológica de enxertos renais está auxiliando no entendimento da rejeição no transplante renal. O C4d é um produto da degradação do fator C4 da via clássica do sistema complemento. A interação antígeno-anticorpo e a fixação de complemento ativa a via clássica do sistema, que culmina com degradação da molécula de C4 em C4d. O C4d liga-se covalentemente à superfície da célula endotelial do capilar peritubular e esta ligação, forte e estável, facilita a sua detecção por imunofluorescência indireta ou por imunoperoxidase, sendo, portanto, uma indicação indireta de resposta mediada por anticorpo em biópsia renal (41, 42).

Na Classificação de Banff 97 de 2001, critério universalmente aceito para classificação das rejeições, adotou-se uma subdivisão de rejeição aguda em “rejeição mediada por anticorpos (AHR)” e “rejeição celular aguda (ACR)” baseada na deposição de C4d (43). Sua deposição em

capilares peritubulares é preditiva da sobrevida do enxerto independentemente da lesão histológica encontrada e dos demais fatores prognósticos (44). Tem especificidade de 96% e sensibilidade de 95% quando associada à presença de anticorpos doador-específicos circulantes (45). A deposição de C4d pode estar associada à lesão ocasionada por anticorpos anti-HLA ou não-HLA (46-48). Existem alguns fatores de risco para deposição de C4d tais como: anticorpos pré-formados, re-transplantes, gestações, resistência ao tratamento anti-rejeição (47). O critério de Banff atualizado em 2001 para rejeição aguda mediada por anticorpo em enxertos renais inclui três fatores: (1) evidência morfológica do dano no tecido (2) evidência imunopatológica da ação mediada por anticorpos (deposição de C4d), (3) comprovação sorológica de anticorpos circulantes HLA doador-específicos ou contra antígenos endoteliais (anticorpo anti-endotélio) (43).

De acordo com a literatura, cerca de 5 a 8% de episódios de rejeições agudas tem componente humoral (são mediadas por anticorpos) e nem sempre são revertidas pela imunossupressão clássica, necessitando de tratamento diferenciado como globulinas anti-linfocíticas, associadas ou não, a plasmaferese. (44, 47, 49, 50).

1.4 Sistema de antígenos secundários no transplante

1.4.1 MICA

O gene MICA (do inglês *MHC class I chain-related protein A*) está localizado a 46,5 Kb centromérico ao gene HLA-B e codifica uma proteína de 383 resíduos de aminoácidos e 43 kDa (51). A expressão das moléculas MICA é induzida em situação de “stress” celular. Essas moléculas estão expressas em células endoteliais, epiteliais dentre outras células (52).

Anticorpos dirigidos ao sistema MICA têm sido implicados em casos de rejeições aos alotransplantes. Grosse-Wilde e colaboradores, estudando eluatos renais perdidos por rejeição mediada por anticorpos, verificou que 11/59 apresentavam anticorpos anti-MICA, sendo que em 5/11 era na ausência de anticorpos anti-HLA (53). Estudos indicam que a presença de anticorpos anti-MICA no pós-transplante está associada a baixa sobrevida do enxerto renal (54-57).

1.4.2 Sistema endotelial

Apesar da indiscutível importância do sistema HLA na evolução do transplante, o transplante renal ainda é confrontado com os problemas de rejeição imunológica, muito provavelmente por rejeição mediada por anticorpos. A constatação de que transplantes realizados entre pares doador-receptor HLA idênticos são também alvos de rejeições hiperagudas (58, 59), confirma que outros sistemas distintos do sistema HLA estão envolvidos (60-62).

Sabe-se que a célula endotelial vascular (VEC, *Vascular Endothelial Cell*) é o primeiro sítio de contato entre o órgão transplantado e o sistema imune do receptor. Essas células além de apresentarem antígenos presentes em outras células como os antígenos do sistema HLA e ABO, por exemplo, também apresentam em sua superfície antígenos que lhe são próprios (63, 64). Além disso, o endotélio vascular apresenta papel especialmente proeminente na regulação da permeabilidade das membranas celulares, no transporte lipídico, no tônus vasomotor, na coagulação, na fibrinólise, da inflamação e na sustentação da estrutura da parede vascular.

As células endoteliais (CE) respondem a citocinas tais como TNF ou IL-1, expressando novas proteínas em sua superfície celular ou aumentando a expressão das já existentes no estado basal. Expressam moléculas como CD40, CD58 (LFA-3), CD134L (OX40L) e ICOSL, que pode contribuir para ativação de linfócito T *in vitro* (65-67) e moléculas de adesão como selectina-E, selectina-P, moléculas de adesão celular aos vasos (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule-1*), moléculas de adesão leucócito-endotélio (ELAM-1, *endothelial leucocyte adhesion molecule-1*) e moléculas de adesão intercelular (ICAM-1 *intracellular adhesion molecule-1*) (68). A expressão das moléculas de adesão está associada ao processo de interação com os leucócitos (69). Apesar de não apresentar em sua superfície moléculas co-estimulatórias como CD80 e CD86, essas células podem atuar como células apresentadoras de antígenos semi-profissionais, por via direta, indireta e

semi-direta (67, 70), sendo capazes de ativar diretamente células T CD8⁺ (71).

A primeira demonstração dos AACE (anticorpos anticélula endotelial) foi associada a várias doenças autoimunes, incluindo Lupus Eritematoso Sistêmico, Esclerodermia, Granulomatose de Wegener, Doença de Kawasaki (72-74). Representam um heterogêneo grupo de anticorpos que são dirigidos contra uma variedade de determinantes antigênicos na superfície das células endoteliais (74).

Em 1977, Moraes e Stastny utilizando soros de pacientes que receberam enxerto renal, detectaram a presença de anticorpos para antígenos específicos presentes nas células endoteliais e monócitos (75). CERILI *et al.*, 1987, detectaram anticorpos anticélula endotelial (AACE) em 32 dos 40 pacientes que rejeitaram o enxerto, mesmo quando o transplante foi realizado entre irmãos HLA idênticos e com prova cruzada positiva para monócitos e negativa para linfócitos T e B, demonstrando que os linfócitos não expressam todos os antígenos implicados na rejeição de transplantes (58).

Posteriormente, ensaios de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) mostraram que as células endoteliais possuem sítios antigênicos não observados nos monócitos, para os quais eram produzidos anticorpos específicos (76). Isso foi confirmado no trabalho de (77), quando evidenciou a presença de AACE em pacientes que perderam o enxerto renal devido rejeição humoral. Os soros desses pacientes também foram testados por microlinfocitotoxicidade dependente de complemento contra um painel

de HUVECs (do inglês, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), bem como contra monócitos, linfócitos T e B. A reatividade foi específica apenas para células endoteliais, não sendo compartilhada com monócitos e linfócitos.

Em um outro estudo, desenvolvido em nosso laboratório Panajotopoulos *et al.*, 1999, através de provas-cruzadas utilizando soro do receptor e pele do doador foi detectada a presença de anticorpos, provavelmente antiendotélio, que se fixavam nos queratinócitos do doador. A presença destes anticorpos mostrou-se acuradamente preditiva da perda precoce do enxerto em pacientes que anteriormente rejeitaram um outro enxerto renal (39).

Em outro estudo mais recente, nosso grupo avaliou o envolvimento de anticorpos antiendotélio na perda do enxerto em 22 eluatos obtidos de rins nefrectomizados que foram perdidos por diferentes tipos de rejeição. As provas cruzadas (PCs) das amostras de soro pré-transplante, pré-nefrectomia, uma e duas semanas após a nefrectomia foram negativas, excluindo a presença de anticorpos anti-HLA contra o doador. Os eluatos foram testados contra um painel de células endoteliais (HUVECs). Em 8 casos foram detectados anticorpos do isótipo IgM, não citotóxicos, que se ligavam às células endoteliais, ativando-as como mostrou o aumento significativo da expressão das moléculas de adesão (VCAM-1, ELAM-1 e ICAM-1). Sete destes 8 eluatos eram obtidos de rins que sofreram rejeição vascular aguda (78).

RONDA (2006) detectou AACE em soros pré-rejeição de pacientes que sofreram rejeição humoral. Os eluatos obtidos dos rins nefrectomizados

tratados com IVIG (imunoglobulinas polivalentes) mostraram uma queda significativa da reatividade, restrita aos anticorpos IgG. Esses promissores resultados obtidos com a IVIG *in vitro*, indicam a importância que ela poderia ter no tratamento destas rejeições (79).

Os prováveis mecanismos de ação dos anticorpos não-HLA ainda não são bem descritos. A maioria das evidências hoje indicam que estes anticorpos não são líticos, e assim não podem ser detectados através de métodos de análise de citotoxicidade dependente de complemento, independente da fonte antigênica utilizada (80). Devido à falta de conhecimento dos prováveis mecanismos de ação desses anticorpos, não existe um ensaio padrão para detecção e compreensão satisfatória dos anticorpos não-HLA. O papel do marcador C4d nas rejeições humorais envolvendo os anticorpos anticélula endotelial é desconhecido, no entanto, alguns trabalhos sugerem que esses anticorpos não fixam complemento, portanto, não são detectados quando analisados pelo diagnóstico C4d (10) (78) (80).

A influência dos anticorpos não-HLA no destino do enxerto é ainda objeto de estudo. A célula endotelial, primeiro contato entre o enxerto e o receptor, tem sem dúvida um papel cuja importância espera melhor definição. Apesar do nosso laboratório em 10 anos estar realizando estudos na tentativa de identificação de aloantígenos específicos de endotélio envolvidos na rejeição, ainda assim, permanecem muitas perguntas sobre os sítios antigênicos reconhecidos pelos AACE. Foram utilizadas uma

variedade de técnicas para detecção desses sítios antigênicos, no entanto, até hoje não se obteve sucesso (81).

Dentro desse contexto recorreremos à técnica de imunofluorescência, para um melhor entendimento desse sistema. Estudos nessa área são necessários tanto para uma melhor abordagem no transplante quanto para um melhor entendimento do processo de rejeição.

Com base nessas considerações, esse trabalho visa identificar as estruturas reconhecidas pelos anticorpos não-HLA. Isso permitirá restringir uma área renal específica para posterior caracterização dos antígenos alvos reconhecidos por esses anticorpos envolvidos no processo de rejeição dos transplantes. Uma vez determinado o sítio antigênico alvo destes anticorpos, facilitaria o entendimento dos mecanismos de ação. A elaboração de metodologias mais confiáveis para detecção destes anticorpos seria de grande importância para definição de estratégias de prevenção e tratamento das rejeições causadas por estes anticorpos.

Utilizando a técnica de imunofluorescência, eluatos de rins nefrectomizados devido rejeição irreversível serão testados em cortes histológicos de rim sadio, possibilitando verificar quais são as estruturas que os anticorpos não-HLA presentes nos eluatos são capazes de reconhecer. Outro objetivo é avaliar o comportamento, com relação à ligação nas estruturas, dos anticorpos do isotipo IgM e IgG. Com a marcação das células endoteliais, iremos identificar se tais anticorpos compartilham os mesmos epítomos com outras células ou se são específicos, bem como se são anticorpos anti-MICA, esta última avaliada pela técnica de LUMINEX.

Acreditamos que esses resultados impulsionarão os estudos dos anticorpos não-HLA, já que será possível se trabalhar com uma região específica do alvo desses anticorpos, bem como, entender se o anticorpo que estudamos se trata de 1 só anticorpo ou se são vários anticorpos não-HLA atuando na rejeição.

Objetivos

2. OBJETIVO

2.1 Geral

Pesquisar quais estruturas renais são reconhecidas pelos AACE presentes nos eluatos renais de pacientes com rejeição mediada por anticorpos não-HLA

2.2 Específicos

- ❖ Verificar os possíveis alvos antigênicos na estrutura específica do rim reconhecida pelos AACE
- ❖ Caracterizar o isotipo dos anticorpos que reconhecem as estruturas

Métodos

3. MÉTODOS

3.1 Pacientes

Foram estudados 13 pacientes transplantados renais da Unidade de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (UTR-HC/FMUSP). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) sob o nº 854/06.

Dos 13 pacientes estudados, 11 foram nefrectomizados por apresentarem rejeição do tipo irreversível e 2 por trombose de veia renal. Dez pacientes receberam rins de doadores falecidos, 1 de doador vivo não-parente e 2 de doadores vivos parentes, sendo 1 de irmão HLA idêntico. Em 8 casos tratou-se de primeiro transplante e em 5 de re-transplantes. Os dados clínicos e características dos pacientes estão descritos no Anexo 1.

3.2 Obtenção de amostras biológicas

3.2.1. Fragmentos de baço ou linfonodo

Para obtenção das células de doadores falecidos, como procedimento de rotina, o laboratório recebe fragmentos de baço ou linfonodos mantidos em solução salina (NaCl 0,9%) de doadores falecidos, para posterior obtenção das células mononucleares. Essas células ficam estocadas em tubos de nitrogênio líquido.

3.2.2. Fragmentos renais

Os fragmentos de rins nefrectomizados foram coletados no ato cirúrgico, colocados em solução salina (NaCl 0,9%) e enviados ao laboratório. Posteriormente foram envolvidos em filme plástico e armazenados a -40°C.

3.2.3. Sangue periférico

No caso de doador vivo, foram coletados 40 ml de sangue periférico através da punção venosa. Neste procedimento foram utilizados tubos Vacutainer sem anticoagulante (Becton Dickson & Co, Montainview, CA, EUA) para obtenção do soro (10 ml) e tubos Vacutainer com anticoagulante heparina sódica numa concentração de 50 UI/ml (Liquemine, Roche, SP) para obtenção das células mononucleares (30 ml).

3.3 Análise histopatológica

As análises histopatológicas das biópsias renais, foram realizadas no Departamento de Patologia-HC-FMUSP. Foram analisadas 11 biópsias renais, sendo 3 de biópsia percutânea e 8 de rins nefrectomizados: todos os pacientes estavam em uso de imunossupressor até o momento da nefrectomia. As biópsias foram incluídas em bloco de parafina os quais foram cortados em micrótomo (3 μ) fixadas em lâminas e posteriormente corada com Hematoxina-Eosina, Tricrômio de Masson, ácido periódico de

Schiff (PAS) e PAMS (prata metenamina). O diagnóstico foi estabelecido de acordo com a classificação de Banff (Tabela 1).

Das 12 biópsias renais reclassificadas, 5 foram de biópsias percutânea e 7 de rins nefrectomizados. Nas biópsias percutâneas, 1 caso foi diagnosticado como Banff IIA, 1 como Banff III, 2 como trombose de veia renal e em 1 caso não foi possível a classificação devido a extensa necrose do parênquima.. Nas biópsias de rins nefrectomizados, 2 casos também não foram classificados devido a necrose total do parênquima, 3 foram classificados como Banff III, 1 como Banff IIB e 1 como rejeição crônica II (CAN II, Chronic Allograft Nephropathy II) (Tabela 2). Em 1 caso não foi possível obter o resultado da análise histopatológica, por esta ter sido realizada em outro centro.

Tabela 1. Análise histopatológica das biópsias renais

Pacientes	Classificação prévia	Classificação Banff 97
1	RH	NC
2	RV	Banff IIA**
3	RH	Banff III*
4	RV	Banff IIB*
5	RV	CAN II*
6	RH	(...)
7	RH	NC
8	RH	Banff III**
9	FT	Banff III*
10	RH	Banff III*
11	RH	NC
12	FT	FT

RH: rejeição humoral; RV:rejeição vascular; NC: não classificado devido a necrose do parênquima; FT: falha técnica devido a trombose de veia renal; (...): não avaliado ; *Rins nefrectomizados; **Biópsia Percutânea

3.4 Obtenção dos eluatos renais

Os eluatos foram obtidos a partir do tratamento de rins nefrectomizados, com acetato de sódio 0.05M (pH=3.2), conforme o procedimento descrito por Claas *et al.*, (1980) (82).

Inicialmente os fragmentos de rim foram descongelados diretamente em PBS. Posteriormente foram cortados em fragmentos ainda menores, sempre em banho de gelo, para que fosse evitada a lise celular. Esses fragmentos foram colocados em um frasco tipo becker, cobertos com PBS e mantidos sob homogeneização à 4°C, *overnight*, com troca de solução de

PBS até que o sobrenadante ficasse totalmente límpido. O sobrenadante foi então retirado e os fragmentos foram ressuspensos em novo PBS. Em seguida, os fragmentos foram triturados em um homogenizador de tecido (Biohomogenizer Biospec), resultando em uma suspensão que foi centrifugada sob refrigeração, 4°C, a 10000 rpm durante 20 minutos, por 3 vezes. Ao final da última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em solução de acetato de sódio por uma hora a 37°C, sob agitação constante, para que fosse desfeita a ligação antígeno-anticorpo, e o anticorpo ficasse livre. Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 20 minutos a 10000 rpm sob refrigeração a 4°C. O pH do sobrenadante (eluato) foi ajustado para 7-7.4 e foi adicionada azida sódica (0,02% final). Os eluatos foram filtrados em filtros millipore de 0.45 μ e 0.22 μ , aliquotados em frascos de 1 a 3 ml e congelados em freezer -40°C. Após congelamento, os eluatos foram liofilizados *overnight* no equipamento Thermo Savant Modulyod.

Os eluatos liofilizados foram ressuspenso em 15 ml de água destilada e dialisados em sacos de 25X16mm em água destilada com volume 200 vezes maior que a amostra, por 2 horas, com trocas de água a cada 30 minutos. Os eluatos foram distribuídos em frascos de 5 ml, congelados e liofilizados novamente *overnight*. Foram então ressuspenso em um volume mínimo de 500 μ l de PBS, para posterior avaliação da concentração protéica e pesquisa de anticorpos anticélula endotelial.

3.5 Dosagem de proteínas totais nos eluatos

Após ressuspensão em PBS o eluato foi diluído 1/1000 em água destilada e a concentração de proteínas totais foram determinadas através da leitura da absorbância em 280 nm, em espectrofotômetro (Beckman). A concentração foi então ajustada para 15 mg/ml. Dados da literatura mostram que este valor corresponde à concentração média de imunoglobulina presente nos soros dos indivíduos saudáveis (83).

3.6 Dosagem de IgG e IgM totais nos eluatos

Para quantificação de imunoglobulinas foi utilizado o método de ELISA utilizando-se placas de 96 poços de alta afinidade (Costar Cambridge, MA, EUA). Foram adicionados 100µl do anticorpo de captura por poço (10ug/ml em no tampão Carbonato de Sódio 0,1M; pH 9,0) e seguindo-se com incubação *overnight* a 4°C.

Em seguida a placa foi lavada por 3x com 100µl de tampão de lavagem (PBS + 0,05% Tween-20). Para bloqueio foi adicionado 200µl do tampão de lavagem + 3% gelatina, por poço. A placa foi então incubada por 2 horas em estufa a 37°C, seguindo-se com mais 3 lavagens. 200µl das amostras de soros já diluídas (1:100 em tampão PBS + 0,05% Tween-20) foram então adicionadas nos respectivos poços. Foram também adicionados 100µl dos soros-padrão nos poços A1 e A2. A placa foi novamente incubada por 2 horas em estufa a 37°C. Após esta incubação as placas foram lavadas por 5 vezes com 100µl do tampão de lavagem. Foram adicionados 100µl dos

anticorpos de detecção IgG (biotinilado) e IgM (conjugado com peroxidase), previamente diluídos em tampão de lavagem (IgG 1:20 e IgM 1:1000). Incubou-se por 1 hora em estufa a 37°C; e seguiu-se com lavagem da placa por 5 vezes com tampão de lavagem. Apenas nos poços de pesquisa de IgG foi adicionado 100µl do conjugado (estreptoavidina-HRP) 1:1000 em PBS 1x, seguindo-se de incubação por 1 hora em temperatura ambiente e lavagem da placa por mais 5 vezes com tampão de lavagem. O substrato foi então diluído 1:1 (solução A e solução B) e 100µl foram adicionados por poço seguido de incubação por no máximo 30 minutos. A reação foi então parada com a adição de 50µl de ácido fosfórico 1M. As leituras das absorbâncias foram realizadas em leitora de ELISA (SpectraMax 190, Molecular Devices, Mountain View, CA, EUA) em 450nm e os resultados analisados no programa SOFTmaxPro.

3.7 Separação de linfócitos totais a partir de sangue periférico

As células mononucleares (PBMC) dos doadores vivos foram obtidas através de gradiente de Ficoll-Hypaque. O sangue coletado com heparina foi diluído 1:2 em solução salina e cada 10 ml de sangue diluído foi colocado sobre 3 ml de solução Ficoll-Hypaque (d=1,077) para obtenção das células mononucleares (84). Após centrifugação a 2000 rpm por 30 minutos, o anel de células foi retirado e lavado 2 vezes a 1500 rpm por 10 minutos, para total remoção de Ficoll-Hypaque. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado por inversão, e o botão celular foi ressuspensionado em 2 ml de RPMI (Sigma,

Steinhein, Alemanha Chemical, ST. Louis, MO, EUA) e transferido para 2 tubos Fisher.

Para eliminação das plaquetas existentes na suspensão celular foi acrescentado 20 µl de trombina (Biomérieux Brasil SA) numa concentração de 100 unidades/ml, em cada tubo fisher. Após agitação dos tubos para a formação de grumos (aproximadamente 30 segundos) os tubos foram centrifugados a 1000 g por 3 segundos. Em seguida, o sobrenadante foi recolhido em novo tubo fisher e lavado duas vezes, através de centrifugação por 1 minuto a 1000 g. O pellet de células foi ressuspenso em volume conhecido e as células foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração de 3×10^6 células /ml.

3.8 Separação de linfócitos T e B

Foram utilizados linfócitos totais de PBMC de doadores vivos ou linfócitos totais provenientes de células congeladas de baço ou linfonodo de doadores falecidos. Para a separação de linfócitos T e B foi utilizada a técnica baseada na aderência de linfócitos B ao nylon, segundo Danilovs *et al.*, (1979)(85).

Foram colocados 150 mg de nylon (Robbins Scientific) em tubo de plástico de 15 ml, sem empacotar no fundo do tubo. Foram preparados 50 ml de RPMI a 5% de SFB e 10 ml deste meio foi adicionado ao tubo contendo o nylon. Em seguida, este foi agitado por inversão para garantir a penetração do meio no nylon e colocado em banho-maria a 37°C por 30 minutos para sensibilização do nylon. Após este período, foi introduzida uma pequena

vareta de madeira até o fundo do tubo e com movimentos circulares foi preparado um cotonete. Ao mesmo foi adicionado 1 ml de linfócitos totais na concentração de $15\text{-}20 \times 10^6$ com o auxílio da pipeta pasteur (gota a gota). O cotonete foi colocado em um tubo plástico de 15 ml seco o qual foi vedado com filme plástico para evitar evaporação. Em seguida ele foi incubado por 30 minutos em estufa a 37°C e, em paralelo, foram incubados 40 ml de RPMI 5% e 10 ml de RPMI 10% de SFB na mesma temperatura. Com auxílio de pipeta Pasteur o cotonete foi então lavado com RPMI 5% (40 ml) rodando-o para que toda a sua superfície fosse abrangida. Desta maneira, os linfócitos T foram coletados em 2 tubos rotulados T1 e T2. Em seguida, o cotonete foi colocado no tubo contendo RPMI 10% e foram realizados movimentos circulares para cima e para baixo, para que os linfócitos B aderidos na lã de nylon fossem liberados. Os tubos T1, contendo células T, e o tubo contendo células B foram centrifugados a 1800 rpm por 10 minutos. A concentração celular foi então ajustada para $2,5$ a $3,0 \times 10^6/\text{ml}$, para posterior plaqueamento.

3.9 Tratamento do soro com ditioneitol (DTT)

Os soros dos pacientes foram tratados com DTT, agente redutor de IgM, com o objetivo de identificar o isotipo da imunoglobulina (IgG e/ou IgM). Para isto, 180 μl do soro foram adicionados à 20 μl de DTT (5mM final) seguindo-se de incubação durante 30 minutos a 37°C , sob agitação a cada 5 minutos. Estes soros foram posteriormente utilizados nos testes de citotoxicidade dependente de complemento.

3.10 Prova-cruzada contra linfócitos T e B

O *crossmatch* ou prova-cruzada é o exame realizado para detectar a presença de anticorpos pré-formados específicos contra antígenos do doador. Pode-se dizer que é uma simulação do transplante. Para o teste de detecção de anticorpos anti-HLA utilizamos o método de citotoxicidade dependente de complemento (CDC) (86), utilizando-se placa tipo Terasaki (72 poços), recoberta com 5 µl de óleo mineral (Nujol), para evitar o ressecamento dos soros. As placas foram montadas com auxílio de seringa Hamilton, da seguinte forma: 1 µl do controle negativo (pool de soros coletados de indivíduos sadios do sexo masculino e previamente testado para citotoxicidade), 1 µl do controle positivo (pool de soros de pacientes altamente sensibilizados contra antígenos HLA), 1 e 2 µl do soro do paciente puro, 1 µl diluído ¼ com RPMI, 1 µl e 2 µl tratado com DTT, sendo todos em triplicata. Em seguida, 1 µl da suspensão celular (linfócitos T e B) na concentração de $3,0 \times 10^6$ células/ml dos seus potenciais doadores foram adicionados, seguindo-se com incubação por 30 minutos à T⁰A (temperatura ambiente) para a placa com células T e 60 minutos para células B.

Em seguida, foram adicionados 5 µl de complemento de coelho puro (One Lambda, Kittridge, Canoga, USA), previamente testado para citotoxicidade inespecífica, seguindo-se com nova incubação de 1:30h para ambas as placas (linfócitos T e B). Em seguida, foram adicionados 10 µl/orifício da solução corante vital-fixadora ("Stain-Fix", One Lambda,

Kittridge, Canoga, USA). Foi colocada então a lamínula sobre a placa e após 10-20 minutos foi realizada a leitura em microscópio ótico.

A presença de lise celular é o resultado da ativação do sistema complemento devido a ligação do anticorpo anti-HLA ao antígeno de histocompatibilidade presente na membrana celular, sendo o corante vital utilizado para diferenciação das células vivas das mortas.

A análise do teste de citotoxicidade foi feita por avaliação da porcentagem de lise celular e foi expressa por *score* (índice) de lise celular, comparada ao controle negativo (controle de morte inespecífica) e ao controle positivo (atividade do complemento) da reação.

Scores avaliados:

Score 1: 0 a 10% de lise celular (negativo)

Score 2: 11% a 20% de lise celular (negativo duvidoso)

Score 4: 21% a 50% de lise celular (positivo fraco)

Score 6: 51% a 80% de lise celular (positivo)

Score 8: 81% a 100% de lise celular (fortemente positivo)

3.11 Prova-cruzada contra linfócitos T com antiglobulina humana (AGH)

Da mesma forma que a prova cruzada T e B, foi montada uma placa para o teste com antiglobulina humana (AGH). Foi adicionado 1 µl de suspensão de linfócitos T (3×10^6 células/ml) do seu potencial doador e a

placa foi incubada por 30 minutos à T⁰A. Em seguida, foi lavada por 3 vezes com 5 µl de RPMI 10% SFB em T⁰A através de inversão rápida, com intervalos de 10 minutos entre cada lavagem, para remoção do RPMI. Após as lavagens foi adicionado 1µl da AGH (1/100 em RPMI) seguindo-se de incubação por 2 minutos em T⁰A. Foram acrescentados 5 µl de complemento de coelho e incubados em T⁰A por 1:30 h. Em seguida, foram adicionados 5 µl do reagente Stain-Fix^{TM} e colocado uma lamínula sobre a placa e após 10-20 minutos foi realizada a leitura em microscópio ótico.

A análise do teste de citotoxicidade foi baseada na porcentagem de lise celular, como descrito no item 3.10.

3.12 Reatividade contra Pannel (PRA)

Foram realizados testes de PRA nas amostras de soros pré-transplante, pré-rejeição e pós-nefrectomia absorvidos com *pool* de plaquetas bem como nos eluatos.

A técnica utilizada foi o ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), utilizando antígenos HLA purificados e aderidos às placas de Terasaki manufaturadas e que são alvos para ligação de anticorpos presentes no soro do paciente. Foi utilizado o Kit comercial LAT^{TM} 1240 (One Lambda, Kittridge, Canoga, USA) que apresenta um painel de antígenos HLA com especificidades selecionadas aderidos à placa, sendo 28 antígenos HLA de classe I e 12 antígenos HLA de classe II, e que permite definir a porcentagem de reatividade e a especificidade antigênica do anticorpo.

Foram incubados 10µl/poço dos respectivos soros do paciente e do eluato, soros negativo e positivo do teste incluídos no kit, durante 60 minutos à T⁰A. Após lavagem da placa com tampão de lavagem, foram adicionados 10µl/poço de anticorpo anti-IgG humano conjugado com fosfatase alcalina. Após incubação de 40 minutos em T⁰A a lavagem foi repetida por 2 vezes e, em seguida, foram adicionados 10µl/poço de substrato enzimático calorimétrico: BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato) (Blue Phos^{TM} componentes A e B da KPL) que foi incubado a 37° C por 10 a 15 minutos. Finalmente, foram adicionados 5µl/poço de solução bloqueadora. A leitura do teste foi realizada pelo leitor Bio-Tek ELX-800 (Bio-Tek Instruments, VT) no comprimento de onda de 630 nm e os resultados analisados pelo programa (software) LAT para Windows (One Lambda). O resultado foi dado em porcentagem de reatividade e especificidade do antígeno HLA.

3.13 Células da Linhagem Eahy.926

A linhagem EAHy.926 é um hibridoma resultante da fusão de HUVEC (do inglês, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) com célula epitelial tumoral A549 (87) cedida, gentilmente, pelo Prof. Dr. Dennis Glotz do Service de Néphrologie et Transplantation, Hospital Saint-Louis, Paris, França. A linhagem foi mantida em cultura com meio DMEM (*Life Technologies*) suplementado com 150U/ml penicilina/estreptomicina, 2mM L-glutamine, 10% SFB, 4500mg/l glicose (*Life Technologies*) and 0.04% HAT suplemento (*Life Technologies*), em garrafas de 250 ml, até atingir a

confluência. O meio foi trocado a cada 3-4 dias, quando as células foram então submetidas à tripsinização.

Para este procedimento as células foram inicialmente lavadas com solução de Hanks sem cálcio e magnésio e em seguida foram adicionados 5 ml de solução de tripsina (0,1% em EDTA 0,02%). Após o descolamento celular (1 a 2 minutos), foram adicionados imediatamente 10 ml de DMEM com 10% de SFB. A suspensão celular foi recolhida em tubo de 15 ml e centrifugada por 10 minutos a 1800 rpm. O botão celular foi então ressuspenso em 5 ml de DMEM com 10% de SFB e a concentração celular foi ajustada para 1×10^6 células/ml e colocadas em novas garrafas para crescimento. Após 2 repiques as células foram utilizadas nos diversos ensaios ou congeladas para uso posterior. A linhagem EAHy.926 foi utilizada em prova cruzada por citometria de fluxo para pesquisa de anticorpos anti-célula endotelial.

3.14 Pesquisa de anticorpos anti-célula endotelial

A pesquisa de anticorpos anti-célula endotelial foi realizada por imunofluorescência indireta e analisada por citômetro de fluxo.

3.14.1 Em indivíduos saudáveis

Inicialmente foram analisadas 15 amostras de soros de indivíduos saudáveis quanto à presença de anticorpos IgG e IgM anti-célula endotelial para definição de um padrão negativo de reatividade (controle negativo).

Em placa de 96 poços com fundos em U (Becton, Dickinson and Company), foram distribuídas 3×10^5 células/poço (linhagens EAHy.926 e HEp-2) para teste com anticorpo anti-IgG e anti-IgM. As placas foram centrifugadas a 1800 rpm durante 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram desprezados e os botões celulares homogeneizados em um agitador de placas. Em seguida, as células foram incubadas com 25 µl de cada um dos soros dos indivíduos saudáveis e com 25 µl do controle positivo (*pool* de soros de pacientes altamente sensibilizados para antígenos HLA), por 30 minutos a 25°C. Em seguida, as células foram lavadas por 3 vezes com tampão FACS à 1800 rpm por 5 minutos. Posteriormente, foi realizada uma segunda incubação das células com conjugado anti-IgG humano (Sigma, ST.Louis. MO, USA) marcado com Isotiocianato de fluoresceína-FITC) (1/50) diluído com tampão FACS ou conjugado anti-IgM marcado com ficoeritrina - PE (Sigma, ST.Louis. MO, USA) (1/25), por 30 minutos a 4°C, no escuro. Foram realizadas mais 3 lavagens com tampão FACS e, em seguida, as linhagens foram ressuspensas em 400 µl de tampão FACS e transferidas para tubos de 5 ml (poliestireno). Foram adquiridas 10.000 células para cada amostra na região de interesse (endoteliais) e analisada MIF.

Foi então calculada a média das medianas de intensidade de fluorescência das 15 amostras mais 2 desvios-padrão, tanto para anticorpo do isotipo IgG quanto para anticorpo do isotipo IgM. Os valores obtidos foram considerados como valor de corte e *pool* destes 15 soros foi posteriormente utilizado como controle negativo para as amostras de soros de pacientes e eluatos.

3.14.2 Em eluatos renais

Foram utilizados os eluatos previamente estudados para a presença de anticorpos anti-HLA (negativos). A linhagem EAHy.926 foi utilizada como fonte antigênica para a pesquisa de AACE.

Da mesma forma que para o estudo em indivíduos saudáveis, foi utilizada placa de 96 poços com fundos em U (Becton, Dickinson and Company), onde foram distribuídas 3×10^5 células/poço (linhagens EAHy.926). As placas foram centrifugadas a 1800 rpm durante 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram desprezados e os botões celulares homogeneizados em um agitador de placas. Em seguida, as células foram incubadas com 25 µl de cada eluato, controle negativo (*pool* das 15 amostras de soros de indivíduos saudáveis) e controle positivo (*pool* de soros de pacientes altamente sensibilizados para antígenos HLA), por 30 minutos a 25°C. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com tampão FACS 1800 rpm por 5 minutos. Posteriormente, foi realizada uma segunda incubação das células com conjugado anti-IgG humano (1/50) diluído em tampão FACS marcado com Isotiocianato de fluoresceína (FITC) e conjugado anti-IgM (1/25) marcado com ficoeritrina (PE), por 30 minutos a 4°C, no escuro. Foram realizadas mais 3 lavagens com tampão FACS e, em seguida, as linhagens foram ressuspensas em 400 µl de tampão FACS e transferidas para tubos de 5 ml (poliestireno). Foram adquiridas 10.000 células para cada amostra nas regiões de interesse (endoteliais) e analisadas em MIF.

Foram consideradas positivas as amostras de eluatos com valores de MIF acima do controle negativo.

3.15 Imunofluorescência

3.15.1 Obtenção dos tecidos renais saudáveis

Foram utilizadas amostras de tecidos renais saudáveis sendo: 1 amostra de rim nefrectomizado por trombose (perda por causa não imunológica), 3 biópsias de doadores ambas provenientes da Unidade de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (UTR-FMUSP), 2 necrópsias obtidas de indivíduos que faleceram tendo como causa infarto do miocárdio, na Divisão de Anatomia Patológica do Instituto do Coração – InCor. Quando obtidos, os fragmentos eram mantidos solução salina (NaCl 0,9%).

3.15.2 Congelamento dos tecidos renais saudáveis

Para manter a integridade do tecido renal, os fragmentos foram fixados em Tissue Teck para serem criopreservados. Os fragmentos foram imersos em meio Tissue Tek em blocos, estes foram resfriados em isopentano e congelados em nitrogênio líquido. Após o congelamento, os fragmentos foram mantidos no freezer a -80°C.

3.15.3 Padronização da imunofluorescência

3.15.3.1 Titulação dos anticorpos secundários IgG conjugada com FITC e IgM R-PE

Para a escolha da diluição do antissoro de cabra anti-IgG humana marcada com FITC, foi utilizado o conjugado não diluído (1:1), diluído 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:100 em PBS/BSA 2,5%. O mesmo foi feito para escolha da diluição do antissoro de cabra anti-IgM humana marcada com R-PE. As diluições foram avaliadas em cortes histológicos de coração utilizados na Divisão de Anatomia Patológica do Instituto do Coração – InCor que sabidamente expressam antígenos IgG e IgM,

3.15.3.2 Controle positivo

Uma vez que estamos estudando um sistema antigênico desconhecido, partimos para a obtenção de controles que são utilizados para pesquisa de anticorpos anti-HLA, ou seja, pacientes hipersensibilizados para anticorpos anti-HLA que sabidamente teriam que reagir com os fragmentos renais já que todas as células expressam HLA classe I. Foram analisadas 10 amostras de soros de pacientes hipersensibilizados para anticorpo anti-HLA, com PRA 100%.

A reatividade dos soros foi avaliada através do teste de CDC, contra um painel de 5 células linfocitárias obtidas de doadores. Foram utilizados soros não diluídos (1:1) e diluições seriadas até 1:32. Não conhecendo a sensibilidade da técnica de imunofluorescência indireta, foi escolhido o teste de CDC-NIH-standard por ser a técnica menos sensível entre aquelas utilizadas para detecção de anticorpos. Um *pool* desses 10 soros foi posteriormente utilizado como controle positivo para as amostras de eluatos.

3.15.3.3 Controle negativo

Para definição do controle negativo foi utilizado:

- Um eluato proveniente de enxerto renal perdido por trombose de veia que não reagiu tanto com antígenos endoteliais quanto HLA, cujo enxerto sofreu todo o procedimento cirúrgico no entanto sua rejeição não teve um componente humoral.
- um *pool* de soros de indivíduos sadios.

As amostras (controle negativo) foram utilizadas não diluídas.

3.15.3.4 Imunofluorescência para detecção de estrutura(s) renal(s) reconhecida(s) por anticorpos não-HLA presentes nos eluatos

Para o teste de detecção das estruturas renais reconhecidas por anticorpos não-HLA foi utilizado o método de imunofluorescência indireta. Cortes de 6 tecidos renais saudáveis foram feitos no criostato a -20°C com 4µm de espessura e colocados sobre lâmina contendo adesivo e mantidos no freezer -80°C. As lâminas foram lavadas três vezes durante 20 minutos em solução tampão fosfato (pH 7,4) e bloqueadas com PBS/BSA 2,5% por 1h para evitar ligação inespecífica dos anticorpos com componentes celulares. Os anticorpos primários foram colocados sendo que no controle positivo foi utilizado um pool de 5 soros oriundos de pacientes hipersensibilizados para antígenos HLA. Utilizamos como controle negativo 3 lâminas: 1 apenas bloqueando o corte com PBS/BSA 2,5% (Vector), 1 utilizando soro de indivíduo saudável e 1 utilizando eluato de rim perdido por trombose de veia. As lâminas testes receberam os eluatos não diluídos e

nas seguintes diluições: 1:5, 1:10 e 1:25 em PBS/BSA 2,5%, incubou-se por 1 hora. Em seguida as lâminas foram lavadas três vezes por 20 minutos. Todas as incubações foram realizadas em temperatura ambiente. A partir da incubação dos anticorpos secundários os procedimentos passaram a ser realizados no escuro. Os anticorpos secundários IgG conjugado com isotiocianato de fluoresceína – FITC na concentração de 1:40 foram utilizados nessa terceira incubação por 1 hora em câmara úmida no escuro em temperatura ambiente, enquanto que o anticorpo secundário IgM conjugada com R-Phycoeritrina - RPE (DAKO) foi utilizada na concentração de 1:20 e a incubação foi over-night à 40C. Por último as lâminas foram incubadas com DAPI (marcador de núcleo) por 15 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas e montadas fixando as lamínulas com glicerina e selando-as com esmalte.

Para os ensaios de colocalização, foram utilizados os mesmos procedimentos, no entanto, os anticorpos secundários IgG FITC e IgM RPE, foram incubados na mesma lâmina, obedecendo os tempos de incubação de cada um.

A leitura das lâminas foi feita em um microscópio da Zeiss (Axion 200), em um comprimento de onda de 488 nm para análise dos testes utilizando o fluorocromo FITC e 543 nm para análise dos testes utilizando o fluorocromo R-PE. A intensidade de fluorescência observada foi assinalada da seguinte maneira: **3+** (reação positiva forte), **2+** (reação positiva), **1+** (reação positiva fraca), - (reação negativa).

Desenho esquemático:

Imunofluorescência indireta

3.15.3.5 Marcação CD31

A molécula CD31 , ou PECAM, está expressa em células endoteliais. Para realização do ensaio de colocalização utilizando o anti-CD31 (Sigma, ST.Louis. MO, USA), o anticorpo foi incubado simultaneamente com os anticorpos secundários IgG FITC ou IgM RPE na mesma lâmina e com os mesmos tempos de incubações, sendo que o fluorocromo do anti-CD31 variava de acordo com o teste. Para o teste com o IgG FITC, foi utilizado CD31 conjugado com RPE e para o teste com IgM PE foi feito a marcação com CD31 FITC.

3.16 Pesquisa anticorpo anti-MICA

Para detecção de anticorpos anti-MICA nos eluatos de rins com perda irreversível, foi utilizado o kit LBScreen Mixed LSM12 (One-Lambda), empregando a tecnologia Luminex.

Esta tecnologia consiste em um sistema de multi-análise que trabalha com um conjunto de microesferas codificadas por cores que representam diferentes comprimentos de onda, as quais são analisadas em um avançado Citômetro de Fluxo (LABScan^{TM}100). As microesferas codificadas por uma determinada cor contêm em sua superfície apenas oligonucleotídeos-sonda de mesma sequência, no nosso caso MICA, sendo assim, diferentes microesferas podem ser trabalhadas em um único tubo.

O teste foi realizado em placas de 96 wells. Foi utilizado um soro controle negativo para se estabelecer os critérios de fundo. Incubou-se 5ul de esferas (previamente homogeneizadas) com 20ul de eluato renal, durante 30', no escuro, em T^oA (20-25°C). Foi adicionado 150ul de tampão de lavagem 1x. A placa foi selada e centrifugada a 1300g por 5'. O tampão foi removido e foi adicionado 200ul para nova centrifugação. Repetiu-se esta última lavagem por mais 2 vezes. Adicionar 100ul do conjugado de IgG de cabra anti-humano PE 1x (diluído 1ul do IgG100x + 99ul de tampão de lavagem). Incubar 30' no escuro, T^oA, agitando suavemente. Centrifugou-se 1300g por 5' remover o sobrenadante com movimento rápido. As lavagens foram repetidas com tampão de lavagem. Foi adicionado 80ul de PBS 1X na placa, esta foi coberta com uma película selante e foi agitada no vórtex.

Posteriormente, as placas foram lidas no Citômetro de Fluxo (LABScan^{TM}100).

Para análise dos dados configurou-se o LABScreem^{TM}100 para aquisição e calibração das amostras de acordo com o Manual do Luminex.

Relação de fluorescência para grupo de alelos (Mixed):

$$\text{Background normalizado} = \frac{\text{esfera S\#N} - \text{esfera SCN}}{\text{BG\#N} - \text{BGNC}}$$

S#N = valor da amostra de soro para a esfera #N

Esfera SCN= valor da amostra de soro para a esfera negativa (sem antígeno)

BG#N =valor de fluorescência do soro CN na esfera #N (*background* do CN)

esfera BGNC = valor de fluorescência do soro CN na esfera negativa (sem antígeno)

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação Imunológica

A avaliação dos dados imunológicos pré-transplante dos 13 pacientes selecionados, foi realizada no Laboratório de Imunologia, InCor, HCFMUSP, como parte da rotina laboratorial para pacientes em fila de espera para transplante da Unidade de Transplante Renal (UTR)-HCFMUSP.

As amostras de soros dos pacientes foram submetidos a pesquisa de anticorpos contra os antígenos HLA de seu provável doador através de prova-cruzada contra linfócitos T, T + AGH e linfócitos B, utilizando soro com e sem tratamento com DTT, para distinção do isotipo dos anticorpos (IgG e IgM). Todas as provas-cruzadas resultaram negativas e os pacientes foram posteriormente transplantados.

4.2 Dosagem de proteínas e imunoglobulinas IgG e IgM nos eluatos renais

A concentração de proteínas totais nas amostras de eluatos renais foram ajustadas para concentração de 15 mg/ml, uma vez que esta concentração corresponde à concentração média de imunoglobulinas em amostras de soros de pacientes com insuficiência renal crônica em lista de espera. Em seguida foi avaliada a concentração das imunoglobulinas do isotipo IgG e IgM nos mesmos, através do método de ELISA (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração de imunoglobulinas dos eluatos renais

Eluatos	Concentração de imunoglobulinas (mg/ml)	
	IgG	IgM
1	14	1,6
2	18	1,5
3	19	1,7
4	18	19
5	18	0,2
6	17	15
7	10	1,6
8	11	0,9
9	14	0,3
10	1,8	1,4
11	1,8	0,3
12	NT	NT
13	NT	NT

NT: não testado

4.3 Pesquisa de anticorpos anti-HLA

A pesquisa de anticorpos anti-HLA doador-específicos foi realizada através de provas-cruzadas contra linfócitos T, linfócitos T+AGH e linfócitos B, utilizando as amostras de soros pré-transplante, pré-rejeição e pós-nefrectomia, bem como os eluatos renais. Foram utilizados soros não diluídos e diluídos 1:4, com e sem tratamento com DTT. Nenhuma das amostras (soros e eluatos) foi positiva nas provas-cruzadas, indicando a ausência de anticorpos anti-HLA doador-específicos.

Os eluatos também foram testados para pesquisa de anticorpos anti-HLA não doador-específicos utilizando o PRA ELISA para análise. Todos os

eluatos foram negativos quanto à presença de anticorpos anti-HLA não doador-específicos.

Após ter sido confirmada a ausência de anticorpos anti-HLA doador-específicos, bem como não doador-específicos nos eluatos dos 13 pacientes, tivemos como objetivo pesquisar a possível participação de anticorpos não-HLA nestas amostras.

4.4 Pesquisa de anticorpos não-HLA utilizando como fonte antigênica a linhagem EAHY. 926

A pesquisa de anticorpos não-HLA foi realizada nos eluatos renais através da citometria de fluxo (imunofluorescência indireta e análise em citômetro de fluxo) utilizando-se como fonte antigênica de célula endotelial a linhagem EAHy. 926.

Dos 13 eluatos analisados, 10 (76%) foram positivos para presença de anticorpos não-HLA do isotipo IgG (eluatos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 13) (Figura 1) sendo que nos eluatos 4 e 6, além de IgG, foram também detectados anticorpos IgM (Figura 2).

Figura 1 - Pesquisa de anticorpos não-HLA do isotipo IgG em eluatos renais por citometria de fluxo. Foi utilizado como conjugado anti-IgG-FITC e como fonte de células endoteliais, a linhagem EAHy.926. Foram consideradas positivas as amostras com MIF acima de 40 canais do controle negativo.

MIF: mediana de intensidade de fluorescência; CN: controle negativo; CP: controle positivo.

Figura 2 - Pesquisa de anticorpos não-HLA do isotipo IgM em eluatos renais por citometria de fluxo. Foi utilizado como conjugado anti-IgM-PE e como fonte de células endoteliais, a linhagem EAHy.926. Foram consideradas positivas as amostras com MIF acima de 28 canais do controle negativo.

MIF: mediana de intensidade de fluorescência; CN: controle negativo; CP: controle positivo.

4.5 Imunofluorescência Indireta (IFI)

4.5.1 Padronização da imunofluorescência

4.5.1.1 Titulação dos anticorpos secundários IgG conjugada com FITC e IgM R-PE

A diluição ótima dos anticorpos secundários IgG-FITC e IgM R-PE foi determinada pela diluição que apresentou a maior diferença de intensidade de fluorescência nas leituras entre os controles positivos e negativos já estabelecidos. A partir dos resultados obtidos, ficou estabelecida a diluição de 1:40 para o anti-IgG FITC humano e 1:20 para o anti-IgM R-PE.

4.5.1.2 Controle negativo

As amostras (eluato proveniente de enxerto renal perdido por trombose de veia e o *pool* de soros de doadores renais vivos) foram avaliadas por IFI em cortes de rins saudáveis. Os fragmentos foram marcados com anti-IgG FITC e anti-IgM R-PE.

Avaliando os resultados obtidos por IFI utilizando as amostras citadas acima, não foi verificada fluorescência nas duas amostras (Figura 3A e 3B), sendo consideradas negativas, portanto, as amostras foram utilizadas como controles negativos dos nossos testes.

Figura 3 – Teste para estabelecer o controle negativo da reação. Imunofluorescência indireta em corte histológico renal sadio utilizando conjugado IgG anti-humano conjugado com FITC. Na figura **A** eluato proveniente de enxerto renal perdido por trombose de veia. Na figura **B** foi utilizado o *pool* de soros de doadores renais. Foi utilizado DAPI para marcação nuclear. Aumento 40X

4.5.1.3 Controle positivo

Todas as 10 amostras de soros de pacientes hipersensibilizados para anticorpos anti-HLA testadas por CDC-NIH-standard, foram positivas com *score* 8 utilizando soros não diluídos, sendo que a reatividade decaía a medida que alguns soros foram sendo diluídos. A partir desses resultados, foi feito o *pool* dessas amostras com soros não-diluídos para utilização no teste de IFI.

Quando testado o *pool* desses soros por imunofluorescência com marcação utilizando anti-IgG humana conjugada com FITC, foi verificada reação difusa (Figura 4) conforme era esperado já que todas as células expressam HLA classe I.

Figura 4 – Teste para estabelecer o controle positivo da reação. Imunofluorescência indireta em corte histológico renal sadio utilizando conjugado IgG anti-humano conjugado com FITC. O teste foi realizado utilizando um *pool* de soros de pacientes hipersensibilizados para anticorpos anti-HLA. Foi utilizado DAPI para marcação nuclear. Aumento 40X

4.5.2 Detecção de estrutura(s) renal(is) reconhecida(s) por anticorpos não-HLA presentes nos eluatos

4.5.2.1 IFI para anticorpo do isotipo IgG

Foi observado que os eluatos não diluídos mostraram uma intensa fluorescência no teste quando comparadas aos controles negativos. Esta fluorescência diminuía à medida que os eluatos foram diluídos. As figuras 5D, 5E e 5F demonstram as diferentes intensidades de fluorescência utilizando o eluato não diluído e diluído 1:5, 1:10 respectivamente. Devido a diminuição significativa da fluorescência dos eluatos diluídos 1:5 e 1:10 em algumas amostras, optamos então, em utilizar os eluatos não diluídos pois foi onde verificamos um padrão de positividade mais homogêneo entre as diferentes amostras de eluatos. Os demais testes são demonstrados

utilizando eluatos não-diluídos. Foram realizados IFI nos eluatos que reagiram e que não com as células endoteliais.

Controle Negativo

Controle Positivo

Eluato 2

Eluato 3

Eluato 4

Eluato 5

Eluato 6

Eluato 7

Eluato 8

Eluato 9

Eluato 10

Eluato 11

Eluato 13

Figura 5 - Imunofluorescência indireta dos eluatos renais utilizando anti-IgG-humano conjugado com FITC. (A) Controle negativo. (B) Controle positivo, marcação do vaso. (C) Controle positivo, marcação do glomérulo. (D)(E)(F) Reação eluato 2 não diluído, diluído 1:5 e diluído 1:10 respectivamente. (G) Reação com eluato 3, marcação do glomérulo. (H) Reação eluato 4. (I) Reação eluato 5. (J) Reação eluato 6. (L) Reação eluato 7. (M)(N)(O) Reação eluato 8, marcação dos glomérulos e vaso respectivamente. (P) Reação eluato 9. (Q) Reação eluato 10. (R) Reação eluato 11. (S) Reação eluato 13, marcação do glomérulo. Aumento de 40X.

Os testes dos eluatos 2, 3, 8 e 13, foram considerados positivos, no entanto as IFI das amostras 2 e 13 tiveram menores intensidades quando comparadas aos controles negativos. Foi observada positividade na marcação dos glomérulos (Figuras 5D, 5G, 5M, 5N, 5S) e no vaso (Figura 5O). A marcação foi linear em todas as amostras positivas.

Os eluatos 1 (dado não mostrado), 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 foram negativos. As intensidades das fluorescências nas estruturas renais avaliadas estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3. Intensidade de fluorescência nas estruturas renais avaliadas. Resultados dos testes utilizando marcador anti-IgG humano conjugado com FITC.

	Glomérulo	Endotélio vascular	Cápsula de Browman's	Epitélio tubular
Eluato 2	2+	1+	-	-
Eluato 3	3+	2+	-	-
Eluato 8	3+	2+	-	-
Eluato 13	2+	1+	-	-

4.5.2.2 IFI para anticorpo do isotipo IgM humana

Foram realizados os testes nos 13 eluatos para pesquisa de detecção de estruturas renais reconhecidas por anticorpos do isotipo IgM.

Controle Negativo

Controle Positivo

Eluato 1

Eluato 2

Eluato 3

Eluato 4

Eluato 5

Eluato 6

Eluato 7

Eluato 8

Eluato 9

Eluato10

Eluato 11

Eluato 13

Figura 6 – Imunofluorescência indireta nas amostras de eluatos renais utilizando anti-IgM-humano conjugado com R-PE. (A) Controle negativo. (B) Controle positivo. (D, G, H, I, J, M) Marcação dos glomérulos. (I) Marcação de túbulos renais. Aumento 40X.

Os testes dos eluatos 2, 5, 6, 7, 8 e 10 (Figuras 6D, 6G, 6H, 6I, 6J, 6M) foram considerados positivos, com marcação de glomérulos. O eluato 7 (Figura 6I) reagiu com túbulos renais além das estruturas citadas acima. As intensidades das fluorescências nas estruturas renais avaliadas estão apresentadas na tabela 4. A marcação foi linear em todas as amostras positivas.

Tabela 4. Intensidade de fluorescência nas estruturas renais avaliadas. Resultados dos testes utilizando marcador anti-IgM humano conjugado com R-PE.

	Glomérulo	Endotélio vascular	Cápsula de Browman's	Epitélio tubular
Eluato 2	2+	1+	-	-
Eluato 5	3+	1+	-	-
Eluato 6	3+	1+	-	-
Eluato 7	3+	1+	-	2+
Eluato 8	2+	1+	-	-
Eluato 10	3+	1+	-	-

4.5.2.3 Ensaio de colocalização por imunofluorescência indireta de imunoglobulinas IgG FITC/ IgM R-PE

Uma vez verificada a ligação dos anticorpos dos isotipos IgG e IgM em comum nos eluatos 2 e 8, foi realizada a pesquisa de colocalização desses dois isotipos de anticorpos. Esses anticorpos reconheceram a mesma região nos capilares glomerulares como demonstrados nas figuras 7J e 7E.

Eluato 2

Eluato 8

Figura 7 – Ensaio de colocalização utilizando anti-IgG-humano conjugado com FITC e anti-IgM-humano conjugado com R-PE por imunofluorescência indireta nas amostras de eluatos renais. Marcação dos capilares glomerulares com IgG FITC (A1, B1). Marcação do glomérulo com IgM R-PE (A2, B2). Marcação dos núcleos celulares (A3, B3). Detalhe da estrutura glomerular (A4, B4). Colocalização IgG FITC/IgM R-PE no glomérulo (A5, B5).

4.5.2.4 Ensaio de colocalização por imunofluorescência indireta utilizando marcador CD31

Foram realizados ensaios de colocalização utilizando marcador de célula endotelial (CD31) conjugado com fluocromos FITC e R-PE nas amostras positivas para imunoglobulinas IgG FITC e IgM R-PE.

4.5.2.4.1 CD31 RPE/ IgG FITC

Foram realizados testes nas amostras 2, 3, 8 e 13 de eluatos. Os anticorpos do isotipo IgG presentes nestas amostras se ligaram as células endoteliais marcadas com CD31 dos capilares glomerulares e endotélio vascular do tecido renal.

Eluato 2

Eluato 3

Eluato 8

Eluato 13

Figura 8 – Ensaio de colocalização utilizando anti-IgG-humano conjugado com FITC e anti-CD31 conjugado com R-PE por imunofluorescência indireta nas amostras de eluatos renais. Depósito de IgG nos capilares glomerulares FITC (A1, B1, C1) e no vaso (D1). Marcação das células endotéliais dos capilares glomerulares (A2, B2, C2) e dos vasos (D2). Marcação dos núcleos celulares (A3, B3). Colocalização IgG FITC/CD31 R-PE no glomérulo (A5, B5, C5) e no vaso (D5). Aumento de 40X.

4.5.2.4.2 CD31 FITC/ IgM R-PE

Foram realizados testes nas amostras de 2, 5, 6, 7, 8 e 10 eluatos. Foi verificado que os anticorpos do isotipo IgM presente nestas amostras reagiram com as células endoteliais marcadas com CD31 dos capilares glomerulares e endotélio vascular do tecido renal.

Eluato 2

Eluato 5

Eluato 6

Eluato 7

Eluato 8

Eluato 10

Figura 9 – Ensaio de colocalização utilizando anti-IgM-humano conjugado com R-PE e anti-CD31 conjugado com FITC por imunofluorescência indireta nas amostras de eluatos renais. Marcação dos capilares glomerulares com IgM R-PE (B2, D2, E2, F2) e vasos (A2, C2). Marcação das células endoteliais com CD31 FITC nos capilares glomerulares (B1, D1, E1, F1) e vasos (A1,C1). Colocalização IgM R-PE/CD31 FITC no glomérulo (B5, D5, E5, F5) e vasos (A5, C5). Aumento 40X.

4.6 Pesquisa de anticorpos anti-MICA

Nenhuma das amostras de eluatos renais reagiram com antígenos anti-MICA.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A despeito dos contínuos progressos da terapia imunossupressora e dos avanços alcançados nos métodos de detecção de anticorpos anti-HLA, o transplante renal ainda é confrontado com problemas que levam a rejeição imunológica ao enxerto. De acordo com a literatura cerca de 5-8% dos enxertos renais são perdidos nos dois primeiros meses pós-transplante por mecanismos mediados por anticorpos não detectados pelo teste de CDC convencional e nem por técnicas mais sensíveis (49, 50, 88, 89).

A introdução de testes mais sensíveis para detecção e caracterização de anticorpos HLA doador-específicos e não doador-específicos, denominados testes de fase sólida e a introdução do marcador C4d na avaliação morfológica de enxertos, têm auxiliado no diagnóstico das rejeições humorais e possibilitado uma maior monitorização das rejeições mediadas por anticorpos. No entanto, a rejeição ainda ocorre em muitos casos.

Apesar do marcador C4d ser uma importante ferramenta para o diagnóstico das rejeições mediadas por anticorpos, dados da literatura sugerem que pelo menos parte dos anticorpos não-HLA não ativam o complemento não permitindo assim, o diagnóstico pelo C4d (80, 90). Inclusive 2 estudos do nosso grupo corroboram com esses dados. Avaliando biópsias de 9 pacientes que eram positivos para anticorpos AACE, sendo 1 irmão HLA-idêntico, não foi verificado depósito de C4d em nenhuma das amostras (79). Em um outro estudo, Lucchiari *et al.* 2000, verificou que os anticorpos anti-célula endotelial detectados nos 8 eluatos não apresentaram

citotoxicidade quando testados por citometria de fluxo. Este resultado sugere que os anticorpos eluídos agiram via citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) (78). Dragun *et al.* estudando 16 amostras de pacientes com anticorpos anti-angiotensina II tipo 1, verificaram que em apenas 5 houve deposição de C4d (91).

A atuação dos anticorpos não-HLA no processo de rejeição é eminente frente à ocorrência de perda precoce do enxerto renal entre irmãos HLA idênticos com prova-cruzada contra linfócitos negativa (60-62). Os mecanismos imunes de atuação destes anticorpos ainda são desconhecidos.

Em nosso centro, uma das linhas de pesquisa foi direcionada ao estudo de resposta mediada por anticorpos contra antígenos de sistemas secundários que pudessem interferir no enxerto, principalmente os do sistema endotelial. O endotélio será sempre o primeiro alvo de uma resposta alogeneica contra um enxerto (reação imunológica contra antígenos não compartilhados, presentes apenas no doador) e quanto mais vascularizado o órgão, maior será o potencial de interação com as CE. Estas também têm papel relevante, e essencial, no desencadeamento da rejeição ao transplante, uma vez que, expressam antígenos dos sistemas ABO e HLA, que são considerados a principal barreira imunológica no transplante, e outros antígenos não-HLA, que atuam de forma ativa no processo de rejeição.

A busca da natureza destes anticorpos levou à descrição do sistema de antígenos expresso em CE e monócitos, denominado VEC (75). A

existência desse sistema comum entre células endoteliais e monócitos não foi confirmada após identificação bioquímica, sendo demonstrado que apenas os anticorpos direcionados contra antígenos na célula endotelial do receptor eram deletérios e os que reagiam exclusivamente com monócitos parecem ser desprovidos de significância clínica.

Dentro do contexto do transplante, diversos estudos têm demonstrado a participação dos anticorpos não-HLA no processo de rejeições humorais. Em nosso centro, KALIL *et al.*, 1989, demonstraram que pode ocorrer rejeição vascular irreversível em pacientes que receberam enxertos provenientes de irmãos gêmeos HLA idênticos com prova cruzada negativa (59). Macaúbas em 1991, em trabalho de tese desenvolvido em nosso centro, evidenciou a presença de anticorpos citotóxicos (IgG e IgM), contra antígenos da célula endotelial, nos soros dos pacientes transplantados renais e que haviam perdido o enxerto devido à rejeição humoral. A reatividade foi específica apenas contra célula endotelial, não sendo compartilhada com monócitos e linfócitos (76).

Lucchiari *et al.*, (2000) pesquisaram o envolvimento de AACE em 22 eluatos renais obtidos de nefrectomia do enxerto devido a diferentes tipos de rejeição irreversível. Excluída a presença de anticorpos anti-HLA contra o doador através de provas cruzadas, os eluatos foram testados contra um painel de HUVECs (do inglês, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*). Em 9 dos 22 casos, a perda do enxerto foi devida à rejeição aguda com comprometimento vascular. Em 8 (88,8%) dos 9 casos foram detectados anticorpos AACE do isotipo IgM que se ligavam às células endoteliais

humanas. O aumento significativo da expressão de moléculas de adesão *in vitro* (VCAM, ICAM e ELAM) nestes casos, demonstrou que os AACE eram capazes de ativar as células endoteliais (78).

Ronda em 2007, estudou 12 soros e eluatos de pacientes que perderam seus enxertos nos primeiros 3 meses pós-transplante por rejeição mediada por anticorpos. Nenhuma das amostras (soros e eluatos) foram positivas nas provas-cruzadas, indicando a ausência de anticorpos anti-HLA doador-específicos e, portanto descartando o envolvimento destes anticorpos na perda dos enxertos. Foi detectado AACE em 9 dos 12 eluatos (75%) estudados, utilizando como fonte antigênica a linhagem EAHy.926 por citometria de fluxo, sugerindo o envolvimento de AACE na perda desses enxertos. Nos 9 eluatos positivos os anticorpos eram do isotipo IgG, sendo que em dois deles houve participação de AACE do isotipo IgM. Um dado importante deste estudo foi a possível detecção dos AACE em 3/4 (75%) amostras de soros coletadas 1, 3 e 9 dias antes do diagnóstico de rejeição (79).

Todos os eluatos foram negativos para anticorpos anti-HLA avaliada pela técnica de CDC-AGH e PRA-ELISA, descartando qualquer possibilidade da participação desses anticorpos.

Com o objetivo de identificar as estruturas renais reconhecidas pelos anticorpos não-HLA presentes nos eluatos, foi utilizada a técnica de imunofluorescência indireta (IFI). Esta permite a identificação das estruturas reconhecidas no tecido bem como a caracterização dos isotipos dos

anticorpos. Foi feita ainda, a identificação da célula, que possivelmente seria alvo desses anticorpos, para ulterior confirmação dos resultados.

Devido um limitado número de relatos utilizando a técnica de IFI no estudo de anticorpos não-HLA e o total desconhecimento do sistema antigênico pesquisado, sabíamos da dificuldade de estabelecer os controles do teste. Uma vez que estamos estudando um sistema antigênico desconhecido, partimos para a obtenção de controles que são utilizados para pesquisa de anticorpos anti-HLA, ou seja, pacientes hipersensibilizados para anticorpos anti-HLA que sabidamente teriam que reagir com os fragmentos renais já que todas as células nucleadas expressam HLA classe I (4). Não conhecendo a sensibilidade da técnica de imunofluorescência indireta, foi escolhido o teste de CDC-NIH-standard por ser a técnica menos sensível entre aquelas utilizadas para detecção de anticorpos. O resultado positivo, demonstrando uma marcação difusa no tecido, nos permitiu avaliar nossas amostras.

Foram estudados 13 eluatos renais que resultaram positivos ou não contra a linhagem EAHy. 926. Isso permitiu comparar os resultados utilizando técnicas distintas.

Os anticorpos não-HLA presentes nos eluatos reagiram fortemente com os capilares glomerulares e vasos. Em quase todos os casos não foi verificada positividade nos túbulos proximais e distais, porém houve 1 caso que os anticorpos do isotipo IgM reconheceram túbulos renais além dos capilares glomerulares e vasos (eluato 7). É importante salientar que as marcações foram específicas nas estruturas renais citadas, excluindo, mais

uma vez, a presença de anticorpos anti-HLA nos eluatos. Com esse resultado verificamos que os anticorpos não-HLA tem uma estrutura-alvo de ataque imunológico em comum aos anticorpos anti-HLA: vasos e glomérulos (92).

O fato das amostras positivas não apresentarem diferentes padrões de reatividade contra um painel de 6 cortes histológicos renais sadios, poderia indicar que os anticorpos não-HLA avaliados no nosso estudo, provavelmente, reconhecem sistemas antigênicos não polimórficos nas células endoteliais. Claro que para responder essa questão seria necessário testar essas amostras em um painel com um número maior de cortes.

Foi verificada, em 4 dos 13 eluatos estudados, a presença de anticorpos não-HLA do isotipo IgG e em 6 dos 13 eluatos presença de anticorpos do isotipo IgM. Os nossos resultados revelaram que foi possível detectar a ligação dos anticorpos por uma técnica menos sensível, que é imunofluorescência indireta, mesmo nas amostras com baixas concentrações de ambas as imunoglobulinas. O maior número de casos positivos para imunoglobulina IgG verificado por FACS, não surpreende, pois podemos explicar com a sensibilidade da metodologia. No entanto, quando avaliamos os resultados do isotipo IgM encontramos um maior número de casos positivos por uma técnica menos sensível (IFI). A partir desses resultados, podemos especular que através da IFI foi possível detectar anticorpos não-HLA novos, dirigidos contra antígenos diferentes nas células endoteliais do tecido renal que não foram detectados no FACS. Isto pode estar associado, principalmente com o alvo antigênico utilizado nas duas

técnicas: por FACS foi utilizada a linhagem EAHy. 926 (células endoteliais de cordão umbilical) enquanto na IFI foi utilizado o corte histológico de rim, órgão alvo da rejeição. É conhecida a diferença de expressão antigênica entre as mesmas células de tecidos diferentes (93), desta forma, os antígenos presentes nas células EAHy. 926 podem estar ausentes ou pouco expressos nas células endoteliais renais e vice-versa. Belmont *et al.*, 1996 pesquisando soros de pacientes com diversas doenças autoimunes, verificaram que alguns reagem de diferentes maneiras com as células endoteliais, dependendo do tipo de tecido e estrutura avaliada. Alguns aparentemente negativos em um determinado tipo de célula endotelial se tornem positivos quando testados em substratos diferentes (94). No rim saudável foi verificada que a expressão de moléculas HLA classe II é restrita as células endoteliais dos pequenos vasos, incluindo os capilares glomerulares e peritubulares, no entanto, a expressão dessas moléculas não é verificadas no endotélio vascular (95).

Acreditamos que os anticorpos não-HLA do isotipo IgM detectados por IFI, participaram da rejeição considerando que estes foram eluídos do enxerto rejeitado. De fato, na experiência do laboratório nem todos os anticorpos detectados no soro do receptor são clinicamente significativos (13). E somente os anticorpos ligados ao enxerto rejeitado poderiam realmente estar envolvidos aos processos de rejeição humoral que causou a perda da função renal. Isto justifica o convencimento do laboratório de pesquisar esses anticorpos em eluatos, apesar de ser uma técnica extremamente trabalhoso.

Em um relato de 1989, Mohanakumar *et al.*, estudando por imunohistoquímica eluatos renais que apresentavam anticorpos não-HLA, verificaram depósitos de IgG em glomérulos, endotélio vascular e epitélio tubular (96). Diferentemente do trabalho anteriormente citado, as nossas amostras positivas para anticorpos do isotipo IgG reconheciam, exclusivamente, capilares glomerulares e endotélio vascular. A discordância dos resultados quanto à estrutura-alvo, nos faz hipotetizar que os anticorpos não-HLA deste estudo são diferentes dos estudados no trabalho citado.

Com a determinação dos isotipos prevalentes nas amostras e as estruturas renais reconhecidas, buscamos saber se os anticorpos presentes nos eluatos 2 e 8 que deram positivos para ambos os isotipos reconheciam as mesmas células. Para tanto, foi realizado o ensaio de colocalização dos fluorocromos conjugados nas moléculas de IgM e IgG. O resultado nos mostrou que nos dois casos os anticorpos não-HLA dos isotipos IgM e IgG se ligavam nas mesmas células. Estes resultados nos inferem que, quando presentes simultaneamente nos 2 casos, ambos os isotipos atacam o mesmo alvo celular.

Acreditamos no início dos resultados que os anticorpos não-HLA em questão eram direcionados as células endoteliais, uma vez que capilares glomerulares e vasos são compostos pelas células endoteliais (97). Para ulterior confirmação, realizamos o ensaio de colocalização utilizando o monoclonal anti-CD31.

A molécula CD31, ou PECAM, está expressa constitutivamente nas células endoteliais (98). O anti-CD31, é amplamente utilizado na

imunofluorescência como marcador de células endoteliais. Baseados neste contexto foram caracterizadas as células endoteliais nos cortes histológicos renais para posterior ensaio de colocalização com os anticorpos detectados nos eluatos. Os resultados demonstraram que, os anticorpos presentes nos eluatos reconheciam células endoteliais dos capilares glomerulares e dos vasos. Esses resultados confirmaram nossa suspeita, já que essas estruturas têm na sua composição células endoteliais. No eluato 7, foi verificada a presença de anticorpos do isotipo IgM dirigidos a outras células, provavelmente células epiteliais, além dos que se ligavam as células endoteliais. Neste caso seria necessário realizar estudos mais aprofundados, incluindo absorções com células específicas, No entanto, a amostra não tinha volume (já escasso após tantos testes) suficiente para tal procedimento.

Anticorpos dirigidos as moléculas MHC não-clássicas, tais como MICA têm sido implicados nas rejeições humorais com perda do enxerto renal (55). Grosse-Wilde *et al.*, em estudo recente, analisaram 59 eluatos perdidos por diversos tipos de rejeições, em 11/59 verificaram presença de anticorpos anti- MICA sendo que em 5 destes não havia presença de anticorpos anti-HLA (53). Os antígenos MICA estão expressos, prevalentemente, em células endoteliais, no entanto, não estão expressas em linfócitos, células comumente utilizadas nas provas cruzadas, consequentemente, anticorpos dirigidos a este sistema não são detectados utilizando estas técnicas (52). A expressão de antígenos MICA na superfície

da célula endotelial levantou a possibilidade de que os anticorpos detectados nos eluatos eram dirigidos contra antígenos deste sistema.

Diante disso foi testada à presença de anticorpos anti-MICA em todas as 13 amostras de eluatos renais através da técnica de citometria de fluxo por LUMINEX. Nenhuma das amostras de eluatos foi positiva para anticorpos anti-MICA, demonstrando assim que, pelo menos, na nossa casuística os anticorpos não-HLA em questão, não são anticorpos anti-MICA.

Apesar de fortes evidências sobre o envolvimento dos anticorpos não-HLA na rejeição humoral, não se conhece a natureza dos estímulos que levam a produção dos mesmos, bem como, informações se estes anticorpos são aloanticorpos ou autoanticorpos. Ronda em 2007, elaborou uma hipótese diante dos seus resultados baseada na hipótese de Bes-Bernardet, sugerindo que pelo menos alguns anticorpos não-HLA são anticorpos IgM naturais pré-existentes a baixos títulos e com o contato antigênico após o transplante pode ocorrer um rápido desenvolvimento de anticorpos IgG a altos títulos específicos para os antígenos da célula endotelial (79,99) . Essa hipótese não é aplicada em parte dos nossos resultados, uma vez que detectamos anticorpos, exclusivamente, do isotipo IgM em alguns eluatos. Provavelmente estes anticorpos, são autoanticorpos, considerando que são IgM e que apesar do contato antigênico, mantiveram o isotipo até o momento da rejeição com a perda do enxerto.

Não se conhece a natureza dos estímulos que levam à produção de AACE e a caracterização molecular dos antígenos alvo na célula endotelial

não foi possível até hoje apesar dos grandes esforços seja no campo das doenças auto-imunes (73, 81) seja no campo dos transplantes (80, 100).

Uma vez detectadas as estruturas, o estudo ficará mais refinado, facilitando a identificação dos sítios antigênicos reconhecidos pelos AACE.

Conclusões e Perspectivas

---

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- ❖ Os capilares glomerulares e os vasos são as principais estruturas-alvo dos anticorpos não-HLA no transplante renal.
- ❖ Os anticorpos reconhecem células endoteliais (CD31) que compõem as estruturas renais alvo
- ❖ Os anticorpos dos isotipos IgG e IgM reconhecem as mesmas células mas, pelo menos em alguns casos reconhecem determinantes antigênicos diferentes
- ❖ O estudo utilizando células endoteliais dos capilares glomerulares renais, contra os quais se verificou maior reatividade dos eluatos, possibilitaria a identificação antigênica dos principais alvos desses anticorpos.
- ❖ Novos testes utilizando como alvo antigênico células endoteliais dos capilares glomerulares renais poderiam ser elaborados para:
  - Monitoramento imunológico dos pacientes;
  - Estudo do efeito da inibição desses anticorpos com a adição da IVIg;
  - Padronização das técnicas para pesquisa de AECA.

Anexos

Anexo A - Dados clínicos dos pacientes selecionados para o estudo

# Pacientes	Sexo	# Transfusões	# Diagnóstico Patológico	# Tx	Data Tx	Duração do enxerto (dias)	Tipo doador	Imunossupressão	Doença de base
1	F	10	ND	1	19/09/00	23	Falecido	CsA, Pred, MMF	Insuf.renal.crônica não esclarecida
2	M	0	Banf IIA	1	10/08/01	58	Falecido	CsA, Pred, MMF	Insuf.renal.crônica não esclarecida
3	F	0	Banf III	1	11/11/98	9	Vivo não parente	CsA, Pred, Aza	Insuf.renal.crônica não esclarecida
4	M	0	Banf IIB	1	20/10/00	65	Falecido	CsA, Pred, Aza	Doença renal policística
5	M	1	CAN II	2	20/10/00	65	Falecido	CsA, Pred, MMF	Doença renal policística
6	M	0	NR	1	11/12/01	2	Vivo parente	CsA, Pred, Aza	Insuf.renal.crônica não esclarecida
7	F	0	ND	2	02/09/99	15	Falecido	CsA, Pred, Aza	Lupus eritromatoso sistêmico
8	M	0	Banf III	2	26/07/00	10	Vivo parente	CsA, Pred, MMF	Glomeruloesclerose segmentar focal
9	M	0	Banf III	1	18/11/96	11	Falecido	CsA, Pred, Aza	Síndrome hemolítico urêmico (SHU)
10	F	0	Banf III	1	15/09/02	4	Falecido	FK, Pred, MMF	Glomerulonefrite membranosa
11	F	0	ND	2	09/12/00	4	Falecido	CsA, Pred, Aza	Pielonefrite obstrutiva crônica
12	M	0	RVT	2	03/03/04	1	Falecido	CsA, Pred, MMF	Nefropatia de refluxo
13	M	0	RVT	1	09/02/04	9	Falecido	FK, Pred, MMF	Nefrosclerose hipertensiva

F:feminino; M: masculino; Tx: transplante; CsA: ciclosporina; Pred: prednisona; Aza: azatioprina;
MMF: micofenolato mofetil; FK: tacrolimus

Anexo B – Classificação de Banff 97

1- Rim normal: Sem alterações histológicas

2- Rejeição mediada por anticorpo: Pode coincidir com as categorias 3, 4 e 5

- Necrose tubular aguda C4d+, mínima inflamação e/ou
- Infiltrado de polimorfonucleares e/ou leucócitos mononucleares em capilar peritubular, C4d+ e/ou
- Inflamação ou alteração arterial transmural, C4d+.

3- Rejeição limítrofe: Pode coincidir com as categorias 2 e 5

- Tubulite focal ou leve com ou sem infiltrado inflamatório intersticial; pode

4- Rejeição aguda /Ativa

Banff I: Comprometimento predominantemente em túbulos e interstício com ausência de arterite

Banff IA: Mais que 25% do parênquima é afetado por tubulite Focal moderada (mais que 4 células mononucleares/túbulo) e/ou;

Banff IB: Infiltrado intersticial intenso (mais que 25% do parênquima afetado) e/ou tubulite severa (mais que 10 células mononucleares/túbulo)

Banff II: Comprometimento predominantemente em artérias

Banff IIA: Arterite intimal leve a moderada com comprometimento de menos de 25% da área luminal

Banff IIB: Arterite intimal moderada a grave que compromete mais que 25% da área luminal

Banff III: Rejeição severa com arterite transmural associada ou não a necrose fibrinóide ou necrose de músculo liso

5- Rejeição crônica ou nefropatia crônica dos enxerto: pode coincidir com as categorias 2, 3 e 4

Grau I: Fibrose intersticial leve e atrofia tubular com ou sem alterações sugestivas de rejeição crônica

Grau II: Fibrose intersticial moderada e atrofia tubular

Grau III: Fibrose intersticial moderada e atrofia tubular severa com perda de túbulos

---

Referências

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stuart FP, Veith FJ, Cranford RE. Brain death laws and patterns of consent to remove organs for transplantation from cadavers in the United States and 28 other countries. *Transplantation* 1981 Apr;31(4):238-44.
2. RBT - Registro Brasileiro de Transplantes - ABTO Ano XII [database on the Internet] 2006.
3. Rapaport FT, Dausset J. Ranks of donor-recipient histocompatibility for human transplantation. *Science* 1970 Feb 27;167(922):1260-2.
4. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *The New England journal of medicine* 2000 Sep 7;343(10):702-9.
5. Moreira Filho CA. Complexo de Histocompatibilidade Principal: seus genes, moléculas e funções. . In: V. L. G. Calich CACV, editor. *Imunologia Básica*. São Paulo: Artes Médicas; 1998. p. 177-88.
6. Abbas AK, Lichtman, A. H. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. Saunders Comp., U.S.A 2003.
7. Turner D. The human leucocyte antigen (HLA) system. *Vox sanguinis* 2004 Jul;87 Suppl1:87-90.
8. Navarrete CV. Immunity and transplantation. *Vox sanguinis* 2004 Jul;87 Suppl1:39-42.
9. Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annual review of biochemistry* 1990;59:253-88.
10. Rose ML. Endothelial cells as antigen-presenting cells: role in human transplant rejection. *Cell Mol Life Sci* 1998 Sep;54(9):965-78.
11. Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nature reviews* 2005 Oct;5(10):807-17.
12. Mason DW, Morris PJ. Effector mechanisms in allograft rejection. *Annu Rev Immunol* 1986;4:119-45.
13. Kalil J.; Panajotopoulos N. Imunologia do transplante renal. In: Riella MC, editor. *Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólíticos*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. p. 929-43.

14. Lechler RI, Lombardi G, Batchelor JR, Reinsmoen N, Bach FH. The molecular basis of alloreactivity. *Immunology today*1990 Mar;11(3):83-8.
15. Sherman LA, Chattopadhyay S. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol*1993;11:385-402.
16. Lechler RI, Batchelor JR. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*1982 Jan 1;155(1):31-41.
17. Shoskes DA, Wood KJ. Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunology today*1994 Jan;15(1):32-8.
18. Iyoda T, Shimoyama S, Liu K, Omatsu Y, Akiyama Y, Maeda Y, et al. The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *The Journal of experimental medicine*2002 May 20;195(10):1289-302.
19. Carbone FR, Belz GT, Heath WR. Transfer of antigen between migrating and lymph node-resident DCs in peripheral T-cell tolerance and immunity. *Trends in immunology*2004 Dec;25(12):655-8.
20. Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Salcido Ochoa F, James MJ, Marelli-Berg FM, et al. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol*2004 Oct 15;173(8):4828-37.
21. Afzali B, Lechler RI, Hernandez-Fuentes MP. Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens*2007 Jun;69(6):545-56.
22. Le Moine A, Goldman M, Abramowicz D. Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation*2002 May 15;73(9):1373-81.
23. Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, Ritchie SC, Hendrix R, Tucker-Burden C, et al. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature*1996 May 30;381(6581):434-8.
24. Kirk AD HD, Armstrong NN, et al. . CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci USA*1997;94.
25. Rocha PN, Plumb TJ, Crowley SD, Coffman TM. Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunological reviews*2003 Dec;196:51-64.
26. Berke G. The CTL's kiss of death. *Cell*1995 Apr 7;81(1):9-12.
27. Graubert TA, Ley TJ. How do lymphocytes kill tumor cells? *Clin Cancer Res*1996 May;2(5):785-9.

28. Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Current opinion in immunology*1998 Oct;10(5):581-7.
29. Helderman JH. General considerations of immunosuppressive therapies--efficacy versus toxicity. *Transplantation proceedings*2001 May;33(3A Suppl):2S-3S.
30. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nature reviews*2005 Mar;5(3):230-42.
31. Starzl TE, Marchioro TK. Organ Transplantation. *Postgraduate medicine*1964 Oct;36:409-10.
32. Warren DS, Zachary AA, Sonnenday CJ, King KE, Cooper M, Ratner LE, et al. Successful renal transplantation across simultaneous ABO incompatible and positive crossmatch barriers. *Am J Transplant*2004 Apr;4(4):561-8.
33. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant*2003 Jun;3(6):665-73.
34. Lechler RI, Sykes M, Thomson AW, Turka LA. Organ transplantation--how much of the promise has been realized? *Nature medicine*2005 Jun;11(6):605-13.
35. Monteiro F, Buelow R, Mineiro C, Rodrigues H, Kalil J. Identification of patients at high risk of graft loss by pre- and posttransplant monitoring of anti-HLA class I IgG antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. *Transplantation*1997 Feb 27;63(4):542-6.
36. Piazza A, Poggi E, Borrelli L, Servetti S, Monaco PI, Buonomo O, et al. Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: posttransplant analysis using flow cytometric techniques. *Transplantation*2001 Apr 27;71(8):1106-12.
37. Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Johnson RW. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation*2003 Apr 15;75(7):1034-40.
38. McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation*2000 Feb 15;69(3):319-26.
39. Panajotopoulos N, Silva RA, Rodrigues H, Oliveira ZN, Fukumori LM, Ianhez LE, et al. Clinical significance of skin crossmatch in kidney transplantation. *Transplantation proceedings*1999 Nov;31(7):2982-3.

40. Zeevi A, Girnita A, Duquesnoy R. HLA antibody analysis: sensitivity, specificity, and clinical significance in solid organ transplantation. *Immunologic research* 2006;36(1-3):255-64.
41. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmuller G, et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney international* 1993 Jun;43(6):1333-8.
42. Pascual SMM. Detection of alloantibody deposition in allografts: capillary C4d deposition as a marker of humoral rejection. *Curr Opin Organ Transplant* 2004;9:29–35.
43. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003 Jun;3(6):708-14.
44. Herzenberg AM, Gill JS, Djurdjev O, Magil AB. C4d deposition in acute rejection: an independent long-term prognostic factor. *J Am Soc Nephrol* 2002 Jan;13(1):234-41.
45. Paul LC. Pathophysiology of chronic renal allograft rejection. *Transplantation proceedings* 1999 Nov;31(7):2715-6.
46. Mauiyyedi S, Colvin RB. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002 Nov;11(6):609-18.
47. Nicleleit V, Mihatsch MJ. Kidney transplants, antibodies and rejection: is C4d a magic marker? *Nephrol Dial Transplant* 2003 Nov;18(11):2232-9.
48. Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, Williams WW, Tolkoff-Rubin N, et al. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 1999 Oct;10(10):2208-14.
49. Crespo M, Pascual M, Tolkoff-Rubin N, Mauiyyedi S, Collins AB, Fitzpatrick D, et al. Acute humoral rejection in renal allograft recipients: I. Incidence, serology and clinical characteristics. *Transplantation* 2001 Mar 15;71(5):652-8.
50. Bohmig GA, Regele H, Exner M, Derhartunian V, Kletzmayr J, Saemann MD, et al. C4d-positive acute humoral renal allograft rejection: effective treatment by immunoadsorption. *J Am Soc Nephrol* 2001 Nov;12(11):2482-9.

51. Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*1994 Jul 5;91(14):6259-63.
52. Zou Y, Stastny P, Susal C, Dohler B, Opelz G. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med*2007 Sep 27;357(13):1293-300.
53. Zou Y, Heinemann FM, Grosse-Wilde H, Sireci G, Wang Z, Lavingia B, et al. Detection of anti-MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation, during the post-transplant course, and in eluates from rejected kidney allografts by Luminex flow cytometry. *Hum Immunol*2006 Mar;67(3):230-7.
54. Zou Y MF, Lazaro A, Zhang Y, Lavingia B, Stastny P. MICA is a target for complement-dependent cytotoxicity with mouse monoclonal antibodies and human alloantibodies. *Human Immunology*2002;63(1):30-9.
55. Sumitran-Holgersson S, Wilczek HE, Holgersson J, Soderstrom K. Identification of the nonclassical HLA molecules, mica, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. *Transplantation*2002 Jul 27;74(2):268-77.
56. Mizutani K, Terasaki P, Bignon JD, Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Shih RN, et al. Association of kidney transplant failure and antibodies against MICA. *Hum Immunol*2006 Sep;67(9):683-91.
57. Mizutani K, Terasaki P, Rosen A, Esquenazi V, Miller J, Shih RN, et al. Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. *Am J Transplant*2005 Sep;5(9):2265-72.
58. Cerilli J, Clarke J, Abrams A, Brasile L. Overview: significance of vascular endothelial cell antigen. *Transplantation proceedings*1987 Dec;19(6):4468-70.
59. Kalil J, Guilherme L, Neumann J, Rosales C, Marin M, Saldanha L, et al. Humoral rejection in two HLA identical living related donor kidney transplants. *Transplantation proceedings*1989 Feb;21(1 Pt 1):711-3.
60. Brasile L, Rodman E, Shield CF, 3rd, Clarke J, Cerilli J. The association of antivascular endothelial cell antibody with hyperacute rejection: a case report. *Surgery*1986 May;99(5):637-40.
61. Sumitran-Karuppan S, Tyden G, Reinholt F, Berg U, Moller E. Hyperacute rejections of two consecutive renal allografts and early loss of the third transplant caused by non-HLA antibodies specific for endothelial cells. *Transplant immunology*1997 Dec;5(4):321-7.

62. Suberbielle-Boissel C, Legendre C, Kssentini M, Kreis H, Charron D, Raffoux C. Anti-endothelial and epithelial antibodies in renal transplantation. *Transplantation proceedings*1998 Sep;30(6):2852.
63. Bariety J, Oriol R, Hinglais N, Zanetti M, Bretton R, Dalix AM, et al. Distribution of blood group antigen A in normal and pathologic human kidneys. *Kidney international*1980 Jun;17(6):820-6.
64. Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*2003 Sep;196(3):430-43.
65. Kunitomi A, Hori T, Imura A, Uchiyama T. Vascular endothelial cells provide T cells with costimulatory signals via the OX40/gp34 system. *J Leukoc Biol*2000 Jul;68(1):111-8.
66. Karmann K, Min W, Fanslow WC, Pober JS. Activation and homologous desensitization of human endothelial cells by CD40 ligand, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *The Journal of experimental medicine*1996 Jul 1;184(1):173-82.
67. Khayyamian S, Hutloff A, Buchner K, Grafe M, Henn V, Kroczeck RA, et al. ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*2002 Apr 30;99(9):6198-203.
68. Denton MD, Davis SF, Baum MA, Melter M, Reinders ME, Exeni A, et al. The role of the graft endothelium in transplant rejection: evidence that endothelial activation may serve as a clinical marker for the development of chronic rejection. *Pediatric transplantation*2000 Nov;4(4):252-60.
69. Pober JS. Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res*2002;4 Suppl 3:S109-16.
70. Rothermel AL, Wang Y, Schechner J, Mook-Kanamori B, Aird WC, Pober JS, et al. Endothelial cells present antigens in vivo. *BMC Immunol*2004 Mar 16;5:5.
71. Kreisel D, Krupnick AS, Balsara KR, Riha M, Gelman AE, Popma SH, et al. Mouse vascular endothelium activates CD8+ T lymphocytes in a B7-dependent fashion. *J Immunol*2002 Dec 1;169(11):6154-61.
72. Frampton G, Jayne DR, Perry GJ, Lockwood CM, Cameron JS. Autoantibodies to endothelial cells and neutrophil cytoplasmic antigens in systemic vasculitis. *Clinical and experimental immunology*1990 Nov;82(2):227-32.

73. Meroni PL, Raschi E, Testoni C, Tincani A, Balestrieri G. Antiphospholipid antibodies and the endothelium. *Rheumatic diseases clinics of North America* 2001 Aug;27(3):587-602.
74. Horvathova M, Jahnova E, Nyulassy S. Detection of antiendothelial cell antibodies in patients with connective tissue diseases by flow cytometry and their relation to endothelial cell activation. *Physiol Res* 2002;51(6):613-7.
75. Moraes JR, Stastny P. A new antigen system expressed in human endothelial cells. *The Journal of clinical investigation* 1977 Aug;60(2):449-54.
76. Macaúbas C. Anticorpos antiendotélio e rejeição humoral de transplantes renais. Dissertação de mestrado- Instituto de ciências Biomédicas da Univ de São Paulo 1991:95p.
77. Yard B, Spruyt-Gerritse M, Claas F, Thorogood J, Bruijn JA, Paape ME, et al. The clinical significance of allospecific antibodies against endothelial cells detected with an antibody-dependent cellular cytotoxicity assay for vascular rejection and graft loss after renal transplantation. *Transplantation* 1993 Jun;55(6):1287-93.
78. Lucchiari N, Panajotopoulos N, Xu C, Rodrigues H, Ianhez LE, Kalil J, et al. Antibodies eluted from acutely rejected renal allografts bind to and activate human endothelial cells. *Human immunology* 2000 May;61(5):518-27.
79. Ronda C. Perda precoce do enxerto renal causada por anticorpos não-HLA reativos contra as células endoteliais [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo 2006.
80. Glotz D, Lucchiari N, Pegaz-Fiornet B, Suberbielle-Boissel C. Endothelial cells as targets of allograft rejection. *Transplantation* 2006 Jul 15;82(1 Suppl):S19-21.
81. Meroni P, Ronda N, Raschi E, Borghi MO. Humoral autoimmunity against endothelium: theory or reality? *Trends in immunology* 2005 May;26(5):275-81.
82. Claas FH, Paul LC, van Es LA, van Rood JJ. Antibodies against donor antigens on endothelial cells and monocytes in eluates of rejected kidney allografts. *Tissue Antigens* 1980 Jan;15(1):19-24.
83. Joyce S, Flye MW, Mohanakumar T. Characterization of kidney cell-specific, non-major histocompatibility complex alloantigen using antibodies eluted from rejected human renal allografts. *Transplantation* 1988 Sep;46(3):362-9.

84. Boyum A. Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens*1974;4(4):269-74.
85. Danilovs JA, Terasaki PI, Kuban DJ, Sparkes RS, Gjertson D, Bernoco D. Two independent HLA-B-locus specificities expressed on a single haplotype. *Transplantation proceedings*1979 Dec;11(4):1722-5.
86. Amos DB. Matching for donor--host compatibility for bone marrow transplantation. *Transplantation proceedings*1976 Dec;8(4):687-92.
87. Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*1983 Jun;80(12):3734-7.
88. Gupta RK, Nampoory MR, Johny KV, Costandi JN, Nair MP, Francis I, et al. Successful therapy of acute vascular rejection with combined plasma-exchange and monoclonal antibody. *Transplantation proceedings*2001 Aug;33(5):2770-3.
89. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S, Collins AB, Pascual M, Tolkoff-Rubin NE, et al. Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol*2001 Mar;12(3):574-82.
90. Rose ML. Role of MHC and non-MHC alloantibodies in graft rejection *Current Opinion in Organ Transplantation* 2004;9:16–22
91. Dragun D, Muller DN, Brasen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelha M, Dechend R, et al. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med*2005 Feb 10;352(6):558-69.
92. Cornell LD, Smith RN, Colvin RB. Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *Annu Rev Pathol*2008;3:189-220.
93. Auerbach R. Vascular endothelial cell differentiation: organ-specificity and selective affinities as the basis for developing anti-cancer strategies. *Int J Radiat Biol*1991 Jul-Aug;60(1-2):1-10.
94. Belmont HM, Abramson SB, Lie JT. Pathology and pathogenesis of vascular injury in systemic lupus erythematosus. Interactions of inflammatory cells and activated endothelium. *Arthritis Rheum*1996 Jan;39(1):9-22.
95. Muczynski KA, Cotner T, Anderson SK. Unusual expression of human lymphocyte antigen class II in normal renal microvascular endothelium. *Kidney Int*2001 Feb;59(2):488-97.

96. Joyce S, Flye MW, Mohanakumar T. Human kidney specific non-MHC antigen: isolation and characterization using eluates from rejected renal allografts. *Transplant Proc*1989 Feb;21(1 Pt 1):628-9.
97. Junqueira LCC, J. . *Histologia Básica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
98. DeLisser HM, Newman PJ, Albelda SM. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today*1994 Oct;15(10):490-5.
99. Le Bas-Bernardet S, Hourmant M, Coupel S, Bignon JD, Souillou JP, Charreau B. Non-HLA-type endothelial cell reactive alloantibodies in pre-transplant sera of kidney recipients trigger apoptosis. *Am J Transplant*2003 Feb;3(2):167-77.
100. Perrey C, Brenchley PE, Johnson RW, Martin S. An association between antibodies specific for endothelial cells and renal transplant failure. *Transplant immunology*1998 Jun;6(2):101-6.

Apêndices

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 28.09.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **854/06**, intitulado: "Pesquisa de anticorpos anti-HLA e anticélulas endoteliais em pacientes transplantados renais" apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**.

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: Dr.(a) **Jorge Elias Kalil Filho**

Pesquisador (a) Executante: Dr.(a) **Susanne Carolinne Penha Ferreira**

CAPPesq, 28 de Setembro de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Soluções utilizadas

1. RPMI 1640 completo

L-glutamina.....	1Mm
Hepes.....	10Mm
RPMI (Sigma).....	qsp 1000ml

2. Tampão PBS (estoque 10 X concentrado)

NaCl.....	40g
HCl.....	1,0g
Na ₂ HPO ₄	5,75g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
H ₂ O destilada q.s.p.....	500 ml
Para uso diluir solução acima 1/10 em água destilada.	

3. Hanks sem Ca²⁺/Mg²⁺

KCl.....	4,0 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
NaCl.....	80,0 g
Na ₂ HPO ₄	0,48 g
D-glicose.....	10,0g
Vermelho fenol.....	0,1g
H ₂ O q.s.p.....	1000ml

4. Tampão Lavagem FACS-

PBS 1x.....	500ml
FCS.....	2,0%
Azida.....	0,02%

5. Solução de Tripsina

Tripsina.....0,1%
 EDTA..... 0,02%
 Hanks 1x.....q.s.p 100ml

6. Solução de congelamento

RPMI 1640.....40%
 SFB.....50%
 Dimetilsulfóxido.....10%

7. Solução de Ficoll-Hypaque densidade=1077

Preparar inicialmente :

solução A: Ficoll 9%, em H₂O destilada (240ml)

solução B: Hypaque 34%, em H₂O destilada (100ml)

solução A.....240ml

Solução B.....100ml

Homogeneizar as soluções. Ajustar a densidade da solução final para 1077, com auxílio de densímetro. Autoclavar. Estocar a 4°C, ao abrigo da luz.

8 DTT (ditiotreitól) 50 mM

DTT.....0,077g
 PBS 1X 10ml