Hernandez Moura Silva

**Tolerância operacional no transplante renal humano:
repertório de linfócitos B e de alo e autoanticorpos**

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

Programa de: Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Dra. Verônica Porto Carreiro
de Vasconcellos Coelho

Co-Orientadora: Dra. Francine Brambate
Carvalhinho Lemos

São Paulo
2011

Hernandez Moura Silva

**Tolerância operacional no transplante renal humano:
repertório de linfócitos B e de alo e autoanticorpos**

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

Programa de: Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Dra. Verônica Porto Carreiro
de Vasconcellos Coelho

Co-Orientadora: Dra. Francine Brambate
Carvalhinho Lemos

São Paulo
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Hernandez Moura

Tolerância operacional no transplante renal humano : repertório de linfócitos B e de alo e autoanticorpos / Hernandez Moura Silva. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Verônica Porto Carreiro de Vasconcellos Coelho.

Co-Orientadora: Francine Brambate Carvalhinho Lemos.

Descritores: 1.Transplante de rim 2.Tolerância imunológica 3.Rejeição de enxerto
4.Linfócitos B 5.Autoanticorpos 6.Aloanticorpos 7.Transdução de sinal

USP/FM/DBD-074/11

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Ari e Ana, que foram o alicerce para a construção dessa conquista.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

"Proponha-se a atingir o Sol e você poderá não o alcançar, mas sua seta voará muito mais alto do que se fosse apontada para um objeto ao mesmo nível de você."

Joel Hawes

"Tive seis honestos servidores que me ensinaram tudo o que sei, seus nomes eram: ONDE, O QUE, QUANDO, POR QUE, COMO E QUEM." Rudyard Kipling

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado saúde, perseverança e coragem nessa grande aventura que foi o doutorado.

Agradeço aos meus pais por todo o apoio, compreensão do meu mau humor, pela permanente preocupação e pelo todo o amor e carinho. Sem vocês a caminhada seria muito mais desgastante. Muito Obrigado por tudo.

Agradeço a minha irmã, Cecília, por todo o carinho.

Ao meu amigo Henrique, que mesmo em Brasília, sempre esteve ao meu lado nos momentos bons e difíceis. O seu companheirismo é mais que amizade. Muito obrigado.

Aos meus queridos amigos Deco, Pedro Ivo, Pedro Marra, Saulo, Fernanda Angelis, Vivi e Tio Orlando que tornaram minhas idas a Brasília tão prazerosas. Cada um de vocês com seus conselhos e companheirismo contribuíram para essa vitória.

A minha querida orientadora Verônica, por todo o apoio, incentivo, questionamentos, conselhos, por me mostra caminhos mais otimistas de ver as coisas. Obrigado pela orientação, amizade e preocupação com o meu bem estar. Daqui levo mais do que uma orientadora, mas também uma grande amiga.

Aos professores Jorge Kalil, Edécio e Luiza com quem a convivência no laboratório contribuiu muito para a minha formação. As oportunidades de interação com grandes cientistas mundiais oferecidas por vocês foram maravilhosas. Obrigado.

Aos integrantes do projeto Longo Tempo, David Saitovitch, a minha co-orientadora Francine Lemos, Fabiana, Margareth, Elisângela, Patrícia Sesterhein e Florência por todas as discussões clínicas, pela ajuda no recrutamento e seleção dos

sujeitos de pesquisa estudados. Sem o esforço de vocês esse trabalho não existiria. Muito Obrigado.

Ao meu querido amigo Pedro Vieira, por todo o apoio na minha vinda a São Paulo, por todas as festas, conselhos, butecos, discussões científicas, “partidinhas” no playstation, a cerveja no mosca frita e a ajuda no projeto. Espero que essa parceria amigo-científica renda ainda vários frutos, meu sincero obrigado.

A minha amiga Cecilda, por ceder um pouquinho a companhia do Pedro pra mim, hehehe. E também pela preocupação com meus problemas e saúde. Não tenho palavras ainda para agradecer o seu apoio em um momento tão crucial como foi a escrita do meu projeto de post-doc. Obrigado pela amizade e Carinho.

A minha grande amiga Maisa, que ganhei de presente ao entrar no projeto longo tempo. Aprendi muito com seus questionamentos e conselhos. Friend, obrigado pela preocupação, amizade, disponibilidade e ajuda sempre que precisei. Só nos dois mesmo para aguentar as nossas TPMs hehe. Sem a sua amizade esse doutorado não teria tido a mesma graça. Obrigado.

A minha grande amiga Rose, que por muitas vezes foi conselheira, mãe e amiga. Eu nunca encontrarei palavras para agradecer a sua generosidade e bondade comigo. Os seus conselhos foram mais que lições para o meu doutorado e sim lições de vida. Obrigado por compartilhar comigo um pouco de todo o conhecimento que você adquiriu durante a vida. Você teve papel fundamental nesse trabalho.

A Sandra Maria, que todo mundo no laboratório achou que a gente ia se matar nas nossas discussões, mas que ninguém sabia o grande carinho que tenho por ela. Obrigado por sua atenção, paciência em me aturar e ensinar citometria e em especial pelo carinho.

Aos amigos do grupo Tx e do laboratório pela companhia, contribuição e paciência comigo: Amanda, Anninha, Nati, Karine, Carolzinha, Carol Borba, Carol Luque, Geórgia, Adalberto, Evelyn, Malu, Selminha, Gisele, Sonia, Raí, Elaine, Silvano, Sr. Jair, Dr. Hécio, Carlos Sergio, Germano, Marcelo, Carlo, Márcio, Sandra Emiko, Fernanda Alegria, Edil, Maristela, Susan, Fernanda Lim60, e aos demais que não coloquei o nome aqui porque é muita gente e não consigo lembrar mais, hehee.

Aos meus amigos de ICB, Zé e Lucas, pelas festas, companhia, discussões científicas frutíferas e amizade.

Aos meus eternos orientadores Marcelo Brígido e Andrea Maranhão com quem, apesar de longe, sempre mantive contatos científicos e de amizade bastante positivos.

Às funcionárias da disciplina de Imunopatologia e Alergia, Tânia e Andréia.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e ao CNPq pelo financiamento do projeto e pela bolsa de estudo.

Sumário

Lista de abreviaturas	xii
Resumo.....	xiv
Summary	xvi
1. Introdução	1
O Transplante de Órgãos.....	1
As vias de alorreconhecimento	2
Os tipos de rejeições ao aloenxerto.....	4
A Tolerância imunológica.....	10
As células reguladoras.....	11
A autoimunidade fisiológica e a tolerância.....	16
A autoimunidade natural, autoanticorpos e tolerância.....	17
A tolerância imunológica ao aloenxerto	20
Os auto e aloanticorpos e a tolerância ao aloenxerto	29
A tolerância operacional e o componente humoral da resposta imune: Uma lacuna de conhecimento.	31
2. Objetivos	33
Objetivo Geral.....	33
Objetivos específicos	33
3. Material e Métodos	34
3.1 Desenho experimental.....	35
3.2 Sujeitos de pesquisa	36
3.3. Síntese de Peptídeos.....	38
3.4. Armazenamento do soro após a coleta.....	40

3.5. ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)	40
3.6. Determinação de aloanticorpos circulantes por Luminex®.....	42
3.7. Obtenção de células mononucleares periféricas do sangue.	45
3.8. Congelamento e descongelamento de células	46
3.9. Extração de RNA	47
3.10. Quantificação de RNA	48
3.11. Transcrição reversa	48
3.12. Reação de PCR para Hipoxantina Fosforibosil Transferase (HPRT, do inglês, <i>hypoxanthine phosphoribosyl transferase</i>).....	49
3.13. Desenho e aperfeiçoamento dos iniciadores para o <i>Immunoscope</i>	50
3.14. Immunoscope – Análise do repertório de linfócitos B – segmento VH-C μ e VH-C γ	51
3.15. Reação de PCR para o <i>Immunoscope</i>	52
3.16. Reações de eletroforese em sequenciador automático para o <i>Immunoscope</i>	53
3.17. Perfil e cálculo do tamanho da região CDR3 do BCR e da frequência das famílias VH, pelo método de BCRVH CDR3 <i>Spectratyping</i>	53
3.18. Análise dos resultados do Immunoscope gerados no programa Iseapeaks. 55	
3.19. Purificação de células B CD19+CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} (Bregs), CD19+CD24 ^{int} CD38 ^{int} (Naive) e CD19+CD24 ^{int} CD38 ⁻ (Memória) por citometria de fluxo para determinação do repertório do receptor de células B, por <i>Immunoscope</i> . 57	
3.20. Avaliação da ativação da via de sinalização CD40/STAT3 em linfócitos B.	58

3.21. Avaliação da produção de IL-10 intracelular em linfócitos B após a ativação in vitro com CD40 ligante.....	60
3.22. Análises estatísticas.....	63
4. Resultados	64
4.1 Dados clínicos	64
4.2 Determinação da auto e alorreatividade mediadas por anticorpos do tipo IgG dirigidos a moléculas HLA.	68
4.3 Determinação da autorreatividade de anticorpos do isotipo IgG e IgM dirigidos a peptídeos da HSP60 humana.....	77
4.4. Determinação do número de células B supressoras CD19+CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} no sangue.....	91
4.5. Análise do repertório dos receptores de células B	96
4.5. Análise comparativa do repertório de receptores de células B supressoras (CD19+CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}) com o apresentado por células B dos indivíduos tolerantes operacionais	110
4.7. Análise da via de sinalização CD40/STAT3 nas subpopulações de células B circulantes.	114
4.8. Produção intracelular de IL-10 após estímulo com CD40L nas subpopulações de células B do sangue.	123
4.9. Análise global dos resultados do componente humoral da resposta imune..	126
5. Discussão	129
6. Conclusões	165
ANEXOS	167
ANEXO A.....	168

Reatividade humoral dirigida a antígenos HLA e Tipificação HLA dos indivíduos do estudo.	168
ANEXO B	180
Dados clínicos Individuais.	180
ANEXO C	190
Termo de consentimento livre esclarecido e aprovação do projeto pelo comitê de ética.	190
7 .Referências Bibliográficas.	196

LISTA DE ABREVIATURAS

CD: *Cluster of Differentiation*, Conjunto de diferenciação

cDNA: DNA complementar

CDR3: Região determinante de complementaridade 3

dm³: Decímetro cúbico

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxinucleotídeo trifosfato

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

FACS: *Fluorescence-activated cell sorting*, Separação celular ativa por fluorescência

acHLA: Anticorpo anti moléculas HLA

ICAM: Molécula de adesão intercelular

IFN: Interferon

Ig: Imunoglobulina

IL: interleucina

Kb: kilobase

M: molar

MACS: *Magnetic-activated cell sorting*, Separação celular ativa por magnetismo

ml: mililitro

µg: micrograma

µl: microlitro

mm³: milímetro cúbico

N: normal

ng: nanograma

pb: pares de base

PBS: *Phosphate Buffered Saline*, Salina tamponada com fosfato

PMA: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

RNA: Ácido ribonucleico

RNase: Ribonuclease

RPMI: meio de cultura Roswell Park Memorial Institute

SFB: Soro fetal bovino

STAT: fator transdutor de sinal e ativador transcrição

TNF: Fator de necrose tumoral

Tx: transplante

VCAM: Molécula de adesão vascular

°C: grau Celsius

Resumo

Silva, HM. *Tolerância operacional no transplante renal humano: repertório de linfócitos B e de alo e autoanticorpos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

A indução de tolerância imunológica ao aloenxerto, no contexto clínico, permanece um grande desafio para pesquisa científica de tradução. A retirada da imunossupressão em indivíduos transplantados leva à rejeição do enxerto, na grande maioria dos casos. Entretanto, um grupo muito raro de indivíduos transplantados, chamados de tolerantes operacionais (TO), consegue manter a função estável do enxerto após a retirada dos imunossupressores. O estudo desses indivíduos pode contribuir para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na tolerância ao enxerto em humanos, assim como, para a determinação de biomarcadores desse estado de homeostase. Nosso objetivo foi determinar se o estado de tolerância operacional no transplante renal induz um perfil diferencial do componente humoral da resposta imune. Para tal, analisamos o perfil de reatividade de autoanticorpos dirigidos a peptídeos da proteína de choque térmico 60 (HSP60), de alo e autoanticorpos dirigidos às moléculas HLA, o repertório do receptor de células B (BCR) e o perfil funcional de células B supressoras CD19+CD24^{hi}CD38^{hi} (Bregs), comparativamente, nos indivíduos com: TO (n=5), Rejeição Crônica (RC, n=13), função estável do enxerto usando doses habituais de imunossupressores (Est, n=19) e nos indivíduos saudáveis (Sau, n=11). Não observamos um perfil diferencial claro de alo/autorreatividade de anticorpos dirigidos aos peptídeos da HSP60, nem às moléculas HLA, que diferenciasse os grupos do estudo. O estado de tolerância operacional apresentou uma diversidade do repertório do receptor de células B

similar à observada em Sau e Est, enquanto o grupo RC teve uma menor diversidade desse repertório. Além disso, o grupo TO apresentou uma expansão de clones linfócitos B com expressão de 2 tamanhos distintos de CDR3 (de 16aa, família VH3 isotipo IgM, e de 5aa, família VH1 isotipo IgG), diferenciando-os dos grupos Sau, RC e Est ($p<0,01$ e $p<0,05$; e $p<0,01$, respectivamente para VH3M e VH1G). Os números de células B com fenótipo imunorregulador CD19+CD24^{hi}CD38^{hi} (Bregs) circulantes, no grupo TO e Sau, foram similares, enquanto o grupo RC apresentou menores números ($p<0,05$). Funcionalmente, após estímulo via CD40, o grupo TO teve capacidade de gerar células Breg ativadas para STAT3 semelhante ao grupo Sau, enquanto na rejeição crônica esta capacidade foi menor ($p<0,05$).

Concluimos que o estado de tolerância operacional envolve, principalmente, a manutenção do perfil do componente imune humoral, similar ao apresentado por indivíduos saudáveis, em contraste com o estado de rejeição crônica. Além disso, o estado de tolerância foi o único que apresentou expansões expressivas de determinados tamanhos de CDR3, se destacando de todos os grupos. A expansão diferencial desses clones de células B pode ter uma relevância funcional no estado de tolerância operacional, além de potencial valor para o diagnóstico desse estado. Esses dados, em conjunto, nos indicam que a preservação do componente humoral da resposta imune desempenha um papel importante neste estado de homeostase no transplante humano.

Descritores: Transplante de rim, Tolerância imunológica, Rejeição de enxerto, Linfócitos B, Autoanticorpos, Aloanticorpos, Transdução de sinal.

Summary

Silva, HM. *Operational tolerance in human kidney transplantation: repertoire of B lymphocytes and alo and autoantibodies* [thesis]. “São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2011.

The achievement of immunotolerance in human transplantation remains a great challenge. Although, immunosuppression (IS) withdrawal usually leads to graft rejection, a rare group of individuals, called operationally tolerant, maintain stable graft function after IS withdrawal. The study of these individuals can shed light into the field of transplantation tolerance contributing to both discriminate this state and to understand the mechanisms involved in human transplantation tolerance. Our aim was to analyze whether the state of operational tolerance (OT) display a differential profile in the humoral compartment of the immune response. To approach this question, we performed analyses involving the profile of circulating autoantibodies against Heat Shock protein 60 (HSP60) peptides, the profile of alo and autoantibodies against HLA molecules, the B cell receptor (BCR) repertoire and the functional profile of suppressive B cells CD19+CD24^{hi}CD38^{hi} (Bregs), comparing groups with: OT (n=5), Chronic Rejection (CR, n=11), Stable graft function under standard immunosuppression (Sta, n=19) and Healthy (HI, n=11) individuals. We did not observe a clear differential profile of reactivity against HSP60 peptides and HLA molecules in any group. The state of tolerance presented BCR repertoire diversity similar to the one exhibited by Sta and HI individuals, while RC individuals showed low BCR repertoire diversity. In addition, the OT group exhibited the expansion of clones expressing 2 different CDR3 lengths (16aa for the VH3 family IgM isotype, and 5aa for the VH1 family IgG isotype), which differentiated them from HI, CR and

Sta individuals ($p<0.01$ and $p<0.05$; and $p<0.01$, respectively for VH3M and VH1G). The circulating B cell numbers with the suppressive phenotype CD19+CD24^{hi}CD38^{hi} (Bregs) were similar between the OT and HI groups, while CR presented lower numbers ($p<0.05$). In addition, the OT group exhibited a similar capacity of generate activated cells for STAT3 to HI, whereas the CR group exhibited an impaired capacity ($p<0.05$).

We conclude that the operational tolerance state involves the maintenance of the B cell compartment profile similar to the one observed in healthy individuals, in contrast with chronic rejection. In addition, the state of operational tolerance was the only one exhibiting expressive expansions of specific CDR3 lengths, which differentiated OT from all other groups. This indicates that the expansion of B cell populations expressing specific CDR3 lengths could play a relevant role in operational tolerance and may be potential biomarkers for OT. Taken together, we suggest that the preservation of the B cell component of the immune response can play an important role in this homeostatic state in human transplantation.

Keywords: Kidney Transplantation, Immunologic tolerance, Allograft rejection, B-lymphocytes, Autoantibodies, Alloantibodies, Signal transduction.

1. Introdução

O Transplante de Órgãos

Desde o primeiro transplante de órgão sólido, realizado em 1954 pelo prêmio Nobel Joseph Murray, os transplantes de células, órgãos e tecidos vêm se consolidando como uma abordagem de sucesso no tratamento da falência permanente de órgãos ou tecidos. Dentre os transplantes de órgãos sólidos, o mais prevalente é o transplante renal. Esse tipo de transplante é indicado para casos em que há acometimento irreversível da função renal. No Brasil cerca de 70% dos transplantes de órgão realizados são de rim (ABTO, 2009).

Apesar de ser uma abordagem já bem estabelecida, o transplante encontra na rejeição um de seus maiores desafios. Na clínica, boa parte dos casos de rejeição tem sido evitada com a utilização de potentes drogas imunossupressoras. Entretanto, diversos problemas decorrentes do uso de imunossupressores podem acometer o indivíduo transplantado. Dentre eles, podemos citar a maior susceptibilidade ao desenvolvimento de infecções, de neoplasias, assim como, nefro e angiotoxicidade. Os imunossupressores agem principalmente bloqueando a produção de citocinas e a proliferação celular, importantes, principalmente, na rejeição mediada por células T. No caso da rejeição mediada por anticorpos, têm sido utilizadas principalmente duas estratégias: 1- Inibição de células produtoras de anticorpos; 2- Remoção ou bloqueio de anticorpos pré-existentes ou desenvolvidos pós-transplante (Cai e Terasaki, 2005). Essas estratégias de tratamento tornaram a rejeição aguda, um evento menos frequente nos pacientes transplantados. Entretanto, a sua utilização não impede o desenvolvimento de rejeição crônica. Dessa forma, esforços para o desenvolvimento

de novos tratamentos que minimizem os efeitos colaterais e que sejam mais eficientes são de suma importância para o combate à rejeição crônica do enxerto.

Os processos de rejeição são desencadeados pelo alorreconhecimento de moléculas extremamente polimórficas, principalmente as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*). Em humanos, estas moléculas são chamadas de antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês, *Human Leukocyte Antigens*). Os genes que codificam as moléculas HLA estão em uma região gênica compreendida no braço curto do cromossomo 6 humano, contendo mais de 200 genes (Erlich *et al.*, 2001). Podemos destacar, nessa região, as sequências codificadoras das cadeias das moléculas HLA de classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e de classe II (HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ). As duas classes de moléculas são responsáveis pela apresentação de peptídeos próprios e não próprios aos linfócitos T, que as reconhecem, em conjunto com os peptídeos, através do receptor de células T (TCR, do inglês, *T Cell Receptor*), informando o estado do tecido (presença de infecção, malignidade, etc). As moléculas de classe I são responsáveis pela apresentação de peptídeos, principalmente para células T CD8+, enquanto que as de classe II, para linfócitos T CD4+. As moléculas de classe I são expressas em todas as células nucleadas do corpo, enquanto que as de classe II são expressas nas células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês, *Antigen Presenting Cells*) e em algumas células quando ativadas, como células endoteliais e linfócitos T, em humanos (Kindt *et al.*, 2002).

As vias de alorreconhecimento

O processo de rejeição tem início através da resposta adaptativa mediada por linfócitos T alorreativos após o reconhecimento de antígenos histoincompatíveis

polimórficos do órgão transplantado. O reconhecimento desses antígenos pode ocorrer por três diferentes vias: a via direta, a indireta e a semidireta (Cornell *et al.*, 2008). A via direta consiste no reconhecimento por, células T do receptor, de determinantes antigênicos diretamente nas células do doador (Warrens *et al.*, 1994). A via de alorreconhecimento indireta refere-se ao reconhecimento de peptídeos processados oriundos de antígenos de histocompatibilidade alogeneicos que são apresentados por APCs do próprio receptor, de forma semelhante ao reconhecimento de antígenos nominais, no contexto de moléculas HLA (Lechler e Batchelor, 1982; Shoskes e Wood, 1994). A apresentação de aloantígenos de forma indireta (no contexto de moléculas HLA de classe II próprias) resulta em uma alorresposta que é dominada por células T $CD4^+$, podendo desencadear também uma resposta via células T $CD8^+$. Uma possível implicação dessa resposta é a indução da produção de aloanticorpos. Células T $CD4^+$ ativadas por APCs que apresentavam aloantígenos podem interagir com células B naive alorreativas de forma a sinalizar para essas células B a indução de mudança de classe de Ig e a sua diferenciação em plasmócitos secretores de aloanticorpos. Dessa forma, a presença de aloanticorpos é um indicativo de que houve ajuda por parte de células T envolvidas na via indireta de alorreconhecimento (Steele *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2007).

Por último, a via semidireta ocorre devido à capacidade das células do sistema imune de transferir moléculas de sua superfície celular para outra célula (Smyth *et al.*, 2007). Há descrito que as células dendríticas são capazes de adquirir complexos HLA-peptídeo intactos de outras células dendríticas e células endoteliais e, assim, os apresentar às células T alorreativas (Bedford *et al.*, 1999; Herrera *et al.*, 2004). Dessa forma, as APCs do receptor podem adquirir complexos HLA-peptídeos

alogênicos intactos de células do doador, por meio da transferência de moléculas HLA, e estimular células T CD8⁺ ou CD4⁺ pela via direta (Bedford *et al.*, 1999; Herrera *et al.*, 2004). Além disso, essa mesma APC pode apresentar peptídeos de antígenos de histocompatibilidade alogeneicos que foram fagocitados e processados a partir de células necróticas. Esses peptídeos são apresentados via moléculas HLA de classe II próprias pela via indireta às células T CD4⁺. Nesse sentido, tanto células T CD4⁺ e CD8⁺ aloespecíficas são ativadas pela mesma APC. O modo de aquisição do complexo HLA intacto pode ser por contato celular direto (Harshyne *et al.*, 2001; Herrera *et al.*, 2004; Game *et al.*, 2005) ou pela liberação e internalização de pequenas vesículas (“exosomes”) (Denzer *et al.*, 2000; Morelli *et al.*, 2004).

Os tipos de rejeições ao aloenxerto

Os episódios de rejeição são classificados através das alterações histológicas presentes no órgão transplantado e através da presença de alguns indicadores de ativação do sistema imune, tanto no órgão transplantado (depósito da fração C4d do complemento) como no sangue periférico (detecção de anticorpos circulantes específicos contra o doador). No transplante renal, o diagnóstico histológico de rejeição se baseia na classificação de Banff (Racusen *et al.*, 1999; Solez *et al.*, 2007; Sis *et al.*, 2010). De acordo com a conferência de Banff, em 2005, os tipos de rejeição foram reclassificados em rejeição mediada por anticorpos e rejeição mediada por células T; ambas podendo ser aguda ou crônica (Solez *et al.*, 2007). No Hospital das Clínicas da FMUSP, em levantamento recente no período de 2007 a 2009 observou-se uma prevalência de rejeição aguda na população de 457 transplantados renais em torno de 18,6%, sendo 12% rejeições mediadas por células e 6% mediadas por anticorpos (dados não publicados). Esta prevalência é semelhante à encontrada

em outros centros no mundo (Cornell *et al.*, 2008). Já a taxa de sobrevida do aloenxerto renal é de 99% para rins oriundos de doadores vivos e 92% para doadores cadavéricos, no primeiro ano pós-transplante. Para 5 anos após o transplante a sobrevida do enxerto é de 91 e 72%, respectivamente, e de 77% e 47% , após 10 anos de transplante (Axelrod *et al.*, 2010). Assim, mesmo com o uso de potentes drogas imunossupressoras a perda funcional do enxerto, em longo tempo, devido ao processo de rejeição tem sido um grande entrave para o pleno sucesso do transplante de órgãos.

A rejeição aguda mediada por células T é caracterizada, histopatologicamente, pelo acúmulo de células mononucleares no interstício, acompanhado por uma inflamação dos túbulos e, eventualmente, das artérias (Colvin e Nickleleit, 2006). As células mononucleares infiltram o espaço intersticial ao redor dos túbulos. Essas células são compostas, principalmente, de células T CD4⁺ e CD8⁺ (Colvin e Nickleleit, 2006). As células T apresentam grânulos contendo perforina, granzima A e B ou o ligante efector citotóxico FasL (Robertson *et al.*, 1996). Além disso, outras citocinas e quimiocinas são expressas durante a rejeição aguda, dentre elas, o Interferon γ (IFN- γ), TNF- β e α , as quimionas CCL5, também chamada de RANTES (do inglês, *Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*), e CCL3, também chamada de Proteína inflamatória de macrófago (MIP-1 α , do inglês, *Macrophage Inflammatory Protein*) (Hoffmann *et al.*, 2005). Pode-se também detectar a presença de TGF- β (do inglês, *Transforming Growth Factor*) que no contexto da rejeição, além de sua atividade anti-inflamatória, pode também estar envolvido com o desenvolvimento de fibrose (Eikmans *et al.*, 2002). Todo esse processo inflamatório pode gerar a ruptura da membrana basal tubular, o que acarreta

a liberação de proteínas tubulares no interstício. Esse processo possui reflexo direto na perda da função renal e na perda tubular progressiva (Bonsib *et al.*, 2000).

A rejeição aguda mediada por anticorpos ocorre em decorrência da existência prévia ou do desenvolvimento após o transplante, de anticorpos contra antígenos do doador, presença de depósitos do fragmento C4d do complemento e evidência morfológica de agressão aguda ao tecido (Sis *et al.*, 2010). Os mecanismos efetores envolvidos incluem a citotoxicidade mediada por anticorpos, o recrutamento de células inflamatórias, a ativação do complemento ou fagocitose mediada pelo reconhecimento de fragmentos do complemento (Cai e Terasaki, 2005). As características clínicas não são muito diferentes da rejeição aguda mediada por células T, cursando, na maior parte dos casos, com disfunção do enxerto.

Ao contrário da rejeição aguda mediada por células, na qual o predomínio do infiltrado é de células mononucleares, na rejeição aguda mediada por anticorpos, o rim apresenta infiltrado predominante de neutrófilos nos capilares peritubulares e glomerulares (Tinckam *et al.*, 2005; Fahim *et al.*, 2007). Foi também observado a presença linfócitos B CD20+ (Martins *et al.*, 2007). A presença de tubulite e endarterite é geralmente mínima, a não ser que o componente da rejeição mediada por células T esteja presente. Nos casos mais graves, pode ocorrer ativação da cascata de coagulação, com a presença de microtrombos, hemorragia e necrose das paredes arteriais.

Merece ser destacado que a tentativa de se diferenciarem episódios de rejeição mediados por células dos mediados por anticorpos só se tornou possível após o uso de uma nova ferramenta diagnóstica, a pesquisa e detecção da fração C4d do complemento no enxerto. A detecção do C4d depositado em capilares

peritubulares é um sinal da ocorrência de ativação local da cascata do complemento, provavelmente secundária a uma ligação entre antígenos locais com anticorpos circulantes (Feucht *et al.*, 1993). O C4d é um fragmento inativo do componente C4b da via clássica do complemento. O C4d por si só não possui uma função conhecida, mas permanece ligado ao tecido que sofreu fixação do complemento por diversos dias, depois da liberação das imunoglobulinas e do componente C1 do tecido (Cornell *et al.*, 2008). Além dos achados histológicos (presença de neutrófilos, macrófagos, trombose e a necrose tubular aguda) e o depósito do C4d, também são considerados para diagnóstico da rejeição aguda mediada por anticorpos o aumento e o surgimento de anticorpos circulantes específicos contra o doador (Colvin e Smith, 2005).

O desenvolvimento da rejeição aguda humoral está associado com à capacidade dos anticorpos dirigidos a moléculas do aloenxerto de mediar a fixação de moléculas do sistema complemento (Wahrmann *et al.*, 2006). Foi observado que pacientes que possuem anticorpos dirigidos ao aloenxerto, não fixadores de complemento, possuem um prognóstico similar àquele de indivíduos sem anticorpos dirigidos ao aloenxerto (Cornell *et al.*, 2008).

A rejeição crônica tanto mediada por anticorpos como por células T consiste em um processo que ocorre, geralmente, tardiamente na evolução do transplante. Apesar do uso de drogas imunossupressoras, esse tipo de rejeição tem se mostrado refratário ao uso desses medicamentos (Ashton-Chess *et al.*, 2006; Ashton-Chess *et al.*, 2009). A rejeição crônica mediada por células caracteriza-se, histologicamente, pela presença de fibrose da camada íntima arterial com infiltrado de células mononucleares no local da fibrose (Cornell *et al.*, 2008). Na rejeição crônica

mediada por anticorpos é observada a presença de duplo contorno nos capilares glomerulares, multilaminação dos capilares peritubulares, além de espessamento de íntima, atrofia tubular e fibrose intersticial (Cornell *et al.*, 2008). A atrofia tubular e fibrose intersticial também são encontradas na rejeição crônica mediada por células. A detecção do C4d no enxerto caracteriza a rejeição crônica mediada por anticorpo. Ademais, a maior parte dos casos de rejeição crônica mediada por anticorpo está associada à presença de anticorpos circulantes contra moléculas HLA de classe II do doador (algumas vezes antígenos de classe I), com a detecção de depósitos de C4d nos capilares peritubulares, em aproximadamente 30 a 50% dos casos (Colvin, 2007; Sis *et al.*, 2007). A presença de depósitos de C4d, acúmulo de células mononucleares nos capilares peritubulares e anticorpos circulantes doador específicos são características usadas para o diagnóstico de rejeição crônica mediada por anticorpos (Lerut *et al.*, 2007; Solez *et al.*, 2007). Vale comentar que a última classificação de Banff que diferencia a rejeição crônica mediada por células e por anticorpos é uma tentativa de se apontar o mecanismo predominante envolvido no processo da rejeição. É importante, no entanto, lembrar que ambos os mecanismos celulares e humorais possivelmente coexistem no processo de agressão ao enxerto.

Recentemente, novos estudos envolvendo o repertório de aloanticorpos anti-HLA presentes no soro de pacientes transplantados têm contribuído para uma maior valorização do papel dos anticorpos na rejeição crônica. Nesses estudos foi verificado que a detecção de aloanticorpos anti-HLA (tanto doador específicos como não específicos) pode prever a evolução para a rejeição crônica (Terasaki e Ozawa, 2005). Dados obtidos por Terasaki, com 2231 pacientes com transplante renal, mostraram uma prevalência de casos de rejeição crônica significativamente superior

no grupo de pacientes com aloanticorpos anti-HLA quando comparados aos que não possuíam tais anticorpos (Terasaki e Ozawa, 2005). Além disso, em análises diferenciais de pacientes com aloanticorpos anti-HLA doador específicos e não específicos observou-se que, apesar dos pacientes com aloanticorpos anti-HLA doador específicos apresentarem uma maior prevalência de comprometimento da função do enxerto, ambos os grupos apresentaram um maior risco de perda do enxerto e uma diminuição da função do enxerto quando comparados aos pacientes que não possuíam esses anticorpos (Hourmant *et al.*, 2005). Apesar de os autores não conhecerem os mecanismos exatos de dano ao enxerto no contexto de aloanticorpos não específicos ao doador, esses dados sugerem que a presença de aloanticorpos anti-HLA seja um forte marcador para o surgimento da rejeição crônica, e o seu monitoramento pode ser uma importante ferramenta para essa avaliação.

Ainda pouco explorados, mas com uma possível importância no desfecho do transplante, são os autoanticorpos e anticorpos contra alvos não HLA (Dragun, 2008). É possível que anticorpos não HLA e autoanticorpos, fixadores ou não do complemento, sejam responsáveis por uma variedade de injúrias ao enxerto. Os alvos descritos até o momento, no transplante renal, incluem vários antígenos secundários de histocompatibilidade (Sumitran-Holgersson *et al.*, 2002; Mizutani *et al.*, 2006), receptores vasculares, como os receptores de angiotensina (Ansari *et al.*, 2005; Dragun *et al.*, 2005), moléculas de adesão (Raats *et al.*, 1998; Costell *et al.*, 1999; Lawson *et al.*, 2005) e filamentos intermediários (Dragun, 2008). Apesar dos dados serem recentes e ainda com mecanismos pouco conhecidos, é sugerido que esses

tipos de anticorpos podem possuir um papel importante no processo de rejeição crônica.

A Tolerância imunológica

O estado de não agressão persistente aos tecidos próprios é conhecido como tolerância imunológica ao próprio. A tolerância imunológica é classificada em dois tipos, a central e a periférica. A tolerância central que ocorre nos órgãos linfóides centrais (timo, para linfócitos T, e medula óssea, para linfócitos B) e a periférica nos órgãos linfóides periféricos (linfonodos e baço) e nos tecidos periféricos (Kyewski e Klein, 2006). Na tolerância central, linfócitos que reconhecem, com alta avides, antígenos próprios entram, na maioria das vezes, em um processo chamado seleção negativa e são eliminados por apoptose. Já os linfócitos com avides intermediária por antígenos próprios são, geralmente, selecionados positivamente e poderão migrar para os tecidos linfóides periféricos (Liu, 2006). Além dessas duas situações, há estudos mostrando a existência de uma população de células T selecionadas positivamente com uma capacidade de se ligar com média a alta avides a antígenos próprios. Essa população celular desempenha um papel regulador sobre a resposta imune na periferia e são chamadas células T reguladoras (Tregs) (Schwartz, 2005). No caso das células B, o processo de seleção negativa difere um pouco do observado para células T. Foi observado que células com receptores de células B (BCR, do inglês, *B cell receptor*) com alta avides por antígenos próprios podem, ao invés de serem eliminadas, seguir em um processo de edição do receptor altamente autorreativo (Cancro e Kearney, 2004). Quando um linfócito B encontra um autoantígeno com alta avides ele, rapidamente, internaliza o BCR e entra em um período latente. Nesse momento, o BCR será editado para uma nova especificidade e,

então, será reexpresso. Se o linfócito B falhar nesse processo, ele entrará em morte celular por apoptose e será eliminado (Ferry *et al.*, 2006).

A tolerância periférica é mediada, provavelmente, por um processo contínuo de reconhecimento de antígenos próprios. A regulação da atividade efetora de linfócitos na periferia pode ocorrer de diversas maneiras, como por deleção e/ou supressão. A deleção consiste, geralmente, na eliminação de células efetoras autorreativas por apoptose (Wells *et al.*, 2001). Outra forma de tolerância periférica é a estimulação de linfócitos T na ausência de coestimulação, podendo induzir uma modificação da atividade de uma célula efetora, levando-a a um estado não proliferativo, chamado por muitos de anergia. Esse estado consiste na ausência de proliferação e produção de IL-2 por linfócitos (Knoechel *et al.*, 2006).

Atualmente, diversos esforços têm sido direcionados para uma melhor compreensão dos mecanismos usados por células reguladoras na indução da tolerância. O conhecimento desses mecanismos pode contribuir para a determinação de novos protocolos para a indução da tolerância, seja no contexto do transplante, seja para doenças autoimunes.

As células reguladoras

A existência de células T com funções supressoras vem sendo proposta desde o começo dos anos 70 por Gershon e colaboradores (Gershon e Kondo, 1970), entretanto, somente estudos desenvolvidos nos últimos anos têm permitido a determinação da importância das células T reguladoras na manutenção e indução da tolerância ao próprio e também no contexto do transplante. Dentre os diversos tipos, as células T reguladoras mais estudadas são as células T CD4⁺CD25⁺, chamadas de células T reguladoras naturais (Sakaguchi *et al.*, 1995). Elas constituem de 5 a 10%

do total de células T auxiliares circulantes em camundongos (Sakaguchi *et al.*, 1995). Em cultura, as células T murinas e humanas $CD4^+CD25^+$ conseguem suprimir a proliferação de células T $CD4^+CD25^-$ e $CD8^+$ (Piccirillo e Shevach, 2001). Além disso, a administração de células T com fenótipo regulador com células T efetoras conseguiu, em camundongos imunodeficientes, prevenir o desenvolvimento de processos inflamatórios autoimunes. Com isso, foi demonstrado que essas células são supressoras tanto *in vitro*, como *in vivo* (Piccirillo e Shevach, 2001). Em humanos, já foram descritas células com características fenotípicas semelhantes, constituindo cerca de 6% das células T $CD4^+$ circulantes em indivíduos saudáveis (Dieckmann *et al.*, 2001). Na área de transplantes, os relatos da participação das células T reguladoras na indução de tolerância ainda se restringem aos modelos experimentais. Já foi observada, por exemplo, a expansão da população de Tregs $CD4^+CD25^+$ naturais antígeno-específicas, *in vivo*, no modelo de transplante de pele murino, podendo assim mediar uma imunossupressão específica protegendo o aloenxerto (Nishimura *et al.*, 2004).

Recentemente, têm emergido na literatura relatos de uma nova população de células com um papel regulador, as células B reguladoras (Bregs) (Mizoguchi e Bhan, 2006). Nesses estudos, é relatado que estas células B podem regular negativamente respostas autoimunes e processos inflamatórios, tanto *in vitro* como *in vivo* (Lund, 2008; Mauri e Ehrenstein, 2008; Yanaba *et al.*, 2008). É discutido que sua ação reguladora estaria relacionada a duas possíveis condições: supressão dos processos inflamatórios e favorecimento da recuperação da homeostase do indivíduo de forma mais rápida. Os mecanismos descritos nesse processo incluem a produção de citocinas como IL-10 (citocina predominantemente imunorreguladora),

apresentação secundária de antígenos e a interação com outras células, tanto diretamente, como através de anticorpos secretados (Mizoguchi e Bhan, 2006). Por exemplo, foi observado que em camundongos portadores da doença encefalomielite autoimune experimental (EAE, do inglês, *experimental autoimmune encephalomyelitis*), células B produtoras de IL-10 estavam envolvidas com a recuperação dos camundongos acometidos pela doença (Fillatreau *et al.*, 2002). A hipótese para o mecanismo de ação desse tipo de célula B é que ela depende da interação com células T. As células B apresentariam antígenos de forma a favorecer uma resposta Th2, possibilitando a diminuição da resposta inflamatória mediada por células da resposta imune inata. Nesse modelo, o direcionamento para uma resposta Th2 seria, então, alcançado justamente pelas citocinas produzidas pelas células B (Fillatreau *et al.*, 2002). Além dessa observação, *in vivo*, de células B produtoras de IL-10, em alguns experimentos, *in vitro*, foi mostrado que células B incubadas com LPS (Dalwadi *et al.*, 2003) ou com a proteína de choque térmico 60 humana (HSP60, do inglês, *Heat Shock Protein 60*) (Zanin-Zhorov *et al.*, 2005) produzem IL-10, sugerindo uma participação no controle de respostas inflamatórias tanto a antígenos não próprios como próprios. Recentemente, Yanaba e colaboradores mostraram que um subtipo único de células B com fenótipo CD1d^{hi}CD5⁺ consegue regular negativamente processos inflamatórios dependentes de células T, em camundongos (Yanaba *et al.*, 2008). Essas células apresentaram uma alta expressão de IL-10 em relação aos outros subtipos de células B (Yanaba *et al.*, 2008). Acreditasse que para o seu desenvolvimento, maturação e expansão, as células B reguladoras requerem sinais externos como uma sinalização inespecífica pelo receptor de células B (BCR, do inglês, *B Cell Receptor*), a sinalização via *Toll like receptors* e, possivelmente,

uma interação via CD40 e CD40L. Já a presença de células T e NKT não são requeridas (Yanaba *et al.*, 2009). Esses dados sugerem que as células B que produzem IL-10 podem participar ativamente no processo de regulação da resposta imune via supressão de respostas exacerbadas e no controle de respostas autoimunes patológicas.

Em humanos também já foram descritas células B com características semelhantes (Duddy *et al.*, 2004), embora pouco tenha se falado a respeito do seu papel imunorregulador. Recentemente, foi identificada uma rara população de células B humanas circulantes que produzem IL-10 (Bouaziz *et al.*, 2008). Outro grupo mostrou que células B humanas CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} apresentam uma capacidade reguladora após estímulo via CD40 (Blair *et al.*, 2010). Células B CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} foram capazes de suprimir a diferenciação de células T auxiliares 1 (Th1), parcialmente, pela secreção de IL-10, mas não pela secreção de TGF- β (Blair *et al.*, 2010). Nesse trabalho, sua capacidade supressora foi revertida pela adição de anticorpos bloqueadores contra as moléculas coestimuladoras CD80/86. Os autores sugerem que as interações via CD80/86 entre células B e células T CD4⁺ podem atuar, sinergicamente, com a liberação de IL-10 pelas células B, na supressão da atividade de células T CD4⁺ (Blair *et al.*, 2010). No mesmo trabalho os autores mostraram que células B CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} provenientes de pacientes com lupus eritematoso sistêmico (SLE, do inglês, *Systemic Lupus Erythematosus*) são refratárias ao estímulo via CD40, resultando em uma menor fosforilação do fator de transcrição STAT3 (do inglês, *signal transducer and activator of transcription 3*) e, assim, culminando em uma menor transcrição e produção de IL-10. Devido a essa baixa sinalização via CD40 essas células possuem

capacidade supressora comprometida quando comparadas com células de indivíduos saudáveis, em ensaio *in vitro*. (Blair *et al.*, 2010). Discute-se que esse achado pode ter uma repercussão direta nas respostas imunes efetoras desencadeadas nessa doença, dificultando seu controle (Blair *et al.*, 2010).

Outra forma de imunorregulação pelas células B parece estar associada à produção de IgGs reativas a antígenos expressos por células apoptóticas (Mizoguchi e Bhan, 2006). Células em apoptose são consideradas fontes de antígenos próprios que podem ser capazes de ativar células T autorreativas. Uma rápida eliminação desses autoantígenos expostos por células apoptóticas pode ser importante para a manutenção da tolerância ao próprio. Dessa forma, essas células B podem funcionar como células reguladoras em condições inflamatórias pela produção de IgGs reativas às células apoptóticas, resultando na eliminação de potenciais indutores de uma resposta autoimune patológica (Mizoguchi e Bhan, 2006).

Como as células B com um papel regulador foram apenas recentemente descritas, existe até o momento, somente um estudo envolvendo a indução de tolerância ao transplante e Bregs. Em modelo experimental de transplante de medula óssea, que desenvolve a doença do enxerto contra o hospedeiro GVHD (do inglês, *Graft Versus Host Disease*), foi mostrado que camundongos com células B deficientes do gene de IL-10 desenvolvem uma forma mais grave de GVHD do que camundongos com células B capazes de produzir IL-10 (Rowe *et al.*, 2006). As células B produtoras de IL-10 agiriam atenuando a proliferação de células T CD4+ e suprimindo a diferenciação de células Th1, inibindo, dessa forma, o desenvolvimento de GVHD (Rowe *et al.*, 2006). Novas investigações sobre o papel das células B

reguladoras no contexto do transplante podem nos fornecer caminhos para o desenvolvimento de estratégias de indução da tolerância ao enxerto.

A autoimunidade fisiológica e a tolerância

Apesar desses bem arquitetados mecanismos para a manutenção de tolerância ao próprio, o sistema imune não é “cego” às moléculas do próprio organismo. Diversos dados mostram que, *in vitro*, tanto anticorpos quanto linfócitos T interagem com autoantígenos em condições fisiológicas (Cohen, 2007b; Luna *et al.*, 2007; Victora *et al.*, 2007). Já é descrito na literatura que alguns linfócitos autorreativos, apesar de possuírem uma alta avidéz por antígenos próprios, são selecionados positivamente nos órgãos linfóides centrais e estão presentes na periferia do organismo de indivíduos saudáveis (Cohen, 2007b).

Uma pergunta que se pode fazer é: qual a importância das células autorreativas para a manutenção da homeostase? Uma possível resposta pode ser observada dentro da teoria do “homúnculo imunológico”, defendida por Cohen (Cohen, 1992). Nessa teoria, propõe-se que o repertório de células B e T autoimunes e os receptores inatos que reconhecem epítopos próprios criam uma imagem imune funcional das moléculas dominantes do organismo. Com essa imagem, o sistema imune é capaz de monitorar o estado saudável das células pelo seu padrão normal de expressão de moléculas e responder a distúrbios presentes no organismo. Um exemplo da importância desse repertório de células autoimunes, são as células T reguladoras. Essas células são selecionadas com média a alta avidéz por antígenos próprios no timo, e estão presentes na circulação evitando o desenvolvimento de processos autoimunes patológicos. Dessa forma, é possível que a autoimunidade fisiológica tenha uma importância para manutenção da homeostase.

Uma sugestão para o papel da autoimunidade natural é a possibilidade de ajudar o organismo a se livrar de restos de moléculas e células potencialmente problemáticos. Além disso, linfócitos autorreativos e autoanticorpos podem fornecer uma resposta imediata a patógenos que expressam moléculas extremamente similares às moléculas próprias (Cohen, 2007b). Um exemplo é a resposta às proteínas de choque térmico (HSP, do inglês, *Heat Shock Protein*) bacterianas, que é frequentemente imunodominante nas respostas imunes aos micro-organismos. As HSPs são chaperonas responsáveis por auxiliar proteínas a adquirirem a sua correta conformação tridimensional. Elas são moléculas extremamente conservadas evolutivamente. Uma das hipóteses para explicar essa conservação é a grande importância de sua função em todas as células vivas. Assim, qualquer mudança durante a evolução poderia comprometer sua função (Van Eden *et al.*, 2005).

A autoimunidade natural, autoanticorpos e tolerância

Dentro da autoimunidade natural, o papel dos autoanticorpos na regulação da resposta imune ainda não foi elucidado e é de difícil comprovação experimental. Uma das hipóteses está contemplada na teoria da rede idiotípica (Jerne, 1974). De acordo com ela, o sistema imune pode ser regulado através de determinantes antigênicos únicos presentes na região variável de imunoglobulinas (Idiotipo, paratopo ou, simplesmente, o sítio de ligação ao antígeno). Dessa forma, um antígeno pode estimular a geração de um anticorpo (Ab1), com um sítio de ligação único, que, por sua vez, poderá ativar o sistema imune a produzir anticorpos que reconheçam o seu sítio de ligação (Ab2). Esse anticorpo possui um idiótipo com uma similaridade estrutural ao antígeno. Essa cascata de reações pode se prolongar formando anticorpos anti-anti-idiotípicos. O resultado final desse processo pode ser a

produção de uma cadeia de autoanticorpos que se reconhecem e modulam o sistema imune ativando-o ou suprimindo-o (Shoenfeld, 2004). É interessante observar que esse processo de reconhecimento entre os anticorpos pode ser uma fonte para a formação de um “pré-repertório” de imunoglobulinas que podem contribuir para um controle mais eficaz de infecções e/ou para o desenvolvimento de respostas autoimunes fisiológicas, mas também potencialmente patológicas. Outra possibilidade é que autoanticorpos sejam capazes de desencadear uma apresentação mais eficiente de autoantígenos às APCs, visto que as APCs podem reconhecer a porção Fc dos autoanticorpos e internaliza-los junto com o autoantígeno ligado. Isso possibilitaria o recrutamento de células T reguladoras para os antígenos reconhecidos pelos autoanticorpos e, assim, auxiliar na manutenção da tolerância ao próprio (Nobrega *et al.*, 2002).

No campo experimental, há uma carência de trabalhos conclusivos a respeito de quais e em que contexto autoanticorpos podem desempenhar um papel imunorregulador ou patológico. Os autoanticorpos anti-HSP ilustram claramente essa potencial dupla atividade funcional. Em trabalho desenvolvido por Wick e colaboradores foi observado que a presença autoanticorpos anti-HSP60 humana e HSP65 micobacteriana, no soro, era um fator de risco para maior prevalência e mortalidade em doenças cardiovasculares (Wick *et al.*, 2004). No estudo com pacientes com diabetes autoimune, mostrou-se haver uma associação entre o aumento dos níveis circulantes de autoanticorpos anti-HSP60 humana antes do desenvolvimento da intolerância à glicose (Jensen *et al.*, 2001). Esse mesmo fenômeno pôde ser observado em experimentos com camundongos da linhagem Diabéticos Não Obesos (NOD, do inglês, *Nonobese Diabetic*) (Jensen *et al.*, 2001).

No contexto do transplante cardíaco humano, foi observado que altos níveis séricos de anticorpos anti-HSP 65 micobacteriana previamente ao transplante se relacionavam com um pior prognóstico do enxerto (Morgun *et al.*, 1999).

No contexto da imunorregulação, há dados obtidos em modelos de artrite autoimune mostrando que ratos resistentes ao desenvolvimento da doença possuem anticorpos Anti-HSP65 micobacteriana (análogo da HSP60 humana). A transferência desses anticorpos para ratos susceptíveis à doença torna-os resistentes (Ulmansky *et al.*, 2002). Além disso, a vacinação de ratos susceptíveis com peptídeos derivados da HSP65 de micobactéria resultou na produção de anticorpos anti-HSP65 e resistência ao desenvolvimento da doença. É interessante notar que esses anticorpos induzem a secreção de IL-10 por células mononucleares, *in vitro*, sugerindo um papel imunorregulador, com inibição dos processos inflamatórios que acarretam o surgimento da doença (Ulmansky *et al.*, 2002). Dados obtidos em nosso grupo, mostram que autoanticorpos anti-HSP60 humana estão normalmente distribuídos na população (Victoria *et al.*, 2007) indicando que a resposta humoral à HSP60 também pode ser fisiológica. Diante desses dados, é possível que a presença de autoanticorpos anti-HSP60 esteja relacionada com a manutenção da homeostase do indivíduo e que mudanças no seu padrão de expressão reflitam à alteração da homeostase, ou mesmo, diferentes experiências imunológicas dos indivíduos.

Em trabalho publicado, utilizando-se da técnica de *antigen microarray* (*Antigen-chip*), foi mostrado que indivíduos com esclerose múltipla, doença autoimune desmielinizante, com componente celular inflamatório da resposta imune, possuem um padrão diferenciado de autoanticorpos circulantes (Quintana *et al.*, 2008). Nesse trabalho, foi observado que o padrão global de autorreatividade

distingue os diferentes estágios de progressão da doença, como também diferencia os indivíduos com esclerose múltipla de indivíduos saudáveis e de indivíduos com outras doenças neurológicas não autoimunes ou autoimunes (Quintana *et al.*, 2008). A assinatura de autoantígenos reconhecidos que discrimina os diferentes estados avaliados é baseado, principalmente, na reatividade contra antígenos do sistema nervoso central e contra a HSP. Nesse trabalho, pacientes com casos mais graves de esclerose múltipla apresentaram níveis aumentados de autoanticorpos contra a HSP60 em relação aos indivíduos saudáveis (Quintana *et al.*, 2008). Esse padrão de reconhecimento de autoantígenos, em esclerose múltipla, vem corroborar os dados já obtidos em diabetes mellitus, tanto em modelos experimentais (Quintana *et al.*, 2004) como em humanos (Quintana *et al.*, 2003). Todos esses trabalhos vêm nos mostrar que o repertório de autoanticorpos circulantes, em particular os dirigidos a HSP60, pode ser uma fonte valiosa de informação sobre homeostose e doença, podendo estar relacionado a um estado patológico ou ser preditor do desenvolvimento de algumas doenças. Apesar disso, há uma carência de relatos, na literatura, envolvendo autoanticorpos anti-HSP60 e um possível papel na indução de tolerância ao aloenxerto.

A tolerância imunológica ao aloenxerto

O estudo da reatividade ao aloenxerto em pacientes transplantados é uma fonte valiosa de informações para o melhor entendimento da resposta imune no transplante e de como a imunorregulação dessa resposta pode perpetuar a funcionalidade do órgão transplantado. Mas, como poderíamos fazer com que o paciente reconhecesse o aloenxerto como algo próprio ou tornar o sistema imune especificamente não agressivo ao órgão transplantado? Acreditamos que a

determinação do perfil imunológico de pacientes que se encontram em um estado muito especial, chamado de tolerância operacional, poderá contribuir para a resposta dessa pergunta.

A tolerância operacional (TO) é definida como um estado de estabilidade do órgão transplantado, no qual são apresentadas características funcionais normais sem o uso de drogas imunossupressoras por um período maior ou igual a um ano (Ashton-Chess *et al.*, 2006). Outro estado considerado importante é o do “quase” tolerante, no qual pacientes transplantados estáveis com longo tempo de transplante requerem o uso de baixas doses de imunossupressores (Ashton-Chess *et al.*, 2006). Ao observarmos dados relativos à tolerância ao próprio, em conjunto com a existência desses pacientes em tolerância operacional, podemos nos perguntar o seguinte: quais mecanismos de tolerância esses pacientes conseguiram desenvolver para evitar a rejeição do enxerto e atingir um estado de homeostase? Será que está ocorrendo outra via de tolerância ainda não identificada? Provavelmente, essa é uma pergunta de múltiplas respostas. O desenvolvimento do estado de tolerância operacional, em humanos, certamente não envolve um único parâmetro. Provavelmente, a ação sinérgica de múltiplos fatores reguladores da resposta imune deve atuar no desenvolvimento desse estado. As experiências imunológicas durante a vida de cada indivíduo levam à formação de um repertório próprio de células reativas que podem ser mais susceptíveis ou refratárias ao desenvolvimento desse estado. Dessa forma, uma visão mais global na análise de diversos caminhos que podem levar ao estado de tolerância é necessária.

Nesse sentido, estudos vêm sendo realizados no intuito de se entender melhor as peculiaridades desse grupo especial de indivíduos. Brouard e colaboradores,

analisaram por *immunoscope* o repertório de TCR circulante presente em um grupo de 5 indivíduos transplantados renais tolerantes operacionais. Os estudos envolvendo a análise de repertórios de TCR têm se mostrado importantes para a identificação de preferências na utilização do repertório e na mobilização clonal durante respostas imunes, incluindo ao aloenxerto (Brouard *et al.*, 2005; Miqueu *et al.*, 2007). Nesse estudo, analisou-se a região determinante de complementariedade 3 (CDR3, do inglês, *Complementarity-Determining Region 3*), por ser a região mais variável, tanto no TCR como no BCR, e por ser a região que determina, de forma específica, a interação do receptor com o antígeno. Assim, a diversidade de células B e T está relacionada com a variabilidade do CDR3 (Miqueu *et al.*, 2007).

Os resultados encontrados nesse trabalho revelam que o grupo de indivíduos tolerantes operacionais apresentou um padrão singular de distribuição do repertório TCR, com uma distribuição dos comprimentos da CDR3 restrita, ou seja, um perfil de distribuição clonal de linfócitos T limitado. Além disso, ao se analisarem as células T que caracterizavam esse perfil oligoclonal de distribuição, foi observado um baixo acúmulo de transcritos de citocinas tanto do tipo Th1 como Th2 (IL-10, IL-2, IL-13 e IFN- γ), padrão esse, oposto àquele observado em indivíduos com rejeição crônica, sugerindo um estado de hiporresponsividade (Brouard *et al.*, 2005).

Em outro estudo, ao se analisar a população de células T com o fenótipo CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ presentes na população de células mononucleares do sangue periférico (PBMC, do inglês, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), foi visto que indivíduos tolerantes operacionais apresentam números similares àqueles apresentados por indivíduos saudáveis, enquanto que indivíduos com rejeição crônica apresentavam números inferiores (Braudeau *et al.*, 2007). Em outro estudo

onde se comparavam 8 pacientes tolerantes operacionais renais com pacientes com rejeição crônica e indivíduos saudáveis não foi observada diferença na imunofenotipagem de células sanguíneas entre indivíduos saudáveis e tolerantes. No entanto, pacientes com rejeição crônica apresentavam um maior número de células T $CD4^+CD25^-$ expressando marcadores associados com citotoxicidade celular, $NKG2^+$, $CD94^+$ e $CD57^+ CD27^- CD28^-$ (Louis *et al.*, 2006). Quando se procurou analisar moléculas relacionadas com a resposta inata observou-se que pacientes tolerantes apresentavam uma baixa expressão de TLR4 comparativamente a indivíduos com rejeição crônica, tanto no sangue periférico como no enxerto (Braudeau *et al.*, 2008).

Existe uma carência de análises, *in situ*, do órgão transplantado em pacientes tolerantes operacionais, justamente por ser um procedimento invasivo. No único relato presente na literatura, mostra-se que indivíduos tolerantes operacionais transplantados hepáticos apresentam maior grau de fibrose do que os grupos estável sob imunossupressão habitual e saudáveis (Yoshitomi *et al.*, 2009). Entretanto, também foi observado que o grupo tolerante apresentou um maior infiltrado de células $FOXP3^+$ em relação aos outros grupos. Esse dado é interessante devido à existência de estudos anteriores da literatura sempre mostrarem o desenvolvimento de fibrose correlacionado com a rejeição crônica e a perda funcional do enxerto. Com esse dado, a identificação de fibrose no órgão transplantado pode ser vista de outra forma, sugerindo que certo grau de fibrose pode ser compatível com a estabilidade funcional do enxerto.

Ainda se tratando da tolerância operacional, foi observado que no transplante hepático pediátrico, os indivíduos tolerantes apresentavam uma maior frequência de células dendríticas plasmocitóides (pDC) circulantes em relação ao número de

células dendríticas mielóides (mDC) quando comparados com pacientes que precisavam de doses habituais de imunossupressores (Mazariegos *et al.*, 2005). Há diversos estudos nos quais mostra-se que as pDCs estão mais aptas a induzir uma resposta tolerogênica do que as mDCs (Gilliet e Liu, 2002; Shortman e Liu, 2002; Ito *et al.*, 2007).

Outro ponto interessante em relação à atividade funcional das células dendríticas (DC) é a rede de sinais coestimuladores ou correguladores que as DCs podem apresentar para as células T. Em um estudo com pacientes transplantados hepáticos tolerantes mostrou-se que esses indivíduos apresentavam uma maior razão da expressão PD-L1/CD86 em pDCs, mas não em mDCs, quando comparados com indivíduos com doses habituais de imunossupressão (Tokita *et al.*, 2008). A sinalização via PD-L1/PD-1 tem sido mostrada como reguladora negativa da ativação de linfócitos T e facilitadora da sobrevida do aloenxerto (Freeman *et al.*, 2000; Okazaki e Honjo, 2006) e da tolerância materno fetal (Guleria *et al.*, 2005).

Estudos envolvendo pacientes transplantados mostram uma correlação entre a detecção da molécula HLA-G solúvel no soro e uma boa evolução do enxerto (Castellaneta *et al.*). HLA-G é uma molécula pertencente à família de moléculas classe I não clássicas. Sua função tem sido correlacionada com a inibição da atividade de células NK maternas contra tecidos fetais, com a promoção da tolerância na interface materno fetal (Hunt *et al.*, 2005; Rouas-Freiss *et al.*, 2007), com a inibição da atividade citolítica de células NK e CD8⁺ e com a supressão das respostas aloproliferativas mediadas por células T CD4⁺ (Le Rond *et al.*, 2006; Lemaoult *et al.*, 2007; Naji *et al.*, 2007).

Em uma análise mais ampla, foi estudado, por *microarray*, o perfil de expressão gênica de PBMC de indivíduos tolerantes operacionais. Os resultados permitiram verificar que os indivíduos tolerantes operacionais transplantados renais possuem um padrão de expressão gênica diferencial, apresentando 33 genes com expressão alterada, pertencentes principalmente à via de sinalização por TGF- β , e que os diferenciam dos demais grupos clínicos, com 99% de especificidade (Brouard *et al.*, 2007). Esse tipo de abordagem também foi utilizado na análise de pacientes tolerantes transplantados hepáticos (Martinez-Llordella *et al.*, 2008). Nesse estudo, foi mostrado que um número pequeno de genes pode discriminar, com precisão, pacientes em tolerância operacional de pacientes que precisavam doses habituais de imunossupressores. Essa assinatura específica para tolerantes hepáticos é caracterizada, principalmente, pela maior expressão de genes que codificam uma variedade de receptores de superfície expressos por células NK, CD8⁺ e células T $\gamma\delta$ (Martinez-Llordella *et al.*, 2008)

Mais recentemente, dois trabalhos trouxeram novos dados sobre um campo pouco explorado nesses pacientes, o papel de células B na tolerância operacional. No primeiro deles, foi identificada, pela técnica de *microarray*, uma assinatura de genes expressos diferencialmente em células B de pacientes tolerantes, quando comparados com pacientes utilizando doses habituais de imunossupressão e função estável do enxerto (Newell *et al.*). Esses genes estavam envolvidos principalmente com a diferenciação de células B. Dos genes identificados, 3 foram capazes de prever o estado de tolerância com 100% de acurácia, quando testado em outra coorte de pacientes. Esses genes são, *IGKV4-1*, *IGLLA*, and *IGKVID-13*. Esses genes codificam as cadeias leves κ e λ das imunoglobulinas e têm sua expressão aumentada

durante a transição de pré - B para células B maduras e durante a mudança de classe e edição do receptor de célula B que ocorre após as células B maduras serem estimuladas por antígenos (Newell *et al.*, 2010). Esses dados sugerem que células B em transição ou em maturação podem estar envolvidas com a indução ou manutenção do estado de tolerância. Alguns estudos vêm demonstrando que células B maduras em transição, após estímulo antigênico, entram em processo de edição do receptor como uma forma de promover um estado de tolerância a autoantígenos (Bolland, 2008; Vela *et al.*, 2008).

Além disso, foi observado um aumento no número de células B circulantes nos indivíduos tolerantes. Esse aumento foi observado tanto para as células B *naive* (CD19+CD27-IgM+IgD), como para células de B de memória (CD19+CD27+IgM+IgD+) que não realizaram mudança de classe de imunoglobulina e células B em transição (CD19+CD38+CD24+IgD+)(Newell *et al.*, 2010). Vem sendo relatado na literatura que células B *naive* são células apresentadoras de antígenos pouco eficientes (Lassila *et al.*, 1988; Epstein *et al.*, 1995), e isso pode favorecer o desenvolvimento de células T com características reguladoras (Fuchs e Matzinger, 1992). As células de memória e as em transição vêm sendo descritas como promotoras da produção de IL-10 (Cappione *et al.*, 2004), podendo estar relacionadas com o estado de tolerância encontrado. Nesse sentido, os pesquisadores desse trabalho avaliaram a expressão de IL-10 nas células B em transição transicionais e observaram uma maior expressão dessa citocina em pacientes tolerantes do que nos indivíduos transplantados estáveis utilizando doses habituais de imunossupressores (Newell *et al.*, 2010).

Já no trabalho conduzido por Pallier e colaboradores, foi também observado um aumento significativo no número de células B circulantes em pacientes tolerantes em relação a outros grupos de indivíduos transplantados (Pallier *et al.*, 2010). Eles observaram também um aumento no número de células B de memória expressando moléculas migratórias/coestimulatórias compatíveis com um perfil de célula B inibidor/regulador. As células B dos indivíduos tolerantes apresentaram uma diminuição na razão FcγIIA/ FcγIIB (ativador/inibidor) (Pallier *et al.*, 2010), ou seja, apresentando uma maior expressão do receptor Fc inibidor FcγIIB, sugerindo que mecanismos imunorreguladores desencadeados por esse receptor podem se sobressair à ativação mediada pelo receptor FcγIIA (Ravetch e Lanier, 2000; McGaha *et al.*, 2005; Brownlie *et al.*, 2008). Os pacientes tolerantes operacionais também apresentaram um maior número de células B expressando CD1d em relação a indivíduos saudáveis (Sau) e transplantados com função estável do enxerto usando doses habituais de imunossupressores (Est) e CD5 somente em relação a Est (Pallier *et al.*, 2010), células essas que foram identificadas como produtoras de IL-10 e que atuam regulando respostas inflamatórias em camundongos (Yanaba *et al.*, 2008) e em humanos (Colgan *et al.*, 1999). Além disso, em análises utilizando-se o *antigen microarray*, os autores desse trabalho identificaram 98 autoanticorpos com significativa maior ou menor prevalência em indivíduos tolerantes quando comparados com outros grupos de estudo. Entretanto, não foi identificada qualquer via em que a produção dos autoanticorpos poderia estar envolvida com um processo biológico que poderia desencadear o fenômeno observado nesses indivíduos (Pallier *et al.*, 2010). Apesar disso, nesses dois últimos trabalhos, não foi possível observar

um possível mecanismo de regulação mediado por células B que estivesse associado com o estado de tolerância operacional.

Por último, em estudo multicêntrico envolvendo indivíduos tolerantes operacionais no Brasil, coordenado por nosso grupo, almeja-se a identificação de nos parâmetros ou mecanismos envolvidos com o estado de tolerância no transplante renal. Nesse estudo, dentre os principais objetos de investigação, estão a análise das vias de sinalização envolvidas com processos reguladores da resposta imune, tanto em células T, B e monócitos; a análise peptidômica da urina; a análise fatores de transcrição e citocinas envolvidos com a regulação e ativação da resposta imune e o componente humoral da resposta imune no presente trabalho. Em trabalho recentemente publicado por nosso laboratório, foi observado que esses indivíduos tolerantes possuem uma menor capacidade de fosforilar o fator de transcrição Stat6 em monócitos, quando estimulados com IL-4 (Vieira *et al.*, 2010). A ativação de STAT6 está relacionada com a diferenciação de monócitos em células dendríticas e sua ativação leva a um aumento nos níveis de moléculas coestimuladoras (Hart *et al.*, 1999; Deszo *et al.*, 2004). Desta forma, é possível que uma menor fosforilação desse fator de transcrição esteja envolvida com o desenvolvimento de células dendríticas com um potencial mais tolerogênico no contexto da tolerância operacional (Vieira *et al.*, 2010).

Todos esses trabalhos mostram que os indivíduos tolerantes operacionais possuem características peculiares e que o estado de não agressão ao enxerto possui uma repercussão sistêmica. Isso nos possibilita pensar em procedimentos de diagnósticos minimamente invasivos que facilitem a identificação de outros indivíduos potencialmente no estado de tolerância operacional. Mas, como podemos

observar, relatos envolvendo o componente humoral do sistema imune e os pacientes tolerantes operacionais são escassos.

Os auto e aloanticorpos e a tolerância ao aloenxerto

Cada vez mais estudos vêm sendo realizados nos pacientes tolerantes operacionais com o intuito de se desvendar outros mecanismos relacionados à tolerância, e de se determinar biomarcadores associados ao quadro de tolerância operacional no aloenxerto renal.

Existem dados na literatura indicando uma possível relação entre a detecção de anticorpos contra alo e autoantígenos e o desenvolvimento da rejeição crônica. Apesar disso, já foi descrito que autoanticorpos podem possuir um papel importante, dentro da teoria do *homúnculo imunológico* (Cohen, 2007a; 2007b), para a regulação da homeostase do indivíduo. Nesse sentido, podemos levantar como questão se esses anticorpos podem estar envolvidos na manutenção da tolerância em pacientes tolerantes operacionais. É interessante destacar que análises do repertório de anticorpos naturais em pessoas saudáveis mostram padrões constantes. Entretanto, na presença de distúrbios metabólicos podem ser detectadas mudanças no padrão de autoanticorpos (Poletaev e Osipenko, 2003).

Historicamente, a detecção de aloanticorpos circulantes vem sendo associada ao desenvolvimento de rejeição, considerando-se o seu dano mediado pela fixação do complemento no endotélio do aloenxerto, como já foi mencionado nos relatos mostrados acima. Entretanto, mais recentemente, há estudos mostrando que a ligação de anticorpos doador específicos contra moléculas HLA de classe I na superfície de células endoteliais leva à transdução de sinal resultando em alterações funcionais nessas células incluindo a expressão de proteínas envolvidas com a sobrevivência

celular ou proliferação celular (Jindra *et al.*, 2006). Reed e colaboradores mostraram que a transdução de sinal mediada por moléculas HLA de classe I, após a ligação de aloanticorpos, é dependente tanto do título do anticorpo como do nível de expressão da molécula HLA (Jindra *et al.*, 2006). Eles observaram que a sinalização via moléculas de classe I, em uma ambiente com alta concentração de anticorpos anti-HLA de classe I, ativa a expressão do receptor do fator de crescimento de fibroblasto (FGFR, do inglês, *Fibroblast growth factor receptor*) e a proliferação celular em células endoteliais. Em contraste, a ativação de moléculas de classe I com baixas concentrações anticorpos anti-HLA de classe I estimula a via de sinalização PI3K/Akt e aumenta a expressão de proteínas antiapoptóticas nas células endoteliais (Jindra *et al.*, 2006).

O mecanismo de ação desses aloanticorpos contra HLA de classe I em alta concentração está envolvido com a capacidade de induzir à ativação dos complexos alvo em mamíferos de rapamicina 1 (mTORC1, do inglês, *mammalian target of rapamycin complex*), o que resulta em indução da proliferação celular (Jindra *et al.*, 2008). A inibição de mTORC1 por rapamicina consegue bloquear a proliferação de células endoteliais, sendo esse um dos efeitos benéficos, dessa droga, na terapia preventiva da vasculopatia do transplante (Delgado *et al.*, 2009).

Por outro lado, aloanticorpos contra moléculas de classe I, em baixa concentração, ao se ligar às moléculas ao HLA de classe I induzem a ativação de mTORC2 (Jindra *et al.*, 2008). mTORC2, por sua vez, ativa PI3K e Akt que, com sua atividade quinase, promove a sobrevivência celular pela fosforilação de Bad, inibidor dos fatores antiapoptóticos Bcl-2 e Bcl-xL, prevenindo, assim, sua interação com esses fatores antiapoptóticos na membrana mitocondrial (Datta *et al.*, 1999). O

mais interessante é que essa indução de altos níveis de Bcl-2 e Bcl-xL foi dose dependente dos níveis de aloanticorpos (Jin *et al.*, 2004). O aumento máximo na expressão de Bcl-2 e Bcl-xL foi observado em uma baixa concentração (0,1 µg/ml) de anticorpo anti-HLA de classe I. Efeito similar foi observado na fosforilação de Akt. O nível máximo de fosforilação de Akt foi alcançado com um estímulo de 0,01 a 0,1 µg/ml de anticorpo anti-HLA de classe I (Jindra *et al.*, 2006). Além desses dados, foi mostrado que células endoteliais tratadas com doses subssaturantes de anticorpos anti-HLA de classe I se tornaram refratárias à ativação celular e se tornaram resistentes à lise mediada por complemento (Jindra *et al.*, 2006). Todos esses achados indicam que baixos níveis de anticorpos anti-HLA podem promover a expressão de fatores antiapoptóticos no aloenxerto e, assim, favorecer um estado de tolerância/acomodação do enxerto, o qual pode ser benéfico para o desfecho do transplante. Entretanto, não há relatos do papel de anticorpos anti-HLA com a indução ou manutenção do estado de tolerância operacional.

**A tolerância operacional e o componente humoral da resposta imune:
uma lacuna de conhecimento.**

Apesar de todos esses indícios do papel de células B e auto e aloanticorpos no controle da tolerância imunológica, somente três trabalhos foram publicados (Newell *et al.*, 2010; Pallier *et al.*, 2010; Sagoo *et al.*, 2010) relacionando esse componente da resposta imune com o estado de tolerância operacional.

Considerando a crescente discussão sobre a importância do componente humoral da resposta imune no controle da tolerância imunológica, temos como hipótese que as células B junto com os anticorpos circulantes possam também ter um papel importante na indução ou manutenção do estado tolerância operacional.

Para avaliar se esse componente da resposta imune possui características peculiares nesses indivíduos propomos o estudo do repertório de BCR, com intuito de verificar alguma diferença do perfil da população de linfócitos B. O estudo do repertório de células B pode ser fonte de informação relevante a respeito do estado imunológico do indivíduo (Miqueu *et al.*, 2007). Apesar de sua potencial importância nos fenômenos mediados por anticorpos, não há relatos, na literatura, sobre o repertório de receptores de células B em pacientes com tolerância operacional.

Além disso, há uma carência de dados a respeito da via de sinalização que induz a expressão de IL-10 em células B reguladoras (Blair *et al.*, 2010) desses indivíduos tolerantes. Será que eles apresentam uma maior sinalização dessa via ou os indivíduos com rejeição crônica apresentam uma baixa estimulação dessa via? Esse é um ponto a ser investigado.

Outra questão importante que ainda não foi avaliada em indivíduos tolerantes é o perfil de alo e autoanticorpos. Como vimos ao longo da introdução, a presença desses anticorpos na circulação pode estar associada à evolução do enxerto.

Com essas análises esperamos identificar padrões diferenciais de reatividade, mediados pelo componente humoral da resposta imunológica, em pacientes tolerantes operacionais. Essas informações poderão contribuir para a maior compreensão do componente humoral da resposta imune, associado à evolução clínica do enxerto, em condições tão distintas, como a rejeição crônica e a tolerância operacional. Os resultados deste trabalho também poderão contribuir para determinar novos procedimentos no diagnóstico de pacientes nesse estado de tolerância.

2. Objetivos

Objetivo Geral

Determinar se o estado de tolerância operacional, no transplante renal humano, possui repercussão sistêmica diferencial no repertório de linfócitos B, de aloanticorpos e autoanticorpos.

Objetivos específicos

Analisar comparativamente e sequencialmente nos indivíduos transplantados renais em tolerância operacional, naqueles apresentando diferentes estados clínicos, assim como em indivíduos sadios:

1. O repertório global de aloanticorpos e autoanticorpos séricos dirigidos a moléculas HLA.
2. O padrão de autoanticorpos séricos dirigidos aos peptídeos da HSP60.
3. O perfil do repertório de CDR3 de células B do sangue.
4. A capacidade de fosforilação da via de sinalização CD40/STAT3 em células B supressoras CD19+CD24^{hi}CD38^{hi}.

3. Material e Métodos

Esse projeto faz parte do estudo multicêntrico: *“Estudo do perfil imunológico regulador em pacientes com longo tempo de transplante de órgãos sólidos, em estado de tolerância operacional: bases para novas estratégias terapêuticas imunomoduladoras na clínica*, coordenado pela Dra. Verônica Coelho e está contido dentro dos projetos do Instituto de Investigação em Imunologia – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, iii-INCT CNPq (573879-2008-7), coordenado pelo Prof. Jorge Kalil. No estudo multicêntrico estão sendo investigados o perfil global das respostas imunes celular e humoral, assim como o perfil proteômico diferencial nos indivíduos tolerantes operacionais e nos diferentes grupos clínicos de pacientes transplantados. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HCFMUSP (CAPPesp nº 0476/08, vide anexo C).

3.1. Desenho experimental

3.2. Sujeitos de pesquisa

Foram analisados 5 grupos de indivíduos: Um grupo de indivíduos saudáveis (doadores de rim) e 4 grupos de indivíduos transplantados renais, conforme esquema abaixo. Todos os sujeitos de pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo C).

Grupo TO – Indivíduos estáveis com longo tempo de transplante (≥ 1 ano de transplante), sem uso de drogas imunossupressoras há pelo menos 1 ano.

Grupo RC – Indivíduos com longo tempo de transplante (≥ 1 ano de transplante) com rejeição crônica (diagnóstico por biópsia utilizando-se os critérios histopatológicos de classificação do rim transplantado –Banff 1997 e 2005 (Racusen *et al.*, 1999; Solez *et al.*, 2007). Os indivíduos com rejeição crônica mediada por células T e por anticorpos foram selecionados e analisados separadamente.

Grupo Est – Indivíduos estáveis com longo tempo de transplante (≥ 1 ano de transplante) com doses habituais de imunossupressores.

Grupo Sau – indivíduos saudáveis doadores de transplante renal.

Os indivíduos do presente estudo provêm de dois centros integrantes do estudo multicêntrico em tolerância operacional. No total, são 4 indivíduos provenientes do Rio Grande do Sul (PUC-RS) e 58 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As informações clínicas dos pacientes transplantados renais foram obtidas no prontuário eletrônico do Serviço de Transplante Renal do HCFMUSP e no serviço de transplante renal do Hospital São Lucas da PUC-RS com auxílio dos colaboradores clínicos do projeto. Os indivíduos saudáveis são doadores de pacientes transplantados renais no HCFMUSP.

Como critério de função renal “normal” foi adotado o limite de clearance de creatinina $>45\text{ml/min}$, não apresentando variação negativa de clearance maior do que 10% nos últimos 6 meses ou níveis considerados dentro da normalidade de creatinina sérica nos últimos 6 meses.

No grupo RC, os indivíduos com rejeição crônica tiveram o seu diagnóstico confirmado por biópsia renal que foi analisada de acordo com a classificação histopatológica do rim transplantado – Banff 1997 (Racusen *et al.*, 1999). Nesta classificação de 1997, o termo rejeição crônica era englobado dentro da terminologia nefropatia crônica do transplante. Em todos os pacientes incluídos neste grupo, nas biópsias renais foram observados achados histopatológicos de fibrose intersticial e atrofia tubular, além de fibrose vascular e neoproliferação intimal. Além disso, dispúnhamos da pesquisa de C4d pelas técnicas de imunofluorescência ou imunoperoxidase. Desta maneira, pudemos classificar as biópsias como, rejeição crônica mediada por células T ou por anticorpos, segundo a classificação de Banff-2005 (Solez *et al.*, 2007).

Foram realizadas 3 coletas seriadas de material biológico dos sujeitos de pesquisa, em intervalos de 4 a 6 meses entre as coletas. Além disso, os indivíduos do estudo foram acompanhados por um período de 12 a 18 meses.

Para a realização dos experimentos programados, foram realizadas coletas de 55ml de sangue, sendo 10ml em tubo seco para separação de soro, 5ml em tubo com EDTA para extração de RNA e de 40 ml em tubos com heparina para separação de células mononucleares.

3.3. Síntese de Peptídeos

Os peptídeos da HSP60 utilizados foram desenhados, previamente, em nosso grupo, com base na sequência de aminoácidos da proteína HSP60 já publicada (Jindal *et al.*, 1989). Para tal, foi utilizado o software TEPITOPE- 2000TM (Hammer *et al.*, 1997; Bian *et al.*, 2003) para identificar as regiões da HSP60 com maior probabilidade de ligação às diferentes moléculas HLA-DR, moléculas em que os peptídeos da HSP60 poderiam se apresentados. Essa estratégia foi utilizada para o desenho dos peptídeos devido aos trabalhos do grupo naquele momento terem com objetivo a análise do papel regulador/inflamatório desses peptídeos em células T (Caldas *et al.*, 2004; Caldas *et al.*, 2006). Ao total foram desenhados 18 peptídeos, que cobrem 55% da proteína da HSP60 (Tabela 1 e Figura 1), dos quais, 12 foram utilizados nos ensaios de ELISA no presente estudo. Seis peptídeos não foram utilizados devido a problemas técnicos com a síntese de peptídeos.

Os peptídeos da HSP60 foram sintetizados utilizando-se a tecnologia de fase sólida com aminoácidos na forma Fmoc (Fluorenilmetilcarbonil) em sintetizador APEX-396 (Advanced Chemtech, Louisville, KY, EUA). As purificações foram realizadas em aparelho de cromatografia líquida de alta pressão – HPLC (do inglês, *High Pressure Liquid Chromatography*) (LC-10 AD, Shimadzu, Japão), e caracterizadas em espectrômetro de massa (Ettan Maldi, Amersham Biosciences, Oxford, Reino Unido).

Para uso dos peptídeos nos experimentos foram adotados critérios mínimos de pureza que incluíam: (i) haver similaridade entre o tempo de retenção do peptídeo analisado e o tempo de retenção de referência no HPLC; (ii) o pico referente ao peptídeo deveria ser uma curva Gaussiana; (iii) ter no mínimo 75% de pureza; (iv) e,

constar no espectro de massa o pico corresponde ao peso molecular esperado para aquele peptídeo. O cálculo da pureza foi obtido dividindo-se a fração da área correspondente ao pico de peptídeo pela área total do cromatograma, expressa em percentagem;

Tabela 1. Sequência de aminoácidos, localização dos peptídeos na sequência da proteína da HSP60 humana e os pesos moleculares dos peptídeos utilizados.

Peptídeos	Sequência de aminoácidos	Localização	Peso Molecular (kDa)
N-terminal			
N2	RVLAPHLTRAYAKDVKFGAD	16-35	2,228
N4	LLADAVAVTMGPKGRTVIIE	46-65	2,054
N6	DGVTVAKSIDLKDKYKNIGA	76-95	2,135
N7	KDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAG	87-110	2,619
N10	NPVEIRRGVMLAVDAVIAEL	136-155	2,165
Intermediária			
I2	YISPYFINTSKGQKCEFQDA	223-242	2,339
I5	TLVLNRLKVGLQVVAVKAPGFGD	285-307	2,394
I6	GGAVFGEEGLTLNLEDVQPH	321-340	2,082
I 8	DDAMLLKGKGDKAQIEKRIQ	353-372	2,257
C-terminal			
C8	PTKVVRTALLDAAGVASLLTTAE	521-543	2,297
C9	LTAEVTVTEIPKEEKDPGM	539-558	2,186
C10	KDPGMGAMGGMGGGMGGGMF	554-573	1,803

kDa – kilo Dalton

Figura 1. Mapa esquemático da HSP60 em forma linear destacando suas regiões e peptídeos. A HSP60 é uma proteína de 573 aminoácidos. Os peptídeos sintetizados cobrem 55% da proteína. Às sequências dos peptídeos restantes são muito hidrofóbicas e inviabilizaram sua síntese.

3.4. Armazenamento do soro após a coleta.

O soro dos indivíduos de pesquisa foi obtido a partir da coleta de 10ml de sangue em tubo seco. Após a coleta, o sangue foi deixado à temperatura ambiente para retração do coágulo. O material foi, então, centrifugado a 600g por 10 min à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o soro se encontra na fase superior do tubo, ele foi coletado transferido em aliquotas de 1ml para tubos de congelamento (TPP, Switzerland) e acondicionados a -80°C , até o momento de uso.

3.5. ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Neste método imunoquímico utiliza-se uma enzima conjugada a um anticorpo que na presença de um substrato específico produz uma reação colorimétrica capaz de ser quantificada por espectrofotometria. Essa técnica possibilitou a visualização de anticorpos presentes no soro dos indivíduos que reconhecem os peptídeos da HSP60. O procedimento padronizado para a análise desses autoantígenos já havia sido previamente estabelecido em nosso laboratório. O procedimento consistiu em

sensibilizar a placa de 96 poços de alta ligação (Maxisorp, Nunc, Rochester, NY, EUA) com 4 μ M do peptídeo diluído em tampão bicarbonato/carbonato 0,05M pH 9,6 a 4°C durante a noite. Em seguida, lavou-se 3 vezes a placa com 200 μ l/poço com tampão PBS-Tween20 0,1%. A partir daí, foi feito o bloqueio dos sítios reativos da placa com 200 μ l/poço com tampão de bloqueio (PBS - gelatina 2,5%. Porcine Skin gelatin, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, EUA) a 37°C por 1 hora. Após nova lavagem, nas condições já citadas, foram adicionados 100 μ l/poço do soro diluído 1:100 em tampão diluente de amostra e as placas foram incubadas durante a noite a 4°C ou 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem, foram adicionados 100 μ l/poço de anticorpos, anti-IgG ou anti- IgM humanos (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, EUA) marcados com peroxidase e produzidos em coelho, na diluição de 1:10000, e feita a incubação à temperatura ambiente por 2 horas. Ao fim dessa etapa, foi realizada nova lavagem e acrescentados 100 μ l/poço do substrato OPD (o-Phenylenediamina, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, EUA), 4mg de OPD em 10 ml de tampão citrato pH= 5,0 adicionado de 4 μ l de H₂O₂ 30%, seguida de incubação à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após esses 30 minutos, procedeu-se a interrupção da reação com 50 μ l/poço de ácido sulfúrico 2N. Após a interrupção foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro apropriado no comprimento de onda de 490 nm (μ Quant, Bio- Tek, CA, EUA).

3.6. Determinação de aloanticorpos circulantes por Luminex®

O estudo do repertório global de alo e autoanticorpos anti-HLA presentes nos soros dos pacientes foi analisado por Luminex. Essa técnica se utiliza de microesferas de poliestireno que são internamente marcadas com dois fluorocromos espectralmente distintos. Usando quantidades precisas de cada um desses fluorocromos, é criado um arranjo com 100 diferentes microesferas marcadas, o que gera um endereço espectral específico para cada microesfera. As microesferas possuem na sua superfície moléculas HLA distintas, e o conjunto de microesferas apresenta um pool das moléculas HLA mais representativas da população caucasiana (Tabela 2) (One Lambda®, Canoga Park, CA, EUA). Além disso, há a possibilidade de se utilizar um terceiro fluorocromo ligado a uma molécula repórter (Anti-IgG humana- PE, por exemplo) para mostrar a que microesfera o seu reagente está se ligando.

A reação foi realizada conforme descrito abaixo. Foram aliqüotados 200 µl de cada amostra de soro em microtubos de 0,5 ml. Essas amostras foram, então, submetidas a uma centrifugação a 14000g por 10 min para sedimentação de debris e separação de gordura presente no soro. A partir daí, foram retirados da fase intermediária 20 µl de soro para as reações que determinavam a positividade da amostra quanto à presença de anticorpos anti-HLA de classe I e II (PRA, One Lambda®, Canoga Park, CA, EUA). Esse teste consiste em um conjunto de 30 preparações de esferas distintas. Cada uma representa um conjunto de antígenos HLA de classe I ou II distinto. Com isso, é possível determinar se há anticorpos no soro do indivíduo contra antígenos de classe I ou II) ou 10µl de soro para as reações que determinavam a especificidade dos anticorpos dirigidos às moléculas HLA

(Single, One Lambda®, Canoga Park, CA, EUA). Com esse teste, identifica-se a especificidade do antígeno HLA a qual o alo/autoanticorpo está se ligando com alta precisão, sendo somente utilizado para indivíduos que apresentaram reatividade contra antígenos HLA de classe I e II no teste PRA). O painel de antígenos HLA avaliado pode ser observado na Tabela 2. A esses volumes de soro (20 e 10µl) foram adicionados 5 µl de esferas para reações PRA e 2,5µl para as reações Single. Como controle negativo foi utilizado soro de indivíduo saudável com ausência de anticorpos HLA circulantes. Essa mistura de esferas e soro foi, então, incubada no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente, sob agitação.

Após esse período adicionaram-se 150 µl de tampão de lavagem 1x (Wash Buffer, One Lambda®, Canoga Park, CA, EUA). Após adicionar o tampão de lavagem, as amostras foram submetidas a uma centrifugação a 1300g por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, as amostras levemente agitadas, e foram adicionados 200 µl de tampão de lavagem e procedeu-se a mais uma centrifugação a 1300g por 5min. Essa última etapa de lavagem foi, então, repetida mais uma vez. Após a última centrifugação foi adicionado às amostras 0,5 µl do anticorpo anti-IgG humana conjugado à ficoeritrina (One Lambda®, Canoga Park, CA, EUA), concentrado 100x, diluído em 49,5 µl de tampão de lavagem. Foi feita uma nova incubação no escuro por 30 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação. Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 1300g por 5min e o sobrenadante foi, então, descartado. As amostras foram lavadas mais 2 vezes, como descrito anteriormente. Após isso, foram adicionados 70 µl de PBS 1x a cada amostra e procedeu-se a sua transferência para a placa de aquisição. A partir daí, foi realizada a

leitura das amostras no aparelho similar a um citômetro de fluxo, chamado Luminex® 100i analyser (Luminex, Austin, TX, EUA).

Tabela 2. Pannel de antígenos HLA utilizado no ensaio de Luminex para determinação do repertório de alo/autoanticorpos anti-HLA.

Locus HLA	Antígenos avaliados
Locus A	A01 (A*0101); A02 (A*0201); A02 (A*0203); A02 (A*0206); A03 (A*0301); A11 (A*1101); A11 (A*1102); A23 (A*2301); A24 (A*2402); A24 (A*2403); A25 (A*2501); A26 (A*2601); A29 (A*2901); A29 (A*2902); A30 (A*3001); A30 (A*3002); A31 (A*3101); A32 (A*3201); A33 (A*3301); A33 (A*3303); A34 (A*3401); A34 (A*3402); A36 (A*3601); A43 (A*4301); A66 (A*6601); A66 (A*6602); A68 (A*6801); A68 (A*6802); A69 (A*6901); A74 (A*7401); A80 (A*8001).
Locus B	B07 (B*0702); B08 (B*0801); B13 (B*1302); B64 (B*1401); B65 (B*1402); B62 (B*1501); B75 (B*1502); B72 (B*1503); B71 (B*1510); B76 (B*1512); B77 (B*1513); B63 (B*1516); B18 (B*1801); B27 (B*2705); B27 (B*2708); B35 (B*3501); B37 (B*3701); B38 (B*3801); B39 (B*3901); B60 (B*4001); B61 (B*4002); B41 (B*4101); B42 (B*4201); B44 (B*4402); B44 (B*4403); B45 (B*4501); B46 (B*4601); B47 (B*4701); B48 (B*4801); B49 (B*4901); B50 (B*5001); B51 (B*5101); B51 (B*5102); B52 (B*5201); B53 (B*5301); B54 (B*5401); B55 (B*5501); B56 (B*5601); B57 (B*5701); B57 (B*5703); B58 (B*5801); B59 (B*5901); B67 (B*6701); B73 (B*7301); B78 (B*7801); B81 (B*8101); B82 (B*8201); B13 (B*1301); B75 (B*1511); B61 (B*4006); B55 (B*5502).
Locus C	Cw1 (Cw*0102); Cw2 (Cw*0202); Cw10 (Cw*0302); Cw9 (Cw*0303); Cw10 (Cw*0304); Cw4 (Cw*0401); Cw5 (Cw*0501); Cw6 (Cw*0602); Cw7 (Cw*0702); Cw8 (Cw*0801); Cw12 (Cw*1203); Cw14 (Cw*1402); Cw15 (Cw*1502); Cw16 (Cw*1601); Cw17 (Cw*1701); Cw18 (Cw*1802).
Locus DP	DPB1*0101, DPA1*0201, DPB1*0201, DPA1*0103, DPB1*0301, DPA1*0103; DPB1*0401, DPA1*0103; DPB1*0402, DPA1*0103; DPB1*0501, DPA1*0201; DPB1*0901, DPA1*0201; DPB1*1001, DPA1*0201; DPB1*1101, DPA1*0201; DPB1*1301, DPA1*0401; DPB1*1401, DPA1*0201; DPB1*1701, DPA1*0201; DPB1*1901, DPA1*0201; DPB1*0202, DPA1*0201; DPB1*1501, DPA1*0201; DPB1*1801, DPA1*0201; DPB1*2301, DPA1*0201.
Locus DQ	DQB1*0201, DQA1*0201; DQB1*0201, DQA1*0301; DQB1*0201, DQA1*0501; DQB1*0202, DQA1*0201; DQB1*0401, DQA1*0201; DQB1*0402, DQA1*0201; DQB1*0402, DQA1*0401; DQB1*0501, DQA1*0101; DQB1*0502, DQA1*0102; DQB1*0601, DQA1*0103; DQB1*0602, DQA1*0102; DQB1*0301, DQA1*0301; DQB1*0301, DQA1*0303; DQA1*0505; DQB1*0301, DQA1*0601; DQB1*0302, DQA1*0101; DQB1*0302, DQA1*0301; DQB1*0303, DQA1*0301; DQB1*0303, DQA1*0201; DQB1*0302, DQA1*0301; DQB1*0201, DQA1*0401; DQB1*0301, DQA1*0503; DQB1*0301, DQA1*0505; DQB1*0303, DQA1*0302; DQB1*0304, DQA1*0301; DQB1*0401, DQA1*0303; DQB1*0602, DQA1*0101; DQB1*0603, DQA1*0103; DQB1*0604, DQA1*0102; DQB1*0609, DQA1*0102; DQB1*0302, DQA1*0101.)
Locus DR	DRB1*0101; DRB1*0102; DRB1*0103; DRB1*0301; DRB1*0302; DRB1*0401; DRB1*0404; DRB1*0405; DRB1*0701; DRB1*0801; DRB1*0901; DRB1*1001; DRB1*1101; DRB1*1201; DRB1*1301; DRB1*1303; DRB1*1401; DRB1*1501; DRB1*1502; DRB1*1601; DRB3*0101; DRB3*0202; DRB4*0101; DRB4*0103; DRB5*0101; DRB5*0202; DRB1*0402; DRB1*0403; DRB1*0902; DRB1*1202.

Para a análise, foi estabelecido um ponto de corte de positividade, sendo uma amostra considerada positiva quando apresentava uma mediana de intensidade de fluorescência acima de 500. Ponto esse já estabelecido rotineiramente no serviço de tipagem HLA do Laboratório de Imunologia do InCor. Primeiramente, os grupos do estudo foram comparados quanto ao percentual de indivíduos com anticorpos circulantes reativos contra antígenos HLA de classe I e II. Após essa análise, os indivíduos de cada grupo com anticorpos circulantes contra antígenos HLA, foram comparados quanto ao perfil de alelos HLA de classe I e II reconhecidos (HLA-A; B; C; DR; DQ e DP); à intensidade de reconhecimento dos antígenos HLA e seus alelos (ou seja, quanto maior a intensidade de reconhecimento maiores os títulos de anticorpos anti-HLA circulantes), e quanto à especificidade dos antígenos HLA reconhecidos no que diz respeito à reatividade contra antígenos do doador ou não.

3.7. Obtenção de células mononucleares periféricas do sangue.

As células mononucleares foram isoladas a partir do sangue de indivíduos adultos saudáveis e indivíduos transplantados, obtido por punção venosa em tubos contendo como anticoagulante, EDTA ou heparina.

As amostras de sangue coletadas foram diluídas 1:2 em solução salina isotônica e separadas em gradiente de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077g/l, Ficoll: Pharmacia Biotech, Sweden e Hypaque: Urografina 370, Schering, Brasil). Após a centrifugação a 600g por 25 minutos, as células mononucleares (PBMC do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*) foram coletadas, ressuspensas com salina e centrifugadas a 600g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sedimento celular foi lavado duas vezes. Nessas lavagens as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium, Gibco-BRL, Grand Island, NY,

EUA) suplementado com 2 mM L-Glutamina (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA), 10 mM Hepes (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA), 0,1 ng/ml de Perflacin (Rhodia, SP-Brasil), 1 mM de Piruvato de Sódio (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) e centrifugadas novamente a 600 g, por 8 minutos. As células foram ressuspensas em 10 ml de meio RPMI 1640 e centrifugadas a 400 g, por 8 minutos, para a remoção de plaquetas. As células foram ressuspensas em 3 ml de meio RPMI 1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Imunoquímica, RJ, Brasil). A concentração e viabilidade celular foram determinadas por contagem em câmara de Neubauer utilizando-se o corante vital Azul de Tripán (MCB Manufacturing Chemists Inc., Cincinnati, OH, EUA).

3.8. Congelamento e descongelamento de células

As suspensões de células mononucleares foram centrifugadas a 600g por 8 minutos e ressuspensas (5 a 20×10^6 células/ml) em solução de congelamento contendo 90% de SFB (Imunoquímica, RJ, Brasil), e 10% dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Aliquotas de 1 ml foram distribuídas em tubos de congelamento (TPP, Switzerland) previamente resfriados, e transferidos para freezers -80°C por um dia e, posteriormente, para tanques de nitrogênio líquido. Para o descongelamento, os tubos foram transferidos do nitrogênio líquido para o banho-maria a 37°C , até que o conteúdo estivesse parcialmente descongelado. Essa suspensão de células foi transferida para outro tubo contendo 10 ml de meio RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB. Após isso, as células foram centrifugadas a 600g por 8 minutos e ressuspensas em 10 ml de meio RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB, a viabilidade celular foi determinada através do corante vital Azul de Tripán (MCB

Manufacturing Chemists Inc., Cincinnati, OH, EUA) pela contagem em câmara de Neubauer.

3.9. Extração de RNA

O RNA foi extraído de acordo com o método (adaptado) proposto por Chomczynski em 1987 (Chomczynski e Sacchi, 1987), no qual se utiliza solução de Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) para o isolamento de RNA total. Trizol é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que rompe as células mantendo a integridade do RNA. Foi adicionado 1 ml de trizol para $1-5 \cdot 10^6$ células, homogeneizando-se a amostra por pipetagens repetidas. Após a homogeneização foram adicionados 200 µl de clorofórmio RNAase *free* (Merck, Darmstadt, Germany) puro por ml de trizol e a amostra foi agitada vigorosamente por 15 segundos. Após agitação, a amostra foi incubada por 2 a 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 12000 g por 15 minutos, a 4° C. Após a centrifugação, há uma separação de fases e o RNA encontra-se localizado na fase aquosa. Essa fase foi transferida para um novo tubo. Foi adicionado 1 µl de glycoblu (15mg/ml, Applied Biosystems/Ambion, Austin, Texas, EUA) e precipitada com 500 µl de isopropanol. A amostra foi agitada vigorosamente e congelada a -80°C. Após essa etapa as amostras foram descongeladas e centrifugadas por 20 minutos a 12000 g a 4° C. O sobrenadante foi removido e adicionaram-se 500 µl de etanol 75%. Centrifugou-se a amostra a 12000 g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento deixado secar até o botão mudar de cor. O botão foi, então, ressuspensionado em 12 µl de água DEPC (água tratada com Diethylpyrocarbonato, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Desse estoque, 1 µl foi usado para a quantificação

em espectrofotômetro e 1 µl para análise em gel de agarose 1,2%. Este material foi mantido a – 80°C até o momento da transcrição.

3.10. Quantificação de RNA

Após a extração, o RNA obtido foi quantificado pela leitura em espectrofotômetro (Beckman, DU530, Fullerton, CA, EUA) nos comprimentos de onda (λ) de 260 e 280 nm. O grau de pureza da amostra foi verificado através da análise da relação entre 260 e 280nm, sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores de razão entre 1,7 a 2,0. Para o cálculo da concentração da amostra considerou-se que a densidade ótica (DO) igual a 1 correspondia a 40 µg de RNA / ml no comprimento de onda de 260 nm (Sambrook & Russel, 2001).

Uma alíquota de RNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose RNAase free 1,2% para visualização da integridade das amostras, permitindo, assim, a observação das duas subunidades do RNA ribossômico, 18S e 28S, e também possíveis contaminações com DNA. Como marcador de massa molecular usou-se o High DNA Mass ladder da (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

3.11. Transcrição reversa

Após a constatação da qualidade e pureza do RNA, a transcrição reversa do RNA para cDNA foi feita com 3µg de RNA total, utilizando-se a enzima transcriptase reversa (Super-script II™ Reverse Transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Para este protocolo foram adicionados ao RNA 0,5µl de oligo dT (500 µg/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1µl de dNTP (10mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, resultando numa concentração final de 10µM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 0,5µl de random primers (100 µg/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e

água DEPC q.s.p. 12µl. Esta mistura foi aquecida a 65°C, por 5 minutos, em termociclador (MJ research, Inc., Watertown, MA, EUA). As amostras foram, então submetidas a 42°C por 2 minutos. Nessa etapa, fez-se uma pausa para a adição, ao tubo de reação, de 4µl de tampão de transcrição 5x, 2µl de DTT 0,1M e 1µl de inibidor de RNAase (40U/µl) (RNAase OUT™, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 1µl da enzima transcriptase reversa (200U/µl). Após essa pausa a reação continuou a 42°C por 50 minutos e, posteriormente, a 70°C por 15 minutos.

3.12. Reação de PCR para Hipoxantina Fosforibosil Transferase (HPRT, do inglês, *hypoxanthine phosphoribosyl transferase*)

A enzima HPRT tem papel importante na síntese de nucleotídeos e está presente constitutivamente nas células, sendo utilizada como controle de expressão de gene endógeno para a validação da reação de transcrição do RNA em cDNA. Para esta reação foram utilizados 1µl do cDNA transcrito, tampão para PCR 10X (200mM Tris-HCl e 500mM KCl) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1,5mM MgCl₂ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 250µM dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 0,3 µM de cada *primer* (Tabela 3), 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (5 U/µl) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e água miliq q.s.p. 10µl. A reação foi processada em termociclador (MJ research, Inc., Watertown, MA, EUA) por 35 ciclos que compreendem: desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguidos de anelamento a 58°C por 30 segundos, extensão por 30 segundos, a 72°C, e uma extensão final de 5 minutos, a 72°C. O produto desta reação foi carregado em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo (0,5µg/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e submetido à corrida eletroforética a 100V durante 40 minutos. O tamanho esperado do produto de PCR é de 289 pares de base.

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados na amplificação da enzima HPRT.

<i>“Primers”</i>	Sequência em nucleotídeos
HPRT 5’	5’ CCT GCT GGA TTA CAT CAA AGC ACT 3’
HPRT 3’	5’ AGG ACC CCA CGA AGT GTT GGA 3’

3.13. Desenho e aperfeiçoamento dos iniciadores para o *Immunoscope*

As sequências dos iniciadores (*primers*) utilizados nas reações de amplificação das 7 famílias (VH1 a VH7) de imunoglobulinas foram cedidas gentilmente pela pesquisadora do INSERM U668, Institut Pasteur, Paris, France, Dra. Annick Lim (Lim *et al.*, 2008). As sequências dos primers foram, então, checadas uma a uma quanto a sua capacidade de anelamento utilizando-se o programa de bioinformática BioEdit (Hall, 2007), por meio do alinhamento da sequência dos primers com as sequências germinais das famílias das imunoglobulinas depositadas no *international ImMunoGeneTics information system* (<http://imgt.cines.fr/>). Além disso, os primers foram analisados quanto a sua especificidade pela família a ser amplificada. Após essa análise os primers foram otimizados quanto a sua especificidade e aperfeiçoados no sentido de facilitar a reação de PCR. Por exemplo, primers com sequências muito similares foram fusionados em um só utilizando-se bases nitrogenadas degeneradas. O tamanho dos iniciadores variou de 16 a 24 bases. As sequências dos primers utilizados são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4. Sequências dos iniciadores utilizados na técnica de *immunoscope* para amplificação das famílias VH do BCR.

Primer	Sequências	Tamanho do Produto Amplificado	
		Utilizando o Seguinte Primer Reverso:	
		IgG (pb)	IgM (pb)
VH1	5'-TGGAGCTGAGSAGSCTGAGATCYGA-3'	170 – 270	111 – 211
VH2	5'-AACCCACASAGACCCTCAC-3'	377 – 477	318 – 418
VH3	5'-TCCCTKARACTCTCCTGTRCAGC-3'	369 – 469	310 – 410
VH4	5'-CTACAACCCSTCCCTCAAGAGT-3'	235 – 335	176 – 276
VH5	5'-CAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGC-3'	185 – 285	126 – 226
VH6	5'-TCCGGGGACAGTGTCTCT-3'	358 – 458	299 – 399
VH7	5'-CAGCACRGCATAYCTGCAGATCAG-3'	184 – 284	125 – 225
IgG-FAM	5'-6Fam-AAGTAGTCCTTGACCAGGCAGC-3'	-	-
IgM-FAM	5'-6Fam-GGAGACGAGGGGGAAAAGG-3'	-	-

BCR: Receptor de célula B. IgG – Imunoglobulina G; IgM – Imunoglobulina M; pb – pares de base; FAM – Fluorófilo 6FAM fusionado à região 5' dos primers citados; VH1-VH7: primers para cada uma das famílias de imunoglobulinas. Nas colunas indicando o tamanho em pb do produto amplificado é mostrado o intervalo dos possíveis tamanhos produzidos após a reação de *immunoscope*.

3.14. *Immunoscope* – Análise do repertório de linfócitos B – segmento

VH-C μ e VH-C γ

Esta técnica permite a análise da diversidade do repertório de linfócitos B tanto do isotipo IgM quanto IgG e a detecção de populações celulares em expansão clonal (Pannetier *et al.*, 1993; Pannetier *et al.*, 1995). Esta técnica consiste na amplificação por PCR dos segmentos VH do BCR utilizando-se *primers* específicos para cada uma das famílias (VH1 – VH7). Foram utilizados dois primers reversos diferentes, um específico para a região constante da IgM e outro da IgG ambos marcados com o fluorófilo 6FAM, que permite a detecção dos segmentos amplificados no sequenciador automático. Nessas reações foram amplificados os

segmentos gênicos que contêm a região determinante de complementariedade - CDR3 (do inglês, “*Complementarity Determining Region*”) do BCR, uma vez que sua localização está entre os segmentos V-D-J, região flanqueada pelos primers. Em seguida, os segmentos amplificados foram separados em gel de sequenciamento, que nos permitiu realizar separações de amplicons com diferenças de tamanho de 3 nucleotídeos, ou seja, o equivalente a 1 aminoácido e, assim, possibilitando avaliar a diversidade dos diferentes tamanhos de CDR3 expressos pela população de células B. Após isso, os dados gerados foram analisados utilizando-se o *software Gene Mapper™* (Applied Biosystems, EUA). Com esta análise, foi possível estimar a frequência de cada família VH no repertório do BCR, calcular o tamanho (em pares de bases) e analisar a distribuição (gaussiana ou não gaussiana) dos clones expressando diferentes tamanhos da região do CDR3, nas células B dos sujeitos de pesquisa.

3.15. Reação de PCR para o *Immunoscope*

Após a amplificação do cDNA com os primers para HPRT, foi, então, procedida a reação de PCR para amplificação dos transcritos correspondendo à região CDR3 de cada família VH. Dessa forma, foram adicionados a cada tubo 0,3 µl de cDNA, 0,5 µl dos respectivos primers forward e reverso a 10mM (concentração final de 500 µM), 0,1 µl de dNTPs a 10mM (concentração final de 100 µM), 0,2 µl de MgCl₂ 50mM (concentração final de 1,0 mM), 1 µl de tampão 10x (500mM KCl e 100mM Tris-HCl) para taq polimerase, 1U de Taq polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e H₂O Miliq q.s.p 10 µl. Essa reação foi, então, submetida ao termociclador (MJ research, Inc., Watertown, MA, EUA) sob o

seguinte programa: um ciclo a 94 °C por 1:30 min; 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 65 °C por 45 s, 72 °C por 45 s; e um último ciclo de 72 °C por 7 min.

3.16. Reações de eletroforese em sequenciador automático para o *Immunoscope*.

Após submetidas à PCRs, as amostras foram, então, preparadas e submetidas ao sequenciador automático 3130 genetic analyser (Applied Biosystems. Foster City, CA, EUA) para separação dos diferentes fragmentos amplificados da região CDR3 e, assim, obtermos o perfil de distribuição dos tamanhos de CDR3. Para tal, 2 µl do produto marcado de PCR foram adicionados de 7,75 µl de formamida (Applied Biosystems. Foster City, CA, EUA) e de 0,25 µl do marcador de tamanho molecular GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems. Foster City, CA, EUA). Essa reação foi, então, submetida ao termociclador (MJ research, Inc., Watertown, MA, EUA) a 95 °C, por 4 min, para desnaturação do DNA e, depois, colocada imediatamente no gelo. Após essa etapa, a amostra foi submetida à corrida no sequenciador automático utilizando-se capilares de 50 cm e o polímero POP-7™ (Applied Biosystems. Foster City, CA, EUA). O sequenciador automático consegue captar a fluorescência emitida por cada amplicon marcado com o primer com 6FAM, e os resultados obtidos refletem o perfil de distribuição do comprimento da região CDR3.

3.17. Perfil e cálculo do tamanho da região CDR3 do BCR e da frequência das famílias VH, pelo método de BCRVH CDR3 *Spectratyping*.

A região CDR3 está compreendida na junção das regiões V-D-J da cadeia variável pesada do BCR. Considerando-se que a posição dos *primers* VH e Cµ ou γ utilizados é fixa, o tamanho observado para o produto de PCR VH-Cµ ou γ marcado

depende do tamanho da junção V-D-J de cada BCR específico. Os resultados obtidos foram, então, analisados para cálculo de cada segmento CDR3 pelo *software Gene Mapper™* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) sendo comparados com um marcador de peso molecular conjugado com fluorófilo Rox (GeneScan 500 ROX™ Size Standard, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), que foi aplicado junto com as amostras analisadas na reação de eletroforese. Cada fragmento determinado pelo tamanho em pares de bases corresponde a uma CDR3 com um número específico de aminoácidos. Sendo assim, como cada 3 pares de base correspondem a 1 resíduo de aminoácido é possível definir o número de aminoácidos de cada segmento de CDR3 para uma determinada família VH.

A distribuição dos segmentos de CDR3 pode apresentar um perfil policlonal normal com distribuição como uma curva de Gauss, com segmentos variando entre 1 a 25 resíduos de aminoácidos (Lim *et al.*, 2008). Pode ser observado também um perfil policlonal anormal, não apresentando uma distribuição gaussiana, ou até perfis com poucos picos de CDR3 (sugestivo de oligoclonalidade), ou com pico único de CDR3, sugerindo um processo de células B em expansão clonal. Após a corrida eletroforética em sequenciador automático e a análise pelo software Gene Mapper™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), foram gerados gráficos de distribuição dos segmentos da região CDR3.

Os gráficos (ou espectros) representam a intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias, de acordo com o tamanho da região CDR3 em pares de bases. As informações geradas a partir da análise incluem o tamanho da região CDR3 amplificada (pico) (expresso em pares de bases) e a altura e área de cada pico. Foram considerados positivos os tamanhos de CDR3 com intensidade de fluorescência igual

ou maior do que 60 unidades arbitrárias. Ponto esse, baseado nas observações dos espectros dos sujeitos de pesquisa onde valores abaixo de 60, geralmente, se caracterizavam como background da reação. Os gráficos gerados assim como os dados brutos da intensidade de fluorescência dos picos e seus tamanhos, foram então, extraídos do software GeneMapper e convertidos em arquivos compatíveis com o software *Iseapeaks* (Collette e Six, 2002), desenvolvido exclusivamente para análise em larga escala de dados gerados pela técnica de *Immunoscope*, em colaboração com os pesquisadores Adrien Six e Wahiba Chaara da Universidade Pierre et Marie Curie, Paris, França. Essa conversão se fez necessária porque o software *Iseapeaks* é datado de 2002 e foi projetado para a análise de reações geradas em sequenciadores de gel e não de capilar, o qual foi utilizado no presente projeto. Esse programa permitiu o cálculo da frequência de cada pico de CDR3 de cada família VH e a frequência total de cada família VH para uma determinada amostra, a partir das fórmulas: $\%VH_n = (\text{área pico } VH_n / \Sigma \text{ área de todos } VH_n) \times 100$ e $\%VH \text{ total} = (\Sigma \text{ área de todos os picos } VH / \Sigma \text{ área de todos } VH) \times 100$, respectivamente (Pannetier *et al.*, 1993; Fae *et al.*, 2004). Além disso, permitiu uma análise sistemática das expansões da representatividade de tamanhos de CDR3 específicos em cada uma das famílias de imunoglobulinas, permitindo a visualização de diferenças no perfil de distribuição de cada tamanho de CDR3 no repertório de células B dos indivíduos de estudo.

3.18. Análise dos resultados do *Immunoscope* gerados no programa *Iseapeaks*.

Como análise inicial, foi observada a diversidade clonal de cada família VH (VH1-VH7) do repertório de IgM e IgG de cada indivíduo. Foi adotado como critério, atribuir um ponto para cada tamanho distinto de CDR3 expresso no

repertório de cada indivíduo (ou seja, um ponto para cada conjunto de clones com a CDR3 do BCR com o mesmo tamanho em número de aminoácidos). Dessa forma, uma pessoa apresentando 5 tamanhos distintos de CDR3 expressos na família VH2 do isotipo IgG ganha 5 pontos. Essa pontuação foi chamada de índice de complexidade e quanto maior o número de pontos mais complexo é o repertório do indivíduo. Dessa forma subdividimos a análise por família de cada isotipo (IgG e IgM). Foram analisados comparativamente todos os grupos do estudo para cada família de imunoglobulina, em cada isotipo. Para a diversidade total de cada isotipo, e para a diversidade global de todo o repertório.

Além dessa análise, foi observada também a representatividade de cada tamanho de CDR3 expresso dentro da respectiva família em termos percentuais. Essa representatividade foi normalizada em relação aos valores apresentados pelo grupo controle (Sau) e calculado o índice de estimulação relativa (RIS). Esse índice mostra quanto um determinado tamanho expresso de CDR3 é mais ou menos representado no repertório de cada indivíduo em relação ao grupo Sau. Quando o valor é igual a 1 significa que o tamanho de CDR3 expresso apresenta a mesma representatividade encontrada no grupo de saudáveis. Consideramos uma maior ou menor representatividade de um determinado tamanho de CDR3 em relação aos indivíduos saudáveis quando o RIS foi >2 ou $<0,5$, respectivamente. Dessa forma, foram realizadas análises comparativas entre os grupos de indivíduos transplantados, no intuito de se verificar a existência de tamanhos de CDR3 que poderiam estar representados de forma diferencial entre os grupos de pesquisa.

3.19. Purificação de células B CD19+CD24^{hi}CD38^{hi} (Bregs), CD19+CD24^{int}CD38^{int} (Naive) e CD19+CD24^{int}CD38⁻ (Memória) por citometria de fluxo para determinação do repertório do receptor de células B, por *Immunoscope*.

Células mononucleares do sangue de um indivíduo saudável doador de plaquetas no Banco de Sangue do Hospital das Clínicas foram obtidas a partir do peão de aférese utilizado no processo de doação de sangue. Essas células foram submetidas à separação por gradiente de Ficoll-Hypaque como descrito no item 3.4, alterando-se a diluição em salina de 1:2 para 1:10. Após a separação, obtivemos de 1×10^9 a 2×10^9 de células. A partir daí, 1×10^9 de células foram transferidas para um tubo FACS e lavadas pela adição de 4 ml de tampão MACS (PBS, BSA, 0.09% Azida e EDTA, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) e centrifugadas a 500g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 35 µl de anti-CD19-APC (*allophycocyanin*), 30 µl de CD24-FITC (*fluorescein isothiocyanate*) e 75 µl de CD38-PE-Cy5 (*phycoerythrin-cyanine dye 5*) humanos (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), com o intuito de distinguir as subpopulações de células B: Breg (CD19+CD24^{hi}CD38^{hi}), células B naïve (CD19+CD24^{int}CD38^{int}) e células B de memória (CD19+CD24^{int}CD38⁻) (Blair *et al.*, 2010). A marcação foi realizada no gelo, no escuro, por 30min e, depois, as células foram lavadas e centrifugadas 3 vezes, como já descrito, e ressuspensas em 1ml de tampão MACS. A partir desse ponto, as células foram submetidas ao citômetro FACS ARIA I (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) para separação das subpopulações de acordo com o seu fenótipo. Foi estipulado como quantidade mínima de células Bregs a serem purificadas o número de 5×10^5 células, para possibilitar a posterior extração de RNA.

Após a separação, 10000 células foram adquiridas para verificar a pureza da subpopulação e as células foram, então, submetidas à extração de RNA como descrito no item 3.9.

3.20. Avaliação da ativação da via de sinalização CD40/STAT3 em linfócitos B.

Células mononucleares do sangue periférico foram descongeladas, como descrito anteriormente. Após o descongelamento, as células foram mantidas em meio RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB, em estufa a 37°C, por 1 hora, para estabilização das funções celulares. Após esse período, foram determinadas a concentração e a viabilidade celular pela contagem em câmara de Neubauer e coloração com o corante vital Azul de Tripán (MCB Manufacturing Chemists Inc., Cincinnati, OH, EUA), respectivamente.

Após a determinação da viabilidade celular as células foram lavadas com PBS gelado, contendo 1% de SFB (PBS/SFB). A partir desse momento, todas as reações foram realizadas no gelo, com reagentes gelados, para evitar qualquer ativação das vias de sinalização inespecificamente. Além disso, todas as incubações para estimulação e marcação celular com anticorpos foram realizadas no escuro. Após a lavagem, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços com fundo em U na quantidade de 5×10^5 células/poço.

Foram plaqueadas células em duplicata, para cada condição. As células foram, então, centrifugadas a 500g, por 5 minutos, em centrífuga refrigerada (0-4°C). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 50 μ l de PBS/SFB, contendo 5 μ g/ml do anticorpo estimulador anti-CD40 humano purificado, feito em camundongo (clone-5C3, IgG1, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). As

estimulações foram realizadas utilizando-se 0,5 µg de antiCD40/10⁶ PBMCs. As células foram, então, incubadas 30 minutos no gelo no escuro. Após os 30 min as células foram lavadas com a adição de 150µl de PBS/SFB gelado e centrifugadas, como descrito acima. Depois da remoção do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 50µl de PBS/SFB gelado, contendo 10 µg/ml do anticorpo policlonal anti-Ig de camundongo feito em cabra (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), para realizar o *cross-link* do anticorpo anti-CD40 humano feito em camundongo. Os controles foram ressuspensos somente em PBS/SFB sem o anticorpo para o *cross-link* ou o anticorpo anti-CD40. As células foram incubadas por 30min no gelo, no escuro, e, depois, lavadas e centrifugadas como já descrito.

Com o intuito de distinguir as subpopulações de células B, as amostras foram marcadas com os anticorpos anti-CD19-PE-Cy7 (*phycoerythrin-cyanine dye 7*) ou APC, anti-CD24-FITC e anti-CD38-PE-Cy5 humanos (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). A marcação foi realizada no gelo, no escuro, no volume final de 50 µl de PBS/SFB contendo 1,7; 1 e 2,5 µl de cada anticorpo por amostra, respectivamente. As células foram marcadas por 30min e depois lavadas e centrifugadas como já descrito.

Para iniciar a estimulação, as células foram ressuspensas em 50µl de PBS/SFB, pré-aquecido a 37°C, e mantido a 37°C em estufa, por 5 min. A estimulação foi interrompida pela adição de 100µl de BD *Cytofix/Cytoperm*TM *Fixation/Permeabilization Solution* (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) pré-aquecido a 37°C. As células foram, então, deixadas fixando e permeabilizando nessa solução, por 30min, a 37°C, na estufa. Depois as células foram lavadas pela adição de 50µl do tampão *Perm/Wash*TM (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e

centrifugadas como descrito acima. O sobrenadante foi descartado e adicionados 200 µl de Perm/Wash™ às células. As células foram incubadas por 30min no gelo, no escuro, para ajudar a permeabilização. Após essa etapa, as células foram centrifugadas, como acima, e ressuspensas em 40 µl de Perm/Wash™ adicionados de 10 µl do anticorpo anti-pStat3-PE Phosflow™ pY705 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) por amostra. As células foram incubadas por 30min no gelo no escuro. As células foram, então, lavadas duas vezes com 200 µl de Perm/Wash™ e uma vez com 200 µl de tampão FACS (PBS, 0.5% SFB, 0.01% Azida). Finalmente, as células foram ressuspensas em 400 µl de tampão FACS. Em seguida, fez-se a aquisição da amostra no citômetro de fluxo FACS CantoII (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). A análise dos dados foi realizada no programa FlowJo 9.1. (Tree Star inc., Ashland, OR, EUA).

Um total de 300.000 eventos foram adquiridos na região de linfócitos. O cálculo do aumento da fosforilação de STAT3 foi feito comparando-se as condições com e sem estímulo, observando-se o aumento na mediana de intensidade de fluorescência (MFI) da condição estimulada sobre a não estimulada, para cada sujeito de pesquisa de cada grupo. Também, foi feita a análise do aumento no número de células positivas para STAT3 fosforilada (STAT3p+) após o estímulo e a razão entre as células STAT3p+ pós e pré-estímulo de cada indivíduo de cada grupo de pesquisa foi analisado comparativamente.

3.21. Avaliação da produção de IL-10 intracelular em linfócitos B após a ativação in vitro com CD40 ligante.

Células mononucleares do sangue foram descongeladas, como descrito anteriormente. Após o descongelamento as células foram mantidas em meio RPMI

1640 acrescido de 10% de SFB em estufa a 37°C, por 1 hora, para estabilização das funções celulares. Após esse período, foram determinadas a concentração e a viabilidade celular pela contagem em câmara de Neubauer e pela coloração com o corante vital Azul de Tripan (MCB Manufacturing Chemists Inc., Cincinnati, OH, EUA), respectivamente.

Após a determinação da viabilidade celular, 1×10^6 células foram plaqueadas em placas de 24 poços com fundo chato contendo 1 ml de meio RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB. Foram realizadas duas condições por indivíduo, uma com estímulo e outra sem estímulo (controle basal). Nas condições com estímulo, foi adicionado CD40 ligante recombinante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a uma concentração de 2 µg/ml de cultura. As células foram incubadas por 72h a 37 °C com 5% de CO₂ em estufa. Após as 72h, foram adicionados, em todos os poços, 50 ng/ml PMA e 500ng/ml de ionomicina para ativação celular. Após 1h da adição de PMA e ionomicina, foi adicionado 1 µl de Brefeldina A (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), de acordo com instruções do fabricante, para parar o tráfego intracelular e bloquear a secreção de citocinas. Após a adição de brefeldina as células foram mantidas mais 3h em estufa a 37°C.

Após o período de cultura, as células foram ressuspensas e passadas para um microtubo de 1,5ml. As células foram, então, centrifugadas a 600g por 5 min, a 4°C. O sobrenadante foi retirado e guardado a -20°C para futuras análises. As células, por sua vez, foram ressuspensas em 150 µl de PBS/SFB gelado e transferidas para uma placa de 96 poços com fundo em U. Elas foram centrifugadas 500g por 5 minutos, a 4°C.

Com o intuito de distinguir as subpopulações de células B, as amostras foram marcadas com os anticorpos anti-CD19-PE-Cy7 ou APC, anti-CD24-FITC e anti-CD38-PE-Cy5 humanos (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). A marcação foi realizada no gelo, no escuro, no volume final de 50 µl de PBS/SFB, por amostra, contendo 1,7; 1 e 2,5 µl de cada anticorpo, respectivamente. As células foram marcadas por 30min e depois, lavadas com a adição de 150µl de PBS/SFB gelado e centrifugadas, como descrito acima.

Para iniciar a marcação intracelular as células foram fixadas pela adição de 100 µl de BD *Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution* (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) gelado. As células foram, então, deixadas fixando e permeabilizando nessa solução por 30min a 4°C. As células foram, então, lavadas pela adição de 100µl do tampão *Perm/Wash™* (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e centrifugadas como acima. O sobrenadante foi descartado e adicionados 200 µl de *Perm/Wash™*. As células foram incubadas por 30min, no gelo, no escuro, para ajudar a permeabilização. Após essa etapa, as células foram centrifugadas como acima e ressuspensas em 47 µl de *Perm/Wash™* adicionados de 3 µl do anticorpo anti-IL-10-PE (Clone JES3-19F, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), por amostra. As células foram incubadas por 30min no gelo, no escuro. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com 200 µl de *Perm/Wash™* e uma vez com 200 µl de tampão FACS (PBS, 0.5% SFB, 0.01% Azida). Finalmente, as células foram ressuspensas em 400 µl de tampão FACS. Em seguida, fez-se a aquisição da amostra no citômetro de fluxo FACS CantoII (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). A análise dos dados foi realizada no programa FlowJo 9.1. (Tree Star inc., Ashland, OR, EUA). Um total de 300.000 eventos foram adquiridos na região de linfócitos.

3.22. Análises estatísticas

Foram utilizados testes paramétricos como, o one way ANOVA seguido do teste de turkey, para a comparação entre os diversos grupos clínicos, para analisar os dados gerados na técnica de *immunoscope* e nos demais casos em que houve uma distribuição normal das variáveis. Testes não paramétricos como o Kruskal-wallis, seguido do teste Dunn`s, foram utilizados para a comparação dos diversos grupos, na análise dos dados da sinalização da via CD40/STAT3 e para os eventos que não mostraram uma distribuição normal. As análises estatísticas foram feitas com o programa Prism 5.0 (GraphPad Software inc., CA, EUA).

4. Resultados

4.1 Dados clínicos

Os indivíduos do presente estudo provêm de dois centros integrantes do estudo multicêntrico em tolerância operacional “*Estudo do perfil imunológico regulador em indivíduos com longo tempo de transplante de órgãos sólidos, em estado de tolerância operacional: bases para novas estratégias terapêuticas imunomoduladoras na clínica*”. No total, são 4 indivíduos provenientes do Rio Grande do Sul (PUC-RS) e 58 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os dados demográficos dos indivíduos estão mostrados na Tabela 5. Informações mais detalhadas estão dispostas nas Tabelas 14 a 16 do Anexo B. A função renal foi determinada pela concentração de creatinina sérica (Figura 2). Os indivíduos com rejeição crônica apresentaram um valor médio de creatinina maior em relação aos demais grupos clínicos, sendo significativa em relação aos grupos Est e Sau ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) (Figura 2). Dos 13 indivíduos diagnosticados com rejeição crônica, 3 apresentavam depósitos de C4d nas biópsias, sendo classificados como rejeição crônica mediada por anticorpos. Os demais 10 indivíduos foram classificados como rejeição crônica mediada por células T. A classificação histopatológica das biópsias foi feita de acordo com os critérios de Banff de 1997 (Racusen *et al.*, 1999) e revisada para verificação da presença de C4d, de acordo com os parâmetros de Banff de 2005 (Solez *et al.*, 2007).

Tabela 5. Dados demográficos e clínicos dos sujeitos de pesquisa.

Indivíduo de Estudo	Grupo TO (n=5)					Grupo RC (n=13)	Grupo Est (n=19)	Grupo Sau (n=11)
	Ltx03	Ltx08	Ltx10	Ltx16	Ltx62			
Idade (anos)	53	42	43	49	32	44 (27-64)	50 (25-78)	41 (30-57)
Sexo (F/M)	M	M	F	F	M	4 , 9	10 , 9	6 , 5
Número de transplantes	1	2	1	1	1	1 (n = 13)	1 (n = 18) 2 (n = 1)	NA
Tempo de transplante (anos)	23	5	7	23	13	8 (4-13)	8 (1-34)	NA
Terapia de Indução	ND	Ac. Anti-CD25	N	N	N	5/13 Ac. Anti-CD25 = 4 ATG = 1	14/19 Ac. Anti-CD25 = 13 ATG + IVIG = 1	NA
Disparidades HLA	3	4	0	0	3	4,45 ± 1,75 (n=11) ND (n=2)	3,83 ± 1,30 (n = 18) ND (n=1)	NA
Doador (vivo , falecido)	Vivo	Falecido	Vivo	Vivo	Vivo	6 , 7	16 , 3	NA
Transfusão de Sangue (S , N)	ND	S	N	S	N	6 , 3 ND (n=4)	11 , 3 ND (n=5)	ND
Episódio de rejeição aguda (S , N)	N	S	N	N	N	8 , 5	6 , 13	NA
Doença de Base	GNMP	GNC	NDI	GNC	GESF	GNC (n= 8) IRD (n=3) NH(n=1) NR(N=1)	GNC (n=7) IRD (n=3) NH (n= 3) NDI (n=1) NL(n=1) Pie (n=2) NI(n=1) ET (n=1)	NA
Infecção Viral (S , N)	ND	S	ND	N	N	7 , 5	4 , 15	ND
Razão para interrupção da IS	Não adesão	Não adesão	Não adesão	Não adesão	Não adesão	NA	NA	NA
Tempo sem IS (anos)	6	1,5	4,1	8	4	NA	NA	NA

TO: Indivíduos em Tolerância operacional; RC: indivíduos com rejeição crônica; Est: Indivíduos com função estável do enxerto e imunossupressão convencional. Sau: Indivíduos saudáveis doadores renais. ND: Informação não disponível. NA: Não se aplica. IS: Imunossupressão. F/M: feminino/masculino. S/N: Sim/Não. Dados representados como média ± desvio padrão. Basilixmab: Anticorpo humanizado anti-CD25. Daclizumab: Anticorpo quimérico anti-CD25. ATG: globulina anti-timocitária. IVIG: Imunoglobulina intravenosa. HLA: antígenos leucocitários humanos. GNMP: Glomerulonefrite membranoproliferativa. GNC: Glomerulonefrite Crônica. NDI: Nefropatia Diabética. GESF: Glomerulonefrite esclerose segmentar focal. IRD: Insuficiência renal sem causa definida. NH: Nefrosclerose hipertensiva. NR: Nefropatia de refluxo. NL: Nefrite lúpica. Pie: Pielonefrite. NI: Nefropatia isquêmica. ET: Esclerose tuberosa. Ac: Anticorpo.

Figura 2. Creatinina sérica dos indivíduos transplantados renais. Valores da creatinina sérica individuais e as medianas por grupo. **RC:** Indivíduos com rejeição crônica (n=13); **Est:** Indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=19); **TO:** Indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=5); **Sau:** Indivíduos saudáveis doadores renais (n=9). A análise estatística foi feita utilizando-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Não houve diferença estatística com o grupo TO. A linha horizontal em cada grupo clínico representa a média do grupo.

Além dessas análises, realizamos testes para verificar a existência de associações entre diversos dados clínicos e demográficos nos grupos de estudo RC, Est e TO. Foram testadas associações entre o estado clínico dos indivíduos, a idade, sexo, doença de base, tempo de transplante, tipo de doador (vivo ou falecido), tempo de isquemia do enxerto, função retardada do enxerto, terapia de indução, ocorrência de episódio de rejeição aguda, terapia de imunossupressão inicial e comorbidades. Somente o tipo de doador e a função retardada do enxerto apresentaram uma associação significativa, diferenciando os grupos RC e Est (Teste exato de Fisher) (Figuras 3 e 4). O grupo Est apresentou preponderantemente doadores vivos ($p = 0,0494$) e menos casos de função retardada do enxerto ($p = 0,0394$). O grupo RC apresentou uma tendência oposta à apresentada pelo grupo Est. Não observamos

diferenças estatísticas entre RC e TO e Est e TO, dentre todos os parâmetros. Entretanto, o perfil apresentando por TO foi semelhante ao apresentado pelo grupo Est para todos os parâmetros clínicos.

Figura 3. Tipos de doador presentes nos grupos de estudo. Foram comparados os números de doadores vivos e falecidos nos diversos grupos de estudo. Somente os grupos Est e RC apresentaram diferença estatística. **RC:** Indivíduos com rejeição crônica (n=13); **Est:** Indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=19); **TO:** Indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=5). A análise estatística foi feita utilizando-se o teste exato de Fisher, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$. * $p < 0,05$.

Figura 4. Presença de função retardada do enxerto pós cirurgia nos grupos de estudo. Foram comparados os números de indivíduos com função retardada do enxerto nos diversos grupos de estudo. Somente os grupos Est e RC apresentaram diferença estatística. **RC:** Indivíduos com rejeição crônica (n=11); **Est:** Indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=15); **TO:** Indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=4). A análise estatística foi feita utilizando o teste exato de Fisher, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$. * $p < 0,05$.

4.2. Determinação da auto e aloreatividade mediadas por anticorpos do tipo IgG dirigidos a moléculas HLA.

Para se determinar o perfil de auto e aloanticorpos séricos contra moléculas HLA foi utilizada a técnica de luminex, como descrita no item 3.6. Além disso, foi avaliado se o perfil de reatividade contra as moléculas HLA poderia apresentar uma variabilidade ao longo tempo. Para isso, foram realizadas análises de 2 amostras de soros dos indivíduos do estudo coletadas em intervalos separados por 4 a 8 meses. Também foi utilizado como grupo comparativo indivíduos saudáveis doadores renais.

Foram analisados 48 indivíduos dos diferentes grupos do estudo. Na primeira etapa de análise foram realizados ensaios para determinar se os indivíduos de estudos apresentavam qualquer reatividade de anticorpo às moléculas HLA. Os resultados obtidos não nos mostraram diferenças significativas no número de indivíduos com anticorpos contra moléculas HLA entre os diversos grupos de estudo (Figura 5). No grupo de Tolerantes Operacionais (TO), 3 de 5 (60%) indivíduos apresentaram reatividade contra as moléculas HLA. O grupo de indivíduos com Rejeição Crônica (RC) teve 4 de 13 (31%) de indivíduos com anticorpos para moléculas HLA, já os grupos de indivíduos tomando dose habituais de imunossupressores e função estável do enxerto (Est) e indivíduos saudáveis doadores renais (Sau) apresentaram 8 de 19 (42%) e 5 de 11 (45%) indivíduos com anticorpos anti-HLA (acHLA) circulantes, respectivamente. Além disso, no grupo RC, composto por 13 indivíduos, somente 3 tiveram diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos com depósitos de C4d. Desses 3 indivíduos, 2 (Ltx05 e 26) apresentaram anticorpos acHLA. Já entre os

indivíduos que foram diagnosticados com rejeição crônica mediada por células (n=10), 2 (Ltx04 e 24) apresentaram anticorpos anti-HLA.

Figura 5. Indivíduos com anticorpos circulantes com reatividade contra um painel de antígenos HLA. O soro dos indivíduos de estudos dos diversos grupos foi analisado quanto à ligação a antígenos HLA de classe I e II pela técnica de Luminex. **TO:** Indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=5); **RC:** Indivíduos com rejeição crônica (n=13); **Est:** Indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=19); **Sau:** Indivíduos saudáveis doadores renais (n=11). A análise estatística foi feita utilizando-se o teste exato de Fisher entre os diferentes grupos, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$. Não houve diferença significativa.

Quando o perfil de reatividade foi analisado, separadamente, de acordo com a classe de molécula HLA, também não observamos diferenças estatísticas entre os diferentes grupos (Figura 6). No grupo TO, 2 de 5 dos indivíduos (indivíduos Ltx08 e 16; 40%) apresentaram reatividade contra moléculas HLA de classe I e para de classe II (Indivíduos Ltx08 e 62). O grupo RC apresentou 2 de 13 indivíduos (Indivíduos Ltx04 e 05; 15%) com anticorpos reativos às moléculas HLA de classe I e 3 de 13 para classe II (Indivíduos Ltx 05, 24 e 26; 23%). Os grupos Est e Sau apresentaram reatividade em 6 de 19 (Indivíduos Ltx11, 17, 21, 22, 23 e 70; 32%) e 4 de 11 (Indivíduos Ltx18, 38, 39 e 40; 36%) para classe I e em 3 de 19 (Indivíduos

Ltx12, 14 e 23; 15%) e 2 de 11 (Indivíduos Ltx37 e 39; 18%) para classe II, respectivamente.

Figura 6. Indivíduos com anticorpos circulantes com reatividade contra antígenos HLA de classe I e II. **A:** Indivíduos com anticorpos contra antígenos HLA de classe I. **B:** Indivíduos com anticorpos contra antígenos HLA de classe II. O soro dos indivíduos de estudos dos diversos grupos foi analisado quanto à ligação a antígenos HLA de classe I e II pela técnica de luminex. **TO:** Indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=5); **RC:** Indivíduos com rejeição crônica (n=13); **Est:** Indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=19); **Sau:** Indivíduos saudáveis doadores renais (n=11). A análise estatística foi feita utilizando-se o teste exato de Fisher entre os diferentes grupos, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$. Não houve diferença significante.

Diante desses primeiros resultados não mostrarem diferenças entre os grupos de estudo, nos perguntamos se os anticorpos dos indivíduos com aCHLA poderiam apresentar um perfil de reatividade que os diferenciasssem. Para essa análise vale ressaltar que os dados exibidos são meramente descritivos visto o pequeno número de indivíduos que apresentaram aCHLA. Foram realizadas reações por Luminex para se determinar a especificidade da reatividade dos anticorpos HLA de classe I e II. Foi analisado, primeiramente, se havia alguma diferença em relação ao número de antígenos reconhecidos por cada grupo. Na Figura 7 pode-se observar que os grupos apresentaram um perfil de reconhecimento de antígenos similar, quando comparado

o conjunto de antígenos HLA de classe I e/ou II reconhecidos. Cada indivíduo reconheceu em média 9 antígenos HLA diferentes de classe I e/ou II.

Figura 7. Número de antígenos HLA de classe I e/ou II reconhecidos pelos indivíduos do estudo. Os soros dos indivíduos do estudo dos diversos grupos foram analisado quanto à ligação a antígenos HLA de classe I e II pela técnica de Luminex. **TO:** Indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=3); **RC:** Indivíduos com rejeição crônica (n=4); **Est:** Indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=8); **Sau:** Indivíduos saudáveis doadores renais (n=5). A análise estatística foi feita utilizando-se o teste não paramétrico Kruskal - Wallis, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$. Não houve diferença significativa. A linha horizontal em cada grupo clínico representa a média do grupo.

A partir daí, buscou-se analisar a intensidade de reatividade dos anticorpos anti-HLA quanto à mediana de intensidade de fluorescência gerada na reação. Para esta análise, foi estabelecida uma divisão de reatividade em três patamares: sendo consideradas baixa reatividade a fluorescência de 0 a 2500, média de 2500 a 7500 e alta acima de 7500 MFI (Mediana de Intensidade de Fluorescência, do inglês, *median fluorescence intensity*).

O grupo de tolerantes operacionais apresentou, principalmente, anticorpos com média a alta reatividade contra antígenos HLA de classe I, quando comparado com os grupos RC e Sau ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente) (Figura 8). O grupo

Est apresentou anticorpos com baixa a média reatividade, sendo superior ao do grupo Sau ($p<0,05$) (Figura 8). Quando analisado a qual alelo essa reatividade estava dirigida, observamos que a alta reatividade do grupo TO foi basicamente, devido ao reconhecimento de antígenos do alelo HLA-B, que foi significativamente mais alta quando comparada aos grupos RC, Est e Sau ($p<0,001$, $p<0,01$ e $p<0,05$, respectivamente) (Figura 9). Em contraste, para o alelo HLA-A, observamos uma reatividade mais baixa para o grupo TO, apresentando diferença somente em relação ao grupo Sau ($p<0,01$) (Figura 9).

Figura 8. Intensidade de reconhecimento de todos os antígenos de classe I por anticorpos circulantes nos indivíduos do estudo. Os soros dos indivíduos do estudo foram analisados quanto à ligação a antígenos HLA de classe I pela técnica de Luminex. **TO:** Indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano ($n=2$, indivíduos Ltx08 e 16); **RC:** Indivíduos com rejeição crônica ($n=2$, indivíduos Ltx04 e 05); **Est:** Indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores ($n=6$, indivíduos Ltx11, 17, 21, 22, 23 e 70); **Sau:** Indivíduos saudáveis doadores renais ($n=4$, indivíduos Ltx18, 38, 39 e 40). As intensidades de fluorescência foram classificadas em três níveis de reatividade. Baixa reatividade: fluorescência de 0 a 2500, média reatividade: 2500 a 7500 e alta reatividade: > 7500 , divididas no gráfico pelas linhas verde e azul. Cada ponto representa um antígeno reconhecido dentro do grupo. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste não paramétrico Kruskal - Wallis, considerando-se diferença significativa $p< 0,05$. *** $p<0,001$, ** $p<0,01$, * $p<0,05$. A linha horizontal em cada grupo clínico representa a mediana do grupo.

Figura 9. Intensidade de reconhecimento dos antígenos de classe I HLA-A e HLA-B por anticorpos circulantes nos indivíduos do estudo. Os soros dos indivíduos de estudos foram analisados quanto à ligação a antígenos HLA de classe I pela técnica de Luminex. **A:** Anticorpos circulantes contra moléculas HLA-A **B:** Anticorpos circulantes contra moléculas HLA-B. **TO:** Indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=2, indivíduos Ltx08 e 16); **RC:** Indivíduos com rejeição crônica (n=2, indivíduos Ltx04 e 05); **Est:** Indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=6, indivíduos Ltx11, 17, 21, 22, 23 e 70); **Sau:** Indivíduos saudáveis doadores renais (n=4, indivíduos Ltx18, 38, 39 e 40). As intensidades de fluorescência foram classificadas em três níveis de reatividade. Baixa reatividade: fluorescência de 0 a 2500, média reatividade: 2500 a 7500 e alta reatividade: > 7500, divididas no gráfico pelas linhas verde e azul. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. A linha horizontal em cada grupo clínico representa a mediana do grupo.

Também observamos diferenças, entre os grupos, no perfil de reatividade contra antígenos HLA de classe II. O grupo RC apresentou, principalmente, anticorpos com alta reatividade, enquanto os grupos TO, Est e Sau apresentaram, principalmente, anticorpos com baixa a média reatividade ($p < 0,05$; $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) (Figura 10). O grupo TO foi o que apresentou o menor nível de reatividade, sendo o mais próximo ao grupo Sau. Analisando de uma forma mais detalhada, observamos que essa alta reatividade do grupo RC se devia a anticorpos dirigidos a antígenos HLA-DQ/DP quando comparada com os grupos TO e Est

($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) (Figura 11), enquanto que para antígenos DR não houve diferença entre os grupos (Figura 11).

Figura 10. Intensidade de reconhecimento de todos os antígenos de classe II por anticorpos circulantes nos indivíduos do estudo. Os soros dos indivíduos de estudo foram analisados quanto à ligação a antígenos HLA de classe II pela técnica de Luminex. **TO:** Indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=2, indivíduos Ltx08 e 62); **RC:** Indivíduos com rejeição crônica (n=3, indivíduos Ltx 05, 24 e 26); **Est:** Indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=3, indivíduos Ltx12, 14 e 23); **Sau:** Indivíduos saudáveis doadores renais (n=2, indivíduos Ltx37 e 39). As intensidades de fluorescência foram classificadas em três níveis de reatividade. Baixa reatividade: fluorescência de 0 a 2500, média reatividade: 2500 a 7500 e alta reatividade: > 7500, divididas no gráfico pelas linhas verde e azul. Cada ponto representa um antígeno reconhecido dentro do grupo. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste não paramétrico Kruskal - Wallis, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. A linha horizontal em cada grupo clínico representa a mediana do grupo.

Analisando a especificidade dos anticorpos dirigidos a antígenos HLA de classe I e II, observamos que, em todos os indivíduos, os anticorpos eram dirigidos a antígenos HLA alogênicos, não sendo detectados autoanticorpos anti-HLA. Também praticamente não observamos anticorpos anti-HLA dirigidos a antígenos do doador, no caso das moléculas HLA-A, HLA-B e HLA-DR (Tabelas 8, 9, 10 e 11 do Anexo A). As únicas exceções foram os indivíduos Ltx04, do grupo RC, que apresentou

anticorpos contra 20 aloantígenos HLA de classe I distintos (A2, B35, B44, B45, B49, B50, B51, B52, B53, B56, B57, B58, B62, B63, B71, B72, B75, B76, B77 e B8201) sendo o B51 doador específico e o Ltx70, do grupo Est, que apresentou anticorpos contra 6 aloantígenos HLA de classe I distintos (A29, A80, A1, A26, A36 e Cw1) sendo o A1 doador específico (Tabelas 8, 9, 10 e 11 do Anexo A). Com relação aos antígenos de classe II HLA-DQ e HLA-DP não podemos afirmar se os anticorpos presentes são doadores específicos ou não, visto que a tipificação para esses alelos não é realizada rotineiramente no serviço de tipificação de HLA.

Figura 11. Intensidade de reconhecimento dos antígenos de classe II HLA-DR e HLA-DQ/DP por anticorpos circulantes nos indivíduos do estudo. Os soros dos indivíduos de estudo foram analisados quanto à ligação a antígenos HLA de classe II pela técnica de Luminex. **A:** Anticorpos circulantes contra moléculas HLA-DR. **B:** Anticorpos circulantes contra moléculas HLA-DQ/DP. **TO:** Indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=2, indivíduos Ltx08 e 62); **RC:** Indivíduos com rejeição crônica (n=3, indivíduos Ltx 05, 24 e 26); **Est:** Indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=3, indivíduos Ltx12, 14 e 23); **Sau:** Indivíduos saudáveis doadores renais (n=2, indivíduos Ltx37 e 39). As intensidades de fluorescência foram classificadas em três níveis de reatividade. Baixa reatividade: fluorescência de 0 a 2500, média reatividade: 2500 a 7500 e alta reatividade: > 7500, divididas no gráfico pelas linhas verde e azul. Cada ponto representa um antígeno reconhecido dentro do grupo. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste não paramétrico Kruskal - Wallis, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. A linha horizontal em cada grupo clínico representa a mediana do grupo.

Outros fatores relacionados ao desenvolvimento de aloanticorpos não específicos a moléculas do doador são: o histórico de transfusões e gestações (no caso de mulheres). Para efeito de análise, dividimos o histórico de transfusões em grupos com < 2 e ≥ 2 transfusões (2 sendo a mediana de transfusões dos indivíduos de estudo), $n=5$ e 6 , respectivamente. O histórico de transfusões não apresentou associação com o número de antígenos HLA reconhecidos pelos aloanticorpos ($p=0,0547$). Em relação à gestação, também não houve associação entre a presença ou não de acHLA ($n=7$ e 9 , respectivamente) e gestações prévias ($p=0,3077$), provavelmente pelo baixo número de mulheres com acHLA. Também não foi observada relação entre o tempo de transplante e o número de alelos reconhecidos. Os indivíduos foram divididos em 2 grupos (Com < 7 e ≥ 7 anos de transplante, sendo 7 a mediana do tempo de transplante). Aqueles com < 7 anos ($n=7$) reconheceram $12 \pm 8,981$ antígenos HLA enquanto os com ≥ 7 anos ($n=8$) reconheceram $6,750 \pm 4,166$ ($p=0,2963$). Por último, não houve associação entre o número de disparidades HLA e o número de antígenos HLA reconhecidos pelos aloanticorpos. Os indivíduos foram divididos em 2 grupos (Com ≤ 3 e > 3 disparidades, 3 sendo a mediana de disparidades HLA). Aqueles com 3 ou menos disparidades ($n=8$) reconheceram $8,250 \pm 8,379$ antígenos HLA, enquanto os com > 3 disparidades ($n=7$) reconheceram $10,29 \pm 5,794$ ($p=0,3244$).

Observamos uma grande estabilidade da presença de anticorpos circulantes anti-HLA, ao longo do tempo. Dos 48 indivíduos analisados, 46 (95,8%) mantiveram o mesmo padrão de positividade ou negatividade em amostras coletadas, em intervalos de 4 a 8 meses. Somente os indivíduos do grupo Estável (Ltx11 e Ltx12) apresentaram uma mudança nesse padrão. O primeiro (Ltx11) possuía anticorpos

anti-HLA de classe I na primeira amostra (baixa reatividade e não doador específicos) e não apresentou na segunda e, o segundo (Ltx12), era negativo para tais anticorpos na primeira amostra e, após 8 meses, passou a apresentar anticorpos anti-HLA de classe II de baixa à média reatividade; todos não doador específicos, apesar de manter as mesmas condições terapêuticas no período.

4.3 Determinação da autorreatividade de anticorpos do isotipo IgG e IgM dirigidos a peptídeos da HSP60 humana.

A avaliação da autorreatividade a peptídeos da HSP60 mediada por anticorpos circulantes dos indivíduos transplantados foi realizada por ELISA, como descrito no item 3.5. Foram realizados ELISAs para 12 peptídeos da HSP60 (Figura 1), sendo 5 da região N terminal (N2, N4, N6, N7 e N10), 4 da região intermediária (I2, I5, I6 e I8) e 3 da região carboxi-terminal (C8, C9 e C10). Como controle positivo foi utilizado um *pool* de soros de indivíduos transplantados cardíacos, sabidamente com IgGs reativas ao peptídeo C9. Como controle negativo foi realizada a confecção de uma placa sensibilizada com gelatina (tampão de bloqueio) para a verificação da reatividade de cada indivíduo contra o tampão de bloqueio, visto que há, geralmente, alguma reatividade inespecífica contra gelatina e, também, para calcular o ponto de corte de positividade para os isotipos IgG e IgM.

Inicialmente, analisamos a frequência de indivíduos com anticorpos contra os peptídeos da HSP60, ou seja, indivíduos que apresentaram D.O.s com valores acima do ponto de corte de positividade. Não observamos diferenças claras na frequência de reconhecimento, para a maior parte dos peptídeos analisados, entre os grupos do estudo (Figuras 12, 13, 14, 15 e 16). De forma geral, observamos uma menor frequência de indivíduos com anticorpos do isotipo IgG contra peptídeos da HSP60

(Figura 12). Somente 35% (17 de 48) dos indivíduos reconheceram ao menos um peptídeo da HSP60, não havendo diferença significativa entre os grupos. Para anticorpos do isotipo IgM, observamos que 96% (46 de 48) dos indivíduos tinham anticorpos contra um peptídeo da HSP60 (Figura 12), mas, também, sem diferenças entre os grupos. Quando analisamos os peptídeos da HSP60, individualmente, para anticorpos dos isotipos IgG e IgM, observamos que para o peptídeo N2, o grupo TO apresentou uma maior frequência de reconhecimento, por anticorpos do isotipo IgM, do que o grupo Est (3 de 5, 60% versus 2 de 19, 11%; $p=0,0425$) (Figura 13). Em relação aos demais grupos não houve diferença estatística. Para os demais peptídeos não foram observadas diferenças significativas entre os grupos e nem reconhecimentos exclusivos de um determinado peptídeo pelo grupo TO ou TO e Sau (Figuras 13, 14, 15 e 16).

Figura 12. Frequência de indivíduos do estudo com anticorpos circulantes dos isotipos IgG e/ou IgM contra ao menos um peptídeo da HSP60 humana. TO: Tolerante Operacional (n=5); **RC:** Indivíduos transplantados renais em rejeição crônica (n=13); **Est:** Indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto utilizando doses habituais de imunossupressores (n=19); **Sau:** Indivíduos saudáveis (n=11). A análise estatística foi feita utilizando-se o teste exato de Fisher, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$.

Figura 13. Frequência de indivíduos do estudo com anticorpos circulantes do isotipo IgM contra os peptídeos I8, N2, N4, N6, N7 e N10 da HSP60 humana. TO: Tolerante Operacional (n=5); RC: Indivíduos transplantados renais em rejeição crônica (n=13); Est: Indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto utilizando doses habituais de imunossupressores (n=19); Sau: Indivíduos saudáveis (n=11). A análise estatística foi feita utilizando-se o teste exato de Fisher, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$. * $p < 0,05$.

Figura 14. Frequência de indivíduos do estudo com anticorpos circulantes do isotipo IgM contra os peptídeos C8, C9, C10, I2, I5 e I6 da HSP60 humana. TO: Tolerante Operacional (n=5); **RC:** Indivíduos transplantados renais em rejeição crônica (n=13); **Est:** Indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto utilizando doses habituais de imunossupressores (n=19); **Sau:** Indivíduos saudáveis (n=11). A análise estatística foi feita utilizando-se o teste exato de Fisher, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$.

Figura 15. Frequência de indivíduos do estudo com anticorpos circulantes do isotipo IgG contra os peptídeos I8, N2, N4 e N7 da HSP60 humana. TO: Tolerante Operacional (n=5); **RC:** Indivíduos transplantados renais em rejeição crônica (n=13); **Est:** Indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto utilizando doses habituais de imunossupressores (n=19); **Sau:** Indivíduos saudáveis (n=11). A análise estatística foi feita utilizando-se o teste exato de Fisher, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$.

Figura 16. Frequência de indivíduos do estudo com anticorpos circulantes do isotipo IgG contra os peptídeos C8, C9, I2, I5 e I6 da HSP60 humana. TO: Tolerante Operacional (n=5); **RC:** Indivíduos transplantados renais em rejeição crônica (n=13); **Est:** Indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto utilizando doses habituais de imunossupressores (n=19); **Sau:** Indivíduos saudáveis (n=11). A análise estatística foi feita utilizando-se o teste exato de Fisher, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$. * $p < 0,05$.

Verificamos, também, se havia diferenças na intensidade de reatividade entre os grupos. Ou seja, se as densidades óticas (D.O.s), que refletem os níveis circulantes de anticorpos, podiam diferenciar os grupos do estudo.

Nas Figuras 17, 18, 19 e, 20 observamos baixas densidades óticas (D.O.s) para anticorpos reativos aos peptídeos da HSP60, principalmente os do isotipo IgG, também, não havendo diferença significativa entre os diferentes grupos do estudo. Adotamos como ponto de corte de positividade a média da reatividade (D.O.) contra a gelatina somada de 2 desvios padrão; D.O de 0,184 para o isotipo IgM e de 0,304 para o isotipo IgG. A maior reatividade (D.O.s) apresentada por anticorpos do isotipo IgM foi observada para os peptídeos N4, N7, I2, I6 e C9 (Figuras 17 e 18). Não foi observado um reconhecimento diferencial por uma determinada região da proteína, por nenhum grupo do estudo, para esse isotipo. Já para o isotipo IgG observou-se um maior reconhecimento (D.O.s) dos peptídeos I6 e I8 da região intermediária (Figura 20) e um menor reconhecimento dos peptídeos da região N-terminal (Figura 19).

Figura 17. Reatividade de anticorpos do isotipo IgM contra os peptídeos N2, N4, N6, N7, N10 e I2 da HSP60 humana presentes no soro dos indivíduos do estudo. Os gráficos representam as dispersões da reatividade dirigida aos peptídeos da HSP60. As amostras dos indivíduos dos diferentes grupos clínicos foram analisadas por ELISA. As densidades ópticas (D.O.) foram obtidas a 490 nm. A linha horizontal em cada grupo clínico representa a mediana do grupo. **TO:** Tolerante Operacional (n=5); **RC:** Indivíduos transplantados renais em rejeição crônica (n=13); **Est:** Indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto utilizando doses habituais de imunossupressores (n=19); **Sau:** Indivíduos saudáveis (n=11). A linha pontilhada representa o ponto de corte de positividade, calculado pela média das D.Os da reatividade dos indivíduos contra a gelatina + 2 desvios padrão o que deu uma DO de 0,184. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste não paramétrico Kruskal - Wallis, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$.

Figura 18. Reatividade de anticorpos do isotipo IgM contra os peptídeos I5, I6, I8, C8, C9 e C10 da HSP60 humana presentes no soro dos indivíduos do estudo. Os gráficos representam as dispersões da reatividade dirigida aos peptídeos da HSP60. As amostras dos indivíduos dos diferentes grupos clínicos foram analisadas por ELISA. As densidades ópticas (D.O.) foram obtidas a 490 nm. A linha horizontal em cada grupo clínico representa a mediana do grupo. **TO:** Tolerante Operacional (n=5); **RC:** Indivíduos transplantados renais em rejeição crônica (n=13); **Est:** Indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto utilizando doses habituais de imunossupressores (n=19); **Sau:** Indivíduos saudáveis (n=11). A linha pontilhada representa o ponto de corte de positividade, calculado pela média das D.Os da reatividade dos indivíduos contra a gelatina + 2 desvios padrão o que deu uma DO de 0,184. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste não paramétrico Kruskal - Wallis, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$.

Figura 19. Reatividade de anticorpos do isotipo IgG contra os peptídeos N2, N4, N7, I2 e I5 da HSP60 humana presentes no soro dos indivíduos do estudo. Os gráficos representam as dispersões da reatividade dirigida aos peptídeos da HSP60. As amostras dos indivíduos dos diferentes grupos clínicos foram analisadas por ELISA. As densidades ópticas (D.O.) foram obtidas a 490 nm. A linha horizontal em cada grupo clínico representa a mediana do grupo. **TO:** Tolerante Operacional (n=5); **RC:** Indivíduos transplantados renais em rejeição crônica (n=13); **Est:** Indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto utilizando doses habituais de imunossupressores (n=19); **Sau:** Indivíduos saudáveis (n=11). A linha pontilhada representa o ponto de corte de positividade, calculado pela média das D.Os da reatividade dos indivíduos contra a gelatina + 2 desvios padrão o que deu uma DO de 0,304. Não foram realizados ensaios para os peptídeos C10, N6 e N10 para o isotipo IgG. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste não paramétrico Kruskal - Wallis, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$.

Figura 20. Reatividade de anticorpos do isotipo IgG contra os peptídeos I6, I8, C8 e C9 da HSP60 humana presentes no soro dos indivíduos do estudo. Os gráficos representam as dispersões da reatividade dirigida aos peptídeos da HSP60. As amostras dos indivíduos dos diferentes grupos clínicos foram analisadas por ELISA. As densidades ópticas (D.O.) foram obtidas a 490 nm. A linha horizontal em cada grupo clínico representa a mediana do grupo. **TO:** Tolerante Operacional (n=5); **RC:** Indivíduos transplantados renais em rejeição crônica (n=13); **Est:** Indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto utilizando doses habituais de imunossupressores (n=19); **Sau:** Indivíduos saudáveis (n=11). A linha pontilhada representa o ponto de corte de positividade, calculado pela média das D.Os da reatividade dos indivíduos contra a gelatina + 2 desvios padrão o que deu uma DO de 0,304. Não foram realizados ensaios para os peptídeos C10, N6 e N10 para o isotipo IgG. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste não paramétrico Kruskal - Wallis, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$.

Para verificar se a baixa reatividade dos anticorpos dirigidos a peptídeos da HSP60 se devia à baixa concentração de anticorpos no soro, realizamos um ensaio utilizando uma maior titulação do soro de 1:10, em vez de 1:100.

Observamos um aumento global na reatividade apresentada, utilizando-se essa titulação, entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 21). Além disso, observamos um aumento significativo na reatividade contra gelatina o que gerou um ponto de corte de positividade de 0,581 (Figura 21). Esse aumento da inespecificidade da reação, com a alta titulação de soro utilizada, levou a uma grande diminuição no número de indivíduos apresentando valores positivos de reatividade contra o antígeno (de 60% para 17%). Dessa forma, uma maior concentração de soro não permitiu uma melhor discriminação da reatividade entre os diferentes grupos de estudo.

Por último, analisamos se os indivíduos que apresentavam autorreatividade mediada por anticorpos do isotipo IgG contra os peptídeos da HSP60 apresentavam também alorreatividade contra os antígenos HLA descritos no item 4.2. Dos 17 indivíduos com anticorpos contra peptídeos da HSP60, 9 apresentaram anticorpos contra antígenos HLA (Ltx05, 12, 14, 24, 37, 38, 40, 62 e 70). Desses 9, 3 indivíduos são do grupo Sau, 2 do RC, 1 do TO e 3 do Est. Na Tabela 6 listamos os antígenos HLA e os peptídeos da HSP60 reconhecidos por esses indivíduos. Não observamos associações entre o autorreconhecimento de peptídeos da HSP60 com um padrão de aloantígenos HLA reconhecidos. Além disso, o baixo número de indivíduo não nos permite realizar inferências sobre os dados.

Figura 21. Autorreatividade contra o peptídeo N7 da HSP60 humana utilizando soro dos indivíduos dos diferentes grupos a uma titulação 1:10. Os gráficos representam as dispersões da reatividade mediada por anticorpos do isotipo IgM dirigida ao peptídeo N7 da HSP60 utilizando o soro dos indivíduos de estudo a uma titulação 1:10. As amostras dos indivíduos dos diferentes grupos clínicos foram analisadas por ELISA. As densidades ópticas (D.O.) foram obtidas a 490 nm. A linha horizontal em cada grupo clínico representa a mediana do grupo. **TO:** Tolerante Operacional (n=4); **RC:** Indivíduos transplantados renais em rejeição crônica (n=11); **Est:** Indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto utilizando doses habituais de imunossupressores (n=17); **Sau:** Indivíduos saudáveis (n=8). A linha pontilhada representa o ponto de corte de positividade, calculado pela média das D.O.s da reatividade dos indivíduos contra a gelatina + 2 desvios padrão o que deu uma DO de 0,581. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste não paramétrico Kruskal - Wallis, considerando diferença significativa $p < 0,05$.

Tabela 6. Antígenos HLA e peptídeos da HSP60 reconhecidos por IgGs de indivíduos do estudo.

Grupo	Indivíduo	Peptídeos da HSP60 reconhecidos	Antígenos HLA I/II reconhecidos
TO	Ltx08	-	A80; B42; B54; B55; B56; B67; B7; B81; B8201; Cw2; Cw4; Cw14; DP1
	Ltx10	I8	-
	Ltx16	-	A1; A11; A26; A36; A43; A80; B76; Cw2
	Ltx62	I2 e I8	DQ5; DQ6; DR7; DR12; DR13
RC	Ltx02	N4; N7; I2; I5; I6; I8; C8; C9	-
	Ltx04	-	A2; B35; B44; B45; B49; B50; B51; B52; B53; B56; B57; B58; B62; B63; B71; B72; B75; B76; B77; B8201
	Ltx05	I8	B13; B45; B49; B50; B56; B59; B8201; DQ2; DQ4; DQ7; DR16
	Ltx24	N7	DQ2; DQ4; DQ6; DQ7; DQ8; DQ9; DR9
	Ltx26		DQ2
Est	Ltx09	I8	-
	Ltx11	-	A11; A24; A32; B13; B37; B8; B8201; Cw4; Cw7
	Ltx12	I6, I8 e C9	DQ2; DQ4; DQ5; DQ7; DQ8; DQ9; DP1; DP3; DP14; DP17; DR53
	Ltx14	I2	DQ2; DQ7; DQ9; DR52
	Ltx17		B8201
	Ltx20	N7	-
	Ltx21		A31; A33
	Ltx22	-	B7; B27; B39; B42; B54; B55; B64; B67; B78; B8; B81; Cw10
	Ltx23	-	A1; A23; A24; A25; A32; A66; B13; B27; B37; B38; B44; B45; B47; B49; B50; B51; B52; B53; B55; B59; B63; B77; DQ4; DQ5; DQ6; DR15; DR16
	Ltx34	I8 e C9	-
	Ltx70	I2	A1; A26; A29; A36; A80; Cw1
Sau	Ltx18	-	A25; A26; A43; A66; A80
	Ltx36	I8	-
	Ltx37	I8	DR13
	Ltx38	I8	A1; A25; A26; A34; A66; B8201; Cw2; Cw7
	Ltx39	-	B7; B42; B48; B60; B81; DR11; DR12; DR13; DR14; DR17; DR18; DR7; DR8; DR9
	Ltx40	N7 e I6	A23; A24; A31; A33; B7; B13; B27; B48; B60; B61; B73; B81
	Ltx41	N2; N4; I2; I5; I6; I8; C8	-
	Ltx43	I8	-

A, B e Cw: Antígenos HLA de classe I. DQ, DP e DR: Antígenos HLA de classe II. **TO**: Tolerante Operacional, n=4; **RC**: Indivíduos transplantados renais em rejeição crônica, n=5; **Est**: Indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto utilizando doses habituais de imunossupressores, n=11; **Sau**: Indivíduos saudáveis, n=8. HSP60: *Heat Shock Protein 60*. HLA: *Human Leukocyte Antigen*. Estão representados somente os indivíduos apresentando anticorpos circulantes contra os peptídeos da HSP60 e/ou antígenos HLA.

4.4. Determinação do número de células B supressoras CD19+CD24^{hi}CD38^{hi} no sangue.

Com a recente identificação de uma população de células B com capacidade supressora, caracterizada pelo fenótipo CD19+CD24^{hi}CD38^{hi} (Bregs) (Blair *et al.*, 2010). Investigamos se os indivíduos em tolerância operacional possuíam números diferentes de Bregs no sangue em relação aos outros grupos do estudo.

Após o descongelamento de células (dos indivíduos do estudo) para a análise da via de sinalização CD40/STAT3, as células não estimuladas foram utilizadas para a determinação do percentual e número absoluto de Bregs e das subpopulações de células B, naive (CD19+CD24^{int}CD38^{int}) e de memória (CD19+CD24^{int}CD38⁻).

Incubamos 1×10^6 células com os anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos para as moléculas de superfície descritas acima, conforme descrito no item 3.20 do material e métodos. Inicialmente, selecionamos células individuais, (*singlets*) utilizando como parâmetro uma análise do tamanho pela área e altura. Adquirimos 300000 eventos dentro da região de linfócitos, determinada pelo tamanho e granulosidade das células. Dentro da região de linfócitos, selecionamos as células CD19 positivas (células B) e, a partir dessa população, delimitamos as três subpopulações de células B. A estratégia de seleção de regiões utilizada pode ser observada na Figura 22, onde apresentamos a análise de um indivíduo.

Figura 22. Estratégia para delimitação das regiões das subpopulações de células B para determinação dos números das células B supressoras $CD19+CD24^{hi}CD38^{hi}$ no sangue. A figura representa a delimitação das regiões das populações de (A) células B, (B) Bregs ($CD19+CD24^{hi}CD38^{hi}$), (C) Células B naive ($CD19+CD24^{int}CD38^{int}$) e (D) Células B de memória ($CD19+CD24^{int}CD38^{-}$) no citômetro de fluxo FACS CANTOII (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) de um indivíduo representativo. Primeiramente, foram delimitadas as áreas das células individuais com base no tamanho por altura e área (FSC-H x FSC-A) e, em seguida delimitou-se a região de linfócitos com base no tamanho e na granulosidade (FSC-A x SSC-A). Dentro da região de linfócitos foram selecionados linfócitos $CD19+$ e, finalmente, delimitaram-se as regiões das subpopulações de células B.

Na análise de todos os indivíduos dos diferentes grupos observamos, primeiramente, que os indivíduos do grupo RC apresentaram uma redução percentual e também em números absolutos dos números circulantes de células B, sendo estatisticamente significativa em relação ao grupo Sau ($p < 0,05$) (Figura 23). O grupo TO foi o que manteve os números de células B circulantes o mais similares àqueles apresentados pelos indivíduos saudáveis (Figura 23).

Quando analisamos a percentagem de células B supressoras $CD19+CD24^{hi}CD38^{hi}$, observamos que o grupo TO apresentava números similares àqueles apresentados por indivíduos saudáveis, enquanto que os grupos RC e Est apresentaram uma redução nos números percentuais dessa população em relação a TO ($p<0,05$) (Figura 24A).

Figura 23. Porcentagem e números absolutos de células B do sangue nos diferentes grupos de estudo. (A) Porcentagem de células B CD19+ circulantes nos indivíduos do estudo. (B) Números absolutos de células B CD19+ circulantes nos indivíduos do estudo. O número absoluto de células CD19+ foi calculado com base no hemograma dos indivíduos de estudo no momento da coleta do sangue. **TO:** Indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=5); **RC:** Indivíduos com rejeição crônica (n=10); **Est:** Indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=19); **Sau:** Indivíduos saudáveis doadores renais utilizados como controles (n=10). A análise estatística foi feita utilizando-se o teste não paramétrico Kruskal - Wallis, considerando-se diferença significativa $p<0,05$. * $p<0,05$; A linha horizontal em cada grupo clínico representa a mediana do grupo.

Figura 24. Porcentagem e número absoluto de subpopulações de células B do sangue nos diferentes grupos de estudo. (A) Porcentagem e (B) Número absoluto de células B supressoras CD19+CD24^{hi}CD38^{hi} do sangue nos indivíduos de estudo. (C) Porcentagem e (D) Número absoluto de células B naíve maduras CD19+CD24^{int}CD38^{int} do sangue nos indivíduos de estudo. (E) Porcentagem e (F) Número absoluto de células B de memória CD19+CD24^{int}CD38⁻ do sangue nos indivíduos de estudo. O número absoluto das subpopulações de células B foi calculado com base no hemograma dos indivíduos de estudo no momento da coleta do sangue. TO: Indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=5); RC: Indivíduos com rejeição crônica (n=10); Est: Indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=19); Sau: Indivíduos saudáveis doadores renais utilizados como controles (n=10). A análise estatística foi feita utilizando-se o teste não paramétrico Kruskal - Wallis, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; A linha horizontal em cada grupo clínico representa a mediana do grupo.

Em relação aos números absolutos de Bregs, o grupo TO manteve a similaridade com o grupo Sau (Figura 24B). Esses dois grupos apresentaram diferença significativa no número circulante de Bregs em relação ao grupo RC (Figura 24B). Para a subpopulação de células B naive maduras, $CD19+CD24^{int}CD38^{int}$, não foi observada diferença estatística tanto para os números percentuais de células como para o número absoluto entre os diferentes grupos analisados (Figura 24C e D), apesar de uma redução do número absoluto dessa subpopulação entre indivíduos do grupo RC e, em menor intensidade, em Est (Figura 24D). Finalmente, quando analisada a subpopulação de células B de memória, $CD19+CD24^{int}CD38^{-}$, observamos uma similaridade no percentual de células circulantes entre todos os grupos do estudo (Figura 24E), enquanto que para os números absolutos, o grupo RC apresentou uma redução significativa em relação ao grupo Sau ($P<0,01$) (Figura 24F). Os grupos TO e Est apresentaram números absolutos intermediários entre os grupos RC e Sau (Figura 24F).

Diante desses resultados, tiramos como balanço que o estado de tolerância operacional envolve a manutenção dos níveis circulantes de células B, em especial da subpopulação de células B supressoras $CD19+CD24^{hi}CD38^{hi}$ similares àqueles observados em indivíduos saudáveis, enquanto os grupos RC e Est apresentam uma redução nos números circulantes de células B e suas subpopulações.

4.5. Análise do repertório dos receptores de células B

A análise do repertório dos receptores de linfócitos B foi realizada utilizando-se a técnica de *Immunoscope*, como descrito em material e métodos. Inicialmente, fizemos a extração de RNA das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de cada indivíduo dos diferentes grupos clínicos e analisamos a integridade do RNA por um gel de agarose livre de RNAase (Figura 25). A integridade foi determinada por meio da visualização das bandas 18S e 28S dos RNAs ribossômicos. Após essa etapa, foi procedida a transcrição reversa do RNA para formação do cDNA. Para verificar se a reação de transcrição reversa tinha sido bem sucedida, foi realizada a amplificação do gene endógeno HPRT, por PCR (Figura 26).

Figura 25. Visualização da integridade do RNA de PBMC em Gel de agarose a 1%, dos indivíduos do estudo. Visualizamos as subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal. As amostras são provenientes de seis indivíduos (LTx 27, 28, 30, 37, 38 e 39). Como marcador (M), usou-se o High DNA Mass Ladder (Invitrogen). Tamanhos dos fragmentos de DNA presentes no marcador mostrados em Kilobases (Kb).

Figura 26. Análise da amplificação do gene endógeno HPRT, por PCR, a partir do cDNA de PBMC dos indivíduos transplantados renais. A reação de amplificação foi realizada como descrita nos métodos. A banda esperada para o gene HPRT (do inglês, *hypoxanthine phosphoribosyltransferase*), após a amplificação é de 289 pares de bases como observada no gel. M. Marcador de tamanho molecular 100bp ladder (invitrogen). Os números correspondem aos sujeitos de pesquisa Ltx 18, 20 e 22.

Para a análise do repertório de linfócitos B por *immunoscope*, adaptamos a metodologia TCR CDR3 *Spectratyping* (ou *Immunoscope* para receptor de celular T) padronizada em nosso laboratório. O protocolo padronizado para a realização dessa técnica está descrito nos itens 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17 e 3.18 do material e métodos.

Foram realizadas reações de *Immunoscope* para 45 indivíduos; 5 indivíduos do grupo TO, 11 do RC, 17 do Est e 12 saudáveis. O cDNA preparado a partir de PBMC de cada um dos indivíduos foi amplificado, usando-se primers específicos para cada uma das famílias VH das imunoglobulinas (VH1-VH7). Esse repertório foi analisado tanto para o isotipo IgM quanto IgG. Para isso, foram utilizados dois tipos diferentes de primers reverso (3') específicos para a cadeia μ ou γ , respectivamente.

Na Figura 27, mostramos o resultado de um experimento representativo obtido após a padronização da reação para o isotipo IgM.

Figura 27. Amplificação da região CDR3 dos receptores de células B pertencentes às diferentes famílias de genes VH do isotipo IgM de um indivíduo saudável representativo. O RNA total foi extraído das células mononucleares do sangue periférico, transcrito em cDNA, amplificado por PCR usando primers específicos para as famílias VH (5') e para a cadeia constante do isotipo IgM (3'). MWM – Marcador de peso molecular (100bp DNA ladder, Invitrogen®)

Após a realização das reações de PCR, todas as amostras foram submetidas à corrida eletroforética em um sequenciador de DNA automático (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os dados gerados foram extraídos e submetidos a uma primeira análise utilizando-se o software Gene Mapper™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), no qual foram gerados gráficos de distribuição dos diferentes segmentos da região CDR3 do BCR, para cada família VH, expressos pelos indivíduos do estudo. Na Figura 28 observamos um perfil ilustrativo da distribuição clonal do repertório de BCRs, para o isotipo IgM, de um indivíduo saudável.

Figura 28. Perfil de distribuição clonal representativo do repertório de receptores de linfócitos B de um indivíduo saudável. Um volume de 2 μ l do cDNA foi amplificado usando-se primers específicos para as famílias VH (5') e para primers específicos para as cadeias constantes de IgG e IgM (3') marcados com o fluorófilo 6FAM. Após a reação, o repertório VH do BCR foi analisado no GeneMapper™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Cada painel mostra perfil de distribuição do comprimento do CDR3 nas 7 famílias VH para o isotipo IgM.

Para realizar a análise de todos os repertórios gerados, utilizamos o software *Iseapeaks* (Collette e Six, 2002), desenvolvido exclusivamente para análise em larga

escala, de dados gerados pela técnica de *Immunoscope*. Entretanto, como o software é datado de 2002 e foi projetado para a análise de reações geradas em sequenciadores de gel e não de capilar, foi necessário enviar os nossos dados para os autores do software para a conversão dos arquivos gerados no sequenciador utilizado no trabalho, em um formato compatível com o programa. O *Iseapeaks* nos permitiu a análise da diversidade do repertório e da representatividade de cada tamanho de CDR3 de cada família VH no repertório, assim como, da representatividade total de cada família VH, perante todo o repertório do indivíduo para uma determinada amostra. Os dados de representatividade foram utilizados para visualizar possíveis expansões ou deleções de clones expressando um tamanho específico da região CDR3 do BCR. Dessa forma, subdividimos a análise por família de cada isotipo (IgG e IgM) e somente pelo isotipo.

Para o isotipo IgM, observamos diferenças significativas na diversidade do repertório do receptor de células B dos diversos grupos do estudo, somente para as famílias VH3 e VH6 (Figura 29). Na família VH3 os indivíduos com rejeição crônica apresentaram uma menor diversidade do repertório em relação aos grupos Est e Sau ($p < 0,01$) (Figura 29) e na VH6 o grupo RC apresentou uma menor diversidade em relação ao grupo Sau ($p < 0,05$) (Figura 29). Para as outras famílias não observamos diferenças estatisticamente significativas, com os grupos apresentando diversidades do repertório similares (Figura 29). O grupo TO apresentou, geralmente, diversidade intermediária para todas as famílias, entre os grupos RC e Est. Assim, não observamos alteração na diversidade do repertório de BCR para o isotipo IgM no grupo TO (Figura 29).

Figura 29. Diversidade clonal do repertório de BCR para o isotipo IgM das diferentes famílias de imunoglobulinas presentes no sangue dos indivíduos do estudo. Gráficos representando a diversidade/complexidade do repertório de BCR dos diferentes grupos do estudo analisado pela contagem no número de tamanhos distintos de CDR3 expressos, observados nos softwares Gene Mapper™ e Iseapeaks. O índice de complexidade é calculado atribuindo-se um ponto para cada tamanho observado. Dessa forma quanto maior o número de pontos, mais complexo é o repertório de BCR do indivíduo. **TO:** Tolerante Operacional (n=5); **RC:** Indivíduos transplantados renais em rejeição crônica (n=11); **Est:** Indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto utilizando doses habituais de imunossupressores (n=17); **Sau:** Indivíduos saudáveis (n=12). A análise estatística foi feita utilizando-se o teste paramétrico one way Anova, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. A linha horizontal em cada grupo clínico representa a média do grupo. VH: *Variable Heavy Chain*

Para o isotipo IgG, observamos que o grupo RC apresentou uma redução na diversidade de seu repertório basicamente em todas as famílias de imunoglobulinas, sendo estatisticamente significativa para as famílias VH1 e VH3 (Figura 30). Os indivíduos com rejeição crônica apresentaram uma menor diversidade do repertório de BCR em relação aos grupos Est e Sau na família VH1 ($p < 0,05$) e na VH3 ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) (Figura 30). O grupo TO, em contrapartida, apresentou uma grande variabilidade na diversidade do repertório entre os indivíduos do grupo para as famílias VH1, VH2 e VH4, entretanto, essa variabilidade foi semelhante à observada nos outros grupos de estudo, tendo um perfil de distribuição mais similar aos grupos Est e Sau (Figura 30). Nas famílias VH3 e VH5, o grupo TO apresentou uma diversidade de repertório similar à apresentada pelo grupo RC, sendo menor do que no grupo Sau na família VH3 ($p < 0,01$) (Figura 30). Para a família VH6, o grupo TO apresentou uma diversidade de repertório intermediária entre RC e Est/Sau. Finalmente para a família VH7, o grupo TO apresentou um perfil similar aos demais grupos (Figura 30). Dessa forma, não observamos alterações do repertório de BCR, para o isotipo IgG, exclusivas do grupo TO.

Figura 30. Diversidade clonal do repertório de BCR para o isotipo IgG das diferentes famílias de imunoglobulinas presentes no sangue dos indivíduos de estudo. Gráficos representando a diversidade/complexidade do repertório de BCR dos diferentes grupos de estudo analisado pela contagem no número de tamanhos distintos de CDR3 expressos, observados nos softwares GeneMapper™ e Iseapeaks. O índice de complexidade é calculado atribuindo-se um ponto para cada tamanho observado. Dessa forma quanto maior o número de pontos, mais complexo é o repertório de BCR do indivíduo. **TO:** Tolerante Operacional (n=5); **RC:** Indivíduos transplantados renais em rejeição crônica (n=11); **Est:** Indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto utilizando doses habituais de imunossupressores (n=17); **Sau:** Indivíduos saudáveis (n=12). A análise estatística foi feita utilizando-se o teste paramétrico one way Anova, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. A linha horizontal em cada grupo clínico representa a média do grupo. VH: *Variable Heavy Chain*

Analizamos também a diversidade geral do repertório para os isotipos IgG, IgM e a diversidade global do repertório, englobando os dois isotipos. Nessas análises, observamos que o grupo com a maior alteração na diversidade do repertório foi o grupo RC, apresentando uma redução na diversidade do repertório em relação aos grupos Sau e Est ($p < 0,01$). Além de menor diversidade global, para o isotipo IgM, ele apresentou uma diversidade de repertório menor do que o grupo Sau ($p < 0,05$) (Figura 31), e para o isotipo IgG a diversidade foi menor do que nos grupos Est e Sau ($p < 0,01$) (Figura 31). O grupo TO nas três análises apresentou uma diversidade de repertório intermediária entre os grupos RC e Est/Sau sem diferenças significativas em relação a esses grupos (Figura 31).

Um dado que chamou a atenção foi o perfil de 4 indivíduos do grupo RC que se destacam da maioria dos indivíduos com rejeição crônica, apresentando uma diversidade do repertório similar à apresentada por indivíduos dos grupos Est e Sau (Figura 31) (Ltx02, Ltx05, Ltx13 e Ltx26). Ao analisar os dados clínicos (Tabelas 14 a 16 do Anexo B) e de reatividade contra antígenos HLA (Tabelas 8 a 13 do Anexo A) e contra peptídeos da HSP60 (Tabela 6), observamos que os indivíduos Ltx05, 13 e 26 foram diagnosticados com rejeição crônica mediada por anticorpos por meio da detecção de C4d em biópsias do enxerto. Além disso, o indivíduo Ltx05 apresentou uma reatividade contra diversos antígenos HLA (Tabela 6), ao peptídeo I8 por anticorpos do isotipo IgG e aos peptídeos N7, N10, I2, I5, I6, C8 e C9 por anticorpos do isotipo IgM. O indivíduo Ltx 02, apesar de não apresentar rejeição mediada por anticorpos e anticorpos contra antígenos HLA, foi o que apresentou o mais amplo espectro de reatividade contra peptídeos da HSP60, reconhecendo todos os peptídeos por anticorpos do isotipo IgM e a grande maioria, por isotipo IgG (Tabela 6).

Em resumo, o grupo RC apresentou uma redução da diversidade do seu repertório de BCR, enquanto que nos outros grupos o repertório foi relativamente mantido, sendo similar ao do grupo Sau.

Figura 31. Diversidade clonal do repertório de BCR para os isotipos IgM, IgG e diversidade global presentes no sangue dos indivíduos do estudo. Gráficos representando a diversidade/complexidade do repertório de BCR dos diferentes grupos do estudo, analisado pela contagem no número de tamanhos distintos de CDR3 expressos observados nos softwares Gene Mapper™ e Iseapeaks. O índice de complexidade é calculado atribuindo-se um ponto para cada tamanho observado. Dessa forma quanto maior o número de pontos, mais complexo é o repertório de BCR do indivíduo. **TO:** Tolerante Operacional (n=5); **RC:** Indivíduos transplantados renais em rejeição crônica (n=11); **Est:** Indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto utilizando doses habituais de imunossupressores (n=17); **Sau:** Indivíduos saudáveis (n=12). A análise estatística foi feita utilizando-se o teste paramétrico one way Anova, considerando diferença significativa $p < 0,05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. A linha horizontal em cada grupo clínico representa a média do grupo.

Para analisar a representatividade da expressão de BCRs com tamanhos específicos de CDR3, no repertório de cada indivíduo, e visualizar possíveis expansões clonais de um determinado tamanho de CDR3, utilizamos o software

Iseqpeaks e calculamos o índice de estimulação relativa (RIS). Nesse cálculo, leva-se em conta a representatividade percentual de cada tamanho de CDR3, perante todo o repertório do indivíduo, sendo ele, então, comparado com o padrão de expressão desse tamanho de CDR3 do grupo de saudáveis. Os resultados mostrados como RIS (unidades arbitrárias), foram assim interpretados: $RIS > 2$ maior representatividade do tamanho de CDR3 em questão em relação à representatividade encontrada nos doadores renais saudáveis e, $RIS < 0,5$, menor representatividade em relação à Sau. Dessa forma, calculamos se há um aumento ou diminuição da representatividade dos tamanhos de CDR3 expressos em relação ao grupo controle.

Com essa análise, observamos que o grupo TO apresentou um perfil diferencial de clones expressando o comprimento de CDR3 de 14 aminoácidos (aa) ($RIS=1,2$) (3 de 5 indivíduos, Ltx08, Ltx10 e Ltx62) para a família VH3 do isotipo IgM em relação ao grupo RC ($RIS=0,3$) ($p<0,05$) (Figura 32). Ainda na mesma família VH3, o grupo TO apresentou uma maior representatividade do comprimento da CDR3 de 16aa ($RIS=2,7$) (3 de 5 indivíduos, Ltx08, 10 e 62) em relação a Sau e aos grupos RC ($RIS=0,18$) e Est ($RIS=0,7$) ($p<0,01$ e $p<0,05$, respectivamente) (Figura 32).

Figura 32. Perfil de representatividade de diferentes comprimentos de CDR3 para o isotipo IgM em células B do sangue dos indivíduos do estudo. A representatividade de cada comprimento da CDR3 dos receptores de célula B foi normalizada em relação à representatividade observada nos indivíduos saudáveis, utilizando-se o software *IseaPeaks*® (Collette e Six. 2002). No gráfico representamos comprimentos da CDR3 expressos por células B apresentando imunoglobulinas do isotipo IgM. As linhas pontilhadas correspondem ao ponto de corte onde consideramos uma maior representatividade do tamanho de CDR3 (>2, azul) e menor representatividade (<0,5, vermelho) em relação ao grupo saudável. **TO:** Tolerante Operacional (n=5); **RC:** Indivíduos transplantados renais em rejeição crônica (n=11); **Est:** Indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto utilizando doses habituais de imunossupressores (n=17). A análise estatística foi feita utilizando-se o teste paramétrico one way Anova, considerando diferença significativa $p < 0,05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Estão representadas as médias $\pm$ SEM.

No isotipo IgG, observamos que o grupo TO apresentou uma maior representatividade do comprimento de 5aa para a família VH1 (RIS=15,7) (3 de 5 indivíduos, Ltx03, Ltx10 e Ltx16) em relação ao grupo Sau e aos grupos RC (RIS=0,7) e Est (RIS=3,6) ($p < 0,01$) (Figura 33). Para os demais tamanhos de CDR3 analisados, não observamos diferenças estatísticas para nenhum grupo. Os grupos RC, Est e TO apresentaram expansões ou diminuição da expressão de diferentes

tamanhos de CDR3, de forma variada, entre os indivíduos do grupo. Assim, não apresentaram alterações dominantes para os indivíduos de cada grupo. Na Figura 34, representamos a variação de expressão dos comprimentos da CDR3 que diferenciam os grupos de estudo.

Figura 33. Perfil de expressão de diferentes comprimentos de CDR3 para o isotipo IgG em células B do sangue dos indivíduos do estudo. A representatividade de cada comprimento da CDR3 dos receptores de célula B foi normalizada em relação à representatividade observada nos indivíduos saudáveis, utilizando-se o software *Iseapeaks*® (Collette e Six. 2002). As linhas pontilhadas correspondem ao ponto de corte onde consideramos uma maior representatividade do tamanho de CDR3 (>2, azul) e menor representatividade (<0,5, vermelho) em relação ao grupo saudável. TO: Tolerante Operacional (n=5); RC: Indivíduos transplantados renais em rejeição crônica (n=11); Est: Indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto utilizando doses habituais de imunossuppressores (n=17). A análise estatística foi feita utilizando-se o teste paramétrico one way Anova, considerando diferença significativa $p < 0,05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Estão representadas as médias $\pm$ SEM.

Figura 34. O grupo tolerante operacional apresenta expansão de clones de células B expressando tamanhos específicos da CDR3. Diversidade do repertório de células B representativo para indivíduos dos grupos TO, RC e Est. Nos gráficos é apresentada a diversidade do repertório para a família VH3 do isotipo IgM e para família VH1 do isotipo IgG. Os picos em azul representam os comprimentos da CDR3 expressos diferencialmente pelo grupo TO. **TO:** Tolerante Operacional; **RC:** Indivíduos transplantados renais em rejeição crônica; **Est:** Indivíduos transplantados renais com função estável do enxerto utilizando doses habituais de imunossupressores. Os dados foram analisados utilizando-se o software GeneMapper (Applied Biosystems®).

Em suma, o grupo TO apresentou uma maior expressão de 2 tamanhos de CDR3 em relação a todos os grupos de estudo (VH3-IgM 16aa e VH1-IgG 5aa). Além disso, o grupo RC apresentou uma redução na expressão dos tamanhos VH3-IgM 14aa e 16aa em relação a Sau e TO. Dessa forma, o perfil de expressão diferencial de alguns comprimentos de CDR3 pode diferenciar o grupo TO em relação aos demais grupos de indivíduos transplantados renais.

4.6. Análise comparativa do repertório de receptores de células B supressoras (CD19+CD24^{hi}CD38^{hi}) com o apresentado por células B dos indivíduos tolerantes operacionais

Para verificar se a alteração do repertório de BCR dos indivíduos do grupo TO poderia estar relacionada com expansão de populações de células B com funções reguladoras, realizamos a purificação de células B com o fenótipo CD19+CD24^{hi}CD38^{hi}, descritas com atividades reguladoras (Blair *et al.*, 2010). A purificação foi realizada a partir de células mononucleares do sangue de um indivíduo saudável pela técnica de *sorting*, utilizando-se um citômetro FACS ARIA I (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), e os marcadores citados acima para selecionar essa subpopulação e purificá-la. Além dessa subpopulação, purificamos também as subpopulações CD19+CD24^{int}CD38^{int} e CD19+CD24^{int}CD38⁻, descritas, anteriormente, como células B naive maduras e células B de memória, respectivamente (Carsetti *et al.*, 2004; Sims *et al.*, 2005). A estratégia de *gate* pode ser observada na Figura 35, onde optamos por selecionar, primeiramente, células individuais (*singlets*), utilizando-se como parâmetro uma análise do tamanho pela área e altura, eliminando, assim, células que foram adquiridas ligadas a outras células. Depois, selecionamos a região de linfócitos utilizando o tamanho e granulosidade como parâmetros e, dentro da região CD19 positiva, realizamos as análises das subpopulações de células B. A pureza das subpopulações CD19+CD24^{hi}CD38^{hi}, CD19+CD24^{int}CD38^{int} e CD19+CD24^{int}CD38⁻ após a separação no citômetro de fluxo foi de 80,2, 67,2 e 93,7%, respectivamente (Figura 36).

Figura 35. Estratégia para delimitação das regiões das subpopulações de células B para separação por citometria de fluxo. A figura representa a delimitação das regiões das populações de (A) células B, (B) Bregs (CD19+CD24^{hi}CD38^{hi}), (C) Células B naïve (CD19+CD24^{int}CD38^{int}) e (D) Células B de memória (CD19+CD24^{int}CD38⁻) no citômetro de fluxo FACS CANTOII (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) de um indivíduo representativo. Foi, primeiramente, delimitada a área das células individuais com base no tamanho por altura e área (FSC-H x FSC-A). Em seguida, delimitou-se a região de linfócitos com base no tamanho e na granulosidade (FSC-A x SSC-A). Dentro da região de linfócitos foram selecionados linfócitos CD19+ e, finalmente, delimitaram-se as regiões das subpopulações de células B.

Figura 36. Pureza das subpopulações de células B após a separação por citometria de fluxo. A figura representa a análise da pureza das subpopulações de células B $CD19+CD24^{hi}CD38^{hi}$, $CD19+CD24^{int}CD38^{int}$ e $CD19+CD24^{int}CD38^{-}$ após o procedimento de purificação, no citômetro de fluxo FACS ARIA I (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Os números apresentados nas figuras representam, percentualmente, o tamanho da população.

Após a purificação dessas subpopulações de células B, realizamos a técnica de *immunoscope* como descrita nos métodos. Foi possível observar que a população de células B supressoras $CD19+CD24^{hi}CD38^{hi}$ (Breg), assim como as outras duas subpopulações apresentaram um perfil de distribuição do repertório de células B diverso (Figura 37), entretanto, apresentando entre si diferenças na expressão de alguns tamanhos da CDR3, como pode-se observar na Figura 37.

Figura 37. As diferentes subpopulações de células B apresentam um repertório do BCR diverso e distinto entre si. Gráficos representativos da diversidade do repertório das 3 subpopulações de células B. São mostrados o repertório das família VH3 do isotipo IgM (VH3M), VH4M, VH1G e VH4G. Os dados foram analisados utilizando-se o software GeneMapper (Applied Biosystems®).

Quando analisamos as famílias VH3-IgM e VH1-IgG, para verificar se as expansões observadas nos indivíduos tolerantes eram compartilhadas com as Bregs, observamos que o perfil de expressão dos tamanhos da CDR3 expandidos no grupo TO fazem parte da população das Bregs, apesar de não haver expansões desses tamanhos nas Bregs (Figura 38).

Figura 38. Comparação dos tamanhos da CDR3 com expansão clonal apresentada em TO com os apresentados em células Breg CD19+CD24^{hi}CD38^{hi}. Diversidade do repertório de células B representativo para os indivíduos dos grupos TO e das células CD19+CD24^{hi}CD38^{hi} (Breg) de um indivíduo saudável. Nos gráficos é representada a diversidade do repertório para a família VH3 do isotipo IgM e para família VH1 do isotipo IgG. Os picos em azul representam os comprimentos da CDR3 expressos diferencialmente pelo grupo TO (representado pelo indivíduo Ltx10) em relação aos demais grupos de estudo e que, apesar de estar contido na população de Breg, não apresentou similaridade de expansão nessa população. **TO:** Tolerante Operacional. Os dados foram analisados utilizando-se o software GeneMapper (Applied Biosystems®).

4.7. Análise da via de sinalização CD40/STAT3 nas subpopulações de células B circulantes.

A atividade supressora das células Bregs está, em parte, relacionada à produção de IL-10 que, por sua vez, está diretamente ligada à fosforilação do fator de

transcrição STAT3. Quando fosforilado, STAT3 se transloca para o núcleo e ativa a transcrição do gene da IL-10. Assim, avaliamos se na tolerância operacional havia um perfil diferencial funcional dessa subpopulação, analisando se a fosforilação de STAT3 após estímulo da molécula CD40 era diferente entre os indivíduos do estudo.

Para realização dos ensaios envolvendo a ativação da via CD40/STAT3 foi realizada a adaptação do protocolo de phosflow publicado por Blair e colaboradores (Blair *et al.*, 2010), descrito no item 3.20 do Material e Métodos. Para cada indivíduo foram realizadas duas condições, uma sem o estímulo (controle negativo) e outra com o estímulo do anticorpo agonista anti-CD40 humano, produzido em camundongo, em conjunto com um anticorpo anti-Ig de camundongo, feito em cabra, para realizar o *cross-link* das moléculas de CD40 e ativar a via de sinalização. Além dessas duas condições usamos duas condições controles: uma com o estímulo somente com o anticorpo agonista anti-CD40 humano, sem *cross-link*, e, na outra, só o anticorpo anti-Ig de camundongo feito em cabra, para checar alguma ativação inespecífica.

Foram submetidas ao protocolo 1×10^6 células, conforme descrito no item 3.20 dos métodos. Inicialmente, selecionamos células individuais (*singlets*) utilizando como parâmetro uma análise do tamanho pela área e altura. Para a análise, adquirimos 300.000 eventos dentro da região de linfócitos, determinado pelo tamanho e granulosidade das células. Dentro da região de linfócitos selecionamos as células CD19 positivas (células B). Com o intuito de eliminar restos celulares e células autofluorescentes, deixamos um canal de fluorescência aberto sem utilizá-lo (APC ou PE-CY7). Dessa forma, selecionamos as células CD19+ negativas para APC ou PE-CY7, eliminando as células autofluorescentes que estariam positivas

para essas fluorescências. A partir dessa população, delimitamos as três subpopulações de células B. A estratégia para seleção das regiões utilizadas pode ser observada na Figura 39A para células não estimuladas e 39B para as condições com estímulo, onde um indivíduo representativo é utilizado para determinação das regiões. Após a estimulação das células a 37°C por 5min, observamos um aumento na expressão nas moléculas de superfície CD24 em Bregs e CD38 em todas subpopulações de células B, em todos os indivíduos (Figura 39B). Entretanto, essa alteração de expressão não comprometeu a análise dos resultados, visto que a delimitação das regiões das subpopulações continuou sendo possível.

Após a determinação das regiões das subpopulações de células B, a fosforilação e ativação da via STAT3 foi calculada pela comparação da mediana de intensidade de fluorescência (MFI, do inglês, *median fluorescence intensity*) gerada pelos anticorpos dirigidos à molécula de STAT3 fosforilada (STAT3p) da condição estimulada, com aquela apresentada pela condição não estimulada (Figura 40C). Com essa comparação, foi calculado o aumento percentual da MFI para STAT3p pós-estímulo. Nessa análise, também observamos que a estimulação somente com o anticorpo agonista anti-CD40 humano não gerou um aumento inespecífico na fosforilação de STAT3, não havendo, assim, estimulação somente com a adição desse anticorpo (Figura 40A). Para o controle somente com o anticorpo anti-Ig de camundongo feito em cabra, observamos alguma ativação inespecífica (Figura 40B), mas claramente inferior ao efeito sinérgico apresentado pelo anti-CD40 humano com anticorpo anti-Ig de camundongo na estimulação das células CD19+CD24^{hi}CD38^{hi} (Figura 40C). Além dessa análise, foi realizada a comparação do percentual de células positivas para STAT3p pré e pós-estímulo, nas diferentes subpopulações de

células B, e observado o aumento do percentual de células positivas para STAT3p, pelo cálculo da razão de células STAT3p positivas pós/pré-estímulo (Figura 41).

Figura 39. Estratégia para delimitação das regiões das subpopulações de células B para a análise da via de sinalização CD40/STAT3, por *Phosflow*. A figura representa a delimitação das regiões das populações de (1) células B, (3) Bregs (CD19+CD24^{hi}CD38^{hi}), (4) Células B naïve (CD19+CD24^{int}CD38^{int}) e (5) Células B de memória (CD19+CD24^{int}CD38⁻) no citômetro de fluxo FACS CANTOII (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), para análise dos níveis de fosforilação do fator de transcrição STAT3 de um indivíduo representativo. Foram adquiridos 300.000 eventos na região de linfócitos. Foi, primeiramente, delimitada a região das células individuais com base no tamanho por altura e área (FSC-H x FSC-A) e em seguida, delimitou-se a região de linfócitos com base no tamanho e na granulosidade (FSC-A x SSC-A). Dentro da região de linfócitos foram selecionados linfócitos CD19+. As células autofluorescentes (2) foram eliminadas pela seleção de células APC ou PE-CY7 negativas e, finalmente, delimitaram-se as regiões das subpopulações de células B. Em (A) observamos PBMCs não estimuladas e em (B) PBMCs estimuladas com anticorpo anti-CD40 humano + crosslink, evidenciando o aumento da expressão das moléculas CD24 e CD38 após estímulo da via de CD40.

Figura 40. Histogramas representativos da fosforilação de STAT3 para as diferentes subpopulações de células B pré e pós estímulo. (A) Subpopulações de células B estimuladas somente com o anticorpo agonista Anti-CD40 humano. **(B)** Subpopulações de células B estimuladas somente com o anticorpo Anti-Ig de camundongo. **(C)** Subpopulações de células B estimuladas com o Anti-CD40 humano + Anti-Ig de camundongo (*Cross-link*). Em todas as condições em azul, condição estimulada e, em vermelho, o controle sem estímulo. Na horizontal é representada cada uma das subpopulações analisadas.

Figura 41. Histogramas representativos da estratégia de análise do número percentual de células com STAT3 fosforilada pré e pós-estímulo, para as diferentes subpopulações de células B. **(A)** Subpopulações de células B não estimuladas. **(B)** Subpopulações de células B estimuladas com o Anti-CD40 humano + Anti-Ig de camundongo (*Cross-link*). Na horizontal é representada cada uma das subpopulações analisadas.

Com essas análises, observamos que os indivíduos dos diferentes grupos do estudo apresentaram uma capacidade de fosforilação de STAT3 similar para as diferentes subpopulações de células B, inclusive para as Bregs, não apresentando diferenças estatísticas entre os grupos de estudo (Figura 42A, B e C).

Figura 42. Análise da fosforilação de STAT3 nas diferentes subpopulações de células B. (A) Células CD19+CD24^{hi}CD38^{hi} (Bregs). (B) Células CD19+CD24^{int}CD38^{int} (naive). (C) Células CD19+CD24^{int}CD38⁻ (memória). O cálculo da porcentagem de aumento da mediana da intensidade de fluorescência (MFI), frente ao estímulo com anticorpo agonista anti-CD40 humano + anti-Ig de camundongo (*Cross-link*) foi feito proporcionalmente à condição sem estímulo e é mostrado como porcentagem de aumento. **TO:** Indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=5); **RC:** Indivíduos com rejeição crônica (n=10); **Est:** Indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=17); **Sau:** Indivíduos saudáveis doadores renais (n=10). A análise estatística foi feita utilizando-se o teste não paramétrico Kruskal - Wallis, considerando diferença significativa $p < 0,05$. A linha horizontal em cada grupo clínico representa a mediana do grupo.

Após essa análise, avaliamos se haveria alguma diferença entre os grupos de estudo na capacidade quanto a mobilização de células sem fosforilação de STAT3 para um estado fosforilado após o estímulo, ou seja, uma maior capacidade de gerar

células ativadas para STAT3p. Na Figura 43, podemos observar que os diferentes grupos do estudo possuem capacidade similar de ativação da via CD40/STAT3 das células negativas para STAT3p, dentro das populações de células B CD19+CD24^{int}CD38^{int} (naive) e CD19+CD24^{int}CD38⁻ (memória). No entanto, quando analisamos a capacidade de mobilização de Bregs para um estado com STAT3 fosforilada, observamos que os indivíduos dos grupos TO e Sau apresentam uma similaridade na capacidade de gerar células ativadas para a via CD40/STAT3 (aumento médio de $15,57 \pm 9,19$ e $11,67 \pm 5,113$ vezes, respectivamente), enquanto que o grupo RC apresenta uma redução na capacidade de gerar células ativadas para STAT3p em relação a TO e Sau, com um aumento médio na geração de células ativadas para a via de $5,928 \pm 2,959$ vezes ($p < 0,05$) (Figura 43).

Dessa forma, os indivíduos dos diferentes grupos do estudo apresentam capacidades similares de induzir a fosforilação das diferentes subpopulações de células B, entretanto, o grupo TO apresenta uma capacidade de gerar células STAT3p+ conservada, enquanto o grupo RC apresenta uma redução na capacidade de ativar células para essa via.

Figura 43. Capacidade dos diferentes grupos do estudo de aumentar percentualmente o número de subpopulações de células B STAT3p+ após estímulo. (A) Células CD19+CD24^{hi}CD38^{hi} (Bregs). (B) Células CD19+CD24^{int}CD38^{int} (naive). (C) Células CD19+CD24^{int}CD38⁻ (memória). O cálculo de aumento do número percentual de células STAT3p+ após o estímulo foi realizado pela razão do número percentual de células STAT3p+ pós-estímulo sobre o pré-estímulo com anticorpo agonista anti-CD40 humano + anti-Ig de camundongo (*Cross-link*). **TO:** Indivíduos em estado de tolerância operacional sem uso de imunossupressores há pelo menos 1 ano (n=5); **RC:** Indivíduos com rejeição crônica (n=10); **Est:** Indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores (n=17); **Sau:** Indivíduos saudáveis doadores renais utilizados como controles (n=10). A análise estatística foi feita utilizando-se o teste não paramétrico Kruskal - Wallis, considerando-se diferença significativa $p < 0,05$. * $p < 0,05$. A linha horizontal em cada grupo clínico representa a mediana do grupo.

4.8. Produção intracelular de IL-10 após estímulo com CD40L nas subpopulações de células B do sangue.

Para verificar se a fosforilação de STAT3 induzida por CD40 ligante resultava em uma maior produção de IL-10 intracelular, realizamos ensaios por citometria de fluxo com as PBMCs dos sujeitos de pesquisa, como descrito no protocolo do item 3.21 do material e métodos. Para cada indivíduo, foram realizadas duas condições, uma sem o estímulo (controle negativo) e outra com o estímulo da proteína recombinante CD40 ligante (CD40L) para ativar a via CD40/STAT3.

Inicialmente, estimulamos PBMCs por 72h com CD40L. Após as 72h realizamos uma ativação celular com PMA e Ionomicina na presença Brefeldina para impedir a secreção das citocinas produzidas. A partir daí, submetemos as culturas celulares à aquisição e análise por citometria de fluxo. A seleção das regiões das subpopulações de células B foi realizada como descrita no item 4.7 e mostrada na Figura 44.

Após a determinação das regiões, a produção de IL-10 foi observada pela comparação do percentual de células positivas para IL-10 sem e com estímulo nas diferentes subpopulações de células B, calculando-se o aumento no percentual de células positivas para IL-10 (Figura 45).

Realizamos ensaios para 9 indivíduos, sendo 4 do grupo TO, 2 do grupo RC, 1 do grupo Est e 1 do Sau. Não foi possível fazer comparações entre os grupos devido ao baixo número de indivíduos analisados, mas em todos os indivíduos houve um aumento médio de $2,03 \pm 1,16$ vezes para Bregs, de $1,41 \pm 0,76$ vezes para células B naive e de $1,45 \pm 0,49$ vezes para células B de memória no número de

células produtoras de IL-10 após o estímulo com CD40L, mas, sem diferença estatística entre as subpopulações.

Figura 44. Estratégia para delimitação das regiões das subpopulações de células B para análise da produção intracelular de IL-10. A figura representa a delimitação das regiões das populações de (A) células B, (C) Bregs ($CD19+CD24^{hi}CD38^{hi}$), (D) Células B naïve ($CD19+CD24^{int}CD38^{int}$) e (E) Células B de memória ($CD19+CD24^{int}CD38^{-}$) no citômetro de fluxo FACS CANTOII (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), para a análise do percentual de células produtoras de IL-10 de um indivíduo representativo. Foram adquiridos 300.000 eventos na região de linfócitos. Foi, primeiramente, delimitada a área das células individuais com base no tamanho por altura e área (FSC-H x FSC-A). Em seguida, delimitou-se a região de linfócitos com base no tamanho e na granulosidade (FSC-A x SSC-A). Dentro da região de linfócitos foram selecionados linfócitos CD19+. As células autofluorescentes (B) foram eliminadas pela seleção de células APC ou PE-CY7 negativas e, finalmente, se delimitaram-se as regiões das subpopulações de células B.

Figura 45. Produção intracelular de IL-10 representativo de um indivíduo do estudo para as diferentes subpopulações de células B. (A) Subpopulações de células B não estimuladas. (B) Subpopulações de células B estimuladas com CD40 ligante. Na horizontal é representada cada uma das subpopulações analisadas. Gráficos representativos do indivíduo Ltx05 do grupo rejeição crônica.

4.9. Análise global dos resultados do componente humoral da resposta imune.

Com o intuito de aprofundar as análises dos resultados obtidos no presente projeto buscando verificar possíveis relações entre os diferentes parâmetros estudados, propusemos uma análise global de todos os resultados mais relevantes do componente humoral, de forma individual.

Para realizar tal análise, construímos a Tabela 7 onde agrupamos os dados referentes ao: (i) aumento no percentual de células Breg ativadas para STAT3p+, (ii) número absoluto de Bregs circulantes, (iii) aumento na representatividade, no repertório de BCR, dos tamanhos de CDR3 de 5aa para família VH1 do isotipo IgG e de 16aa para família VH3 do isotipo IgM, (iv) grau de diversidade do repertório de BCR para os isotipos IgG e IgM, (v) repertório de aloanticorpos anti-HLA circulantes e, (vi) repertório de autoanticorpos anti-HSP60 circulantes nos isotipos IgG e IgM.

Categorizamos os dados, quanto à intensidade, classificando-os em uma escala gradativa de cores de maior a menor intensidade (Utilizando as cores laranja, amarelo, amarelo claro e branco. Sendo laranja para os valores mais altos e branco para os mais baixos) em relação aos parâmetros: ativação, números circulantes, expansões, diversidade ou reatividade (Tabela 7). Com isso, tentamos observar relações entre os dados dos diversos parâmetros analisados.

De forma geral, não observamos relações diretas ou inversas entre os dados. Ou seja, indivíduos que apresentavam uma alta reatividade para um componente da análise não apresentavam, necessariamente, essa mesma alta reatividade para os outros parâmetros, ou mesmo inversa (Tabela 7). O que mais nos chamou atenção foi

o fato de os indivíduos do grupo TO terem apresentado as maiores intensidades para os parâmetros: (i) aumento no percentual de células Breg ativadas para STAT3p+; (ii) Número absoluto de Bregs circulantes; (iii) Aumento na representatividade, no repertório de BCR, dos tamanhos de CDR3 de 5aa para família VH1 do isotipo IgG e de 16aa para família VH3 do isotipo IgM; e (iv) Diversidades do repertório de BCR para os isotipos IgG e IgM. Em contraste, o grupo RC ficou no extremo oposto dessa classificação.

Outra observação interessante, foi que, quando analisado o aumento na representatividade dos tamanhos de CDR3, as expansões de 5aa para família VH1G e 16aa para VH3M compreenderam todos os indivíduos do grupo TO (Tabela 7). Apesar dessas expansões também terem sido detectadas em alguns indivíduos dos outros grupos (RC, n=2; Est, n=11; Sau, n=6), elas foram menos frequentes e de menor intensidade. Fenômeno semelhante não foi observado em nenhum outro grupo (Tabela 7), mesmo para outros tamanhos de CDR3 não representados nessa tabela.

Em relação aos dados de alorreatividade contra antígenos HLA e autorreatividade contra peptídeos da HSP60 não observamos relações entre os diferentes parâmetros nos diferentes grupos.

Apesar de ser um resumo de todas as informações já apresentadas ao longo da tese, julgamos que esse tipo de análise se faz necessário para tentarmos visualizar o conjunto de dados no sistema estudado e suas relações.

Tabela 7. Análise individual dos resultados

Grupo do estudo	Indivíduos do estudo	Aumento no % de Breg ativada para STAT3p+	Número absoluto de Bregs	Aumento na representatividade do tamanho de CDR3 5aa VH1G	Aumento na representatividade do tamanho de CDR3 16aa VH3M	Diversidade do repertório IgG	Diversidade do repertório IgM	Aloanticorpos anti-HLA IgG	Anticorpos anti- pep. HSP60 IgG	Anticorpos anti-pep HSP60 IgM
TO	Ltx03	23	1125	12	0	62	74	0	0	N2,N4,N6, N7, N10, I2, I6, I8, C8, C9, I0
	Ltx08	27	8309	0	4	41	85	A80; B42; B54; B55; B56; B67; B7; B81; B8201; Cw2; Cw4; Cw14; DP1	0	N2, N6, N7, I2, I6, C9
	Ltx10	7	6918	32	3	35	80	0	I8	N7 e I6
	Ltx16	7	6422	34	0	37	76	A1; A11; A26; A36; A43; A80; B76; Cw2	0	N7
	Ltx62	13	14528	0	6	18	93	DQ5; DQ6; DR7; DR12; DR13	I2 e I8	N2, N4, N6, I2, I5, I6, C8, C9, C10
Sau	LTX15	ND	ND	1	2	62	90	0	0	I6
	LTX18	8	14794	0	0	38	87	A25; A26; A34; A66; A80	0	N4; N6; N7; N10; I2; I6; I8; C9; C10
	Ltx36	7	11000	0	0	34	94	0	I8	N4; I6; C9
	Ltx37	12	3516	0	0	45	75	DR13	I8	I2; I6; C9
	Ltx38	14	6647	0	3	34	73	A1; A25; A26; A34; A66; B8201; Cw2; Cw7	I8	I2 e C9
	Ltx39	13	5252	0	0	49	96	B7; B42; B48; B60; B81; DR11; DR12; DR13; DR14; DR17; DR18; DR7; DR8; DR9	0	N4; N6; N7; I2; I6; C8; C9
	Ltx40	11	31593	0	3	35	94	A23; A24; A31; A33; B7; B13; B27; B48; B60; B61; B73; B81	N7 e I6	N7 e I6
	Ltx41	23	1372	0	0	64	86	0	N2; N4; I2; I5; I6; I8; C8	0
	Ltx42	6	943	5	0	40	76	0	0	N2; N7; I5; I6
	Ltx43	15	5058	2	2	87	111	0	I8	N2; N4; I2; I5; I6; I8; C9
	Ltx44	8	6310	0	2	71	90	0	0	N2; N4; N6; N7; N10; I2; I5; I6; I8; C8; C9; C10
	LTX09	9	1736	16	2	62	99	0	I8	N4; N7; I6; C8
Est	LTX11	6	1539	2	2	52	86	A11; A24; A32; B13; B37; B8; B8201; Cw4; Cw7	0	I6
	LTX12	7	5445	2	1	48	89	DQ2; DQ4; DQ5; DQ7; DQ8; DQ9; DP1; DP3; DP14; DP17; DR53	I6, I8 e C9	N4; I2; I6; C8
	LTX14	14	8779	9	0	47	89	DQ2; DQ7; DQ9; DR52	I2	I6; C9
	LTX17	4	1339	0	0	47	89	B8201	0	N7
	LTX19	8	4386	0	0	40	111	0	0	I6; C9
	LTX20	10	1247	3	0	42	59	0	N7	I6
	LTX21	18	124	0	0	49	73	A31; A33	0	N7; I2; I6; C9
	LTX22	7	5051	0	2	45	89	B7; B27; B39; B42; B54; B55; B64; B67; B78; B8; B81; Cw10	0	N4; N7; I2; I6; C9; C10
	LTX23	4	960	0	0	40	63	A1; A23; A24; A25; A32; A66; B13; B27; B37; B38; B44; B45; B47; B49; B50; B51; B52; B53; B55; B59; B63; B77; DQ6,DQ5,DQ4,DR15,DR16	0	N4; N6; N7; N10; I2; I6;C8; C9; C10
	LTX27	6	310	5	0	69	89	0	0	N7; I2; I6; C9
	LTX28	ND	187	10	0	49	74	0	0	N7; I6
	LTX29	10	1067	0	0	44	76	0	0	N7; I6; C9
	LTX30	ND	2561	7	0	50	82	0	0	N4; N7; I2; I6; C8
	LTX31	8	1993	0	0	28	79	0	0	I6
	LTX33	12	834	3	0	53	91	0	0	N7; I6; C9
	LTX34	4	3522	6	5	65	86	0	I8 e C9	N4; N6; N7; I2; I6; C8; C9; C10
	Ltx70	5	1390	0	0	ND	ND	A1; A26; A29; A36; A80; Cw1	I2	N2; N4; N6; N7; N10; I2; I5; I6; I8; C8; C9; C10
	Ltx71	7	3061	0	0	ND	ND	0	0	N2; N4; N6; N7; N10; I2; I5; I6; I8; C8; C9; C10
	Ltx01	ND	ND	0	0	11	73	0	0	C9
RC	Ltx02	ND	ND	2	0	49	79	0	N4; N7; I2; I5; I6; I8; C8; C9	N2; N4; N6; N7; N10; I2; I5; I6; I8; C8; C9; C10
	Ltx04	13	987	0	0	2	69	B56;B77;B71;B53;B72;B35;B75;B49 ;B63;B51;B52;B62;B50;B8201;B44; B76;A2;B58;B45;B57	0	I6
	Ltx05	6	1439	0	0	41	98	B56;B59;B13;B50;B8201;B45;B49; DR16;DQ7;DQ2;DQ4	I8	N4; N7; N10; I2; I5; I6; C8; C9
	Ltx06	2	34	0	0	2	5	0	0	N4; N6; C10
	Ltx07	5	564	0	0	18	75	0	0	N4; I2; I6; C9
	Ltx13	7	529	0	0	60	87	0	0	N7; N10; I2; I6; C9
	Ltx24	7	12918	0	0	0	51	DQ8;DQ6;DQ2;DQ4;DQ9;DQ7;DR9	N7	N4; N7; I2; I5; I6; C8; C9
	Ltx25	5	335	0	0	27	58	0	0	N2; N4; N7; I2; I5; I6; C8; C9
	Ltx26	5	1249	6	2	68	101	DQ2	0	N2; N4; N7; N10; I2; I6; C8; C9; C10
	Ltx32	5	3310	0	0	19	36	0	0	I6 e C9
	Ltx67	5	93	ND	ND	ND	ND	0	0	N7
	Ltx72	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0

	Breg ativa	N. Breg	- VH1G 5aa	- VH3M 5aa	Diversi. IgG	Diversi. IgM	Aloanticorpos anti-HLA	Ac.anti-pep.HSP60 IgG	Ac.anti-pep.HSP60 IgM
Alto	> 20	> 10.000	> 20	> 5	> 50	> 70	> 10 ag. classe I ou classe II	>10	>10
	>10 e ≤20	5.000-10.000	> 10 e ≤20	> 3 e ≤ 5	40 a 50	40 a 70	6-10 ag. classe I ou classe II	5 a 10	5 a 10
	> 5 e ≤10	1.000-5.000	> 5 e ≤ 10	>2 e ≤3	20 a 40	20 a 40	1- 5 ag. classe I ou classe II	1 a 5	1 a 5
Baixo	≤5	< 1.000	≤5	≤2	< 20	< 20	negativo	negativo	negativo
Valores representam:	Razão células STAT3p+ pós/pré-estímulo	células por dm3 de sangue	Índice de estimulação relativa em relação ao grupo Sau	Índice de estimulação relativa em relação ao grupo Sau	Índice de complexidade	Índice de complexidade	Números de antígenos reconhecidos	Números de antígenos reconhecidos	Números de antígenos reconhecidos

TO: Indivíduos em Tolerância operacional; RC: Indivíduos com rejeição crônica; Est: Indivíduos com função estável do enxerto e imunossupressão convencional. Sau: Indivíduos saudáveis doadores renais. ND: Não disponível. A, B e Cw: Antígenos HLA de classe I. DQ, DP e DR: Antígenos HLA de classe II. HSP60: Proteína de Choque Térmico 60, do inglês, *Heat Shock Protein 60*.HLA: Antígeno Leucocitário Humano, do inglês, *Human Leukocyte Antigen*. Na coluna para Aloanticorpos, em azul são destacados antígenos HLA de classe I e em negrito preto são destacatos antígenos HLA de classe II.

5. Discussão

O sistema imune, para exercer suas funções, depende de um equilíbrio delicado entre as funções efectoras induzidas por patógenos e mecanismos envolvidos com a tolerância dirigida a autoantígenos (Kyewski e Klein, 2006). Nesse contexto, diversos grupos de pesquisa procuram uma melhor compreensão de como o sistema imune de indivíduos transplantados no estado de tolerância operacional conseguiu, a despeito do estímulo alogênico, manter esse equilíbrio, controlando uma resposta efectora/inflamatória contra o enxerto (Braudeau *et al.*, 2007; Brouard *et al.*, 2007; Martinez-Llordella *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2010). Com os resultados apresentados no presente trabalho contribuímos para a construção desse conhecimento. Nossos resultados nos permitem concluir que o estado de tolerância operacional no transplante renal humano envolve a preservação quantitativa e funcional do componente humoral da resposta imune. Observamos, na tolerância operacional, números de células B circulantes e suas subpopulações, o estado de ativação de Bregs circulantes e o perfil de auto e aloanticorpos similares àqueles encontrados em indivíduos saudáveis. Em contraste, o grupo com rejeição crônica apresentou um comprometimento desses parâmetros analisados, não preservando o compartimento de células B comparativamente aos saudáveis. Além disso, observamos que os tolerantes operacionais apresentaram expansões de clones de células B com tamanhos específicos de CDR3. Esses dados nos sugerem que o componente humoral da resposta imune pode estar envolvido na manutenção ou indução do estado de tolerância operacional.

Uma limitação importante nos estudos da tolerância imunológica, no contexto do transplante humano, é a escassez de pacientes em tolerância operacional. Nesse estudo, foram incluídos 5 indivíduos tolerantes operacionais, o que consideramos importante, vista a raridade de indivíduos nesse estado. Quando comparamos o número de indivíduos em tolerância operacional àqueles descritos em outros centros de pesquisa nessa área, observamos que esse número é igual ao que se conseguiu recrutar em toda França dentro de uma população de 25000 indivíduos transplantados renais (Brouard *et al.*, 2005). Apesar dessa escassez, das diferenças de compatibilidade de HLA, dos dados clínicos e demográficos dos pacientes tolerantes, foram observadas determinadas características do componente humoral do grupo TO em todos os 5 indivíduos analisados. Isso sugere que o desenvolvimento do estado de tolerância é um evento. Além disso, o compartilhamento de características, do componente humoral, comuns entre os indivíduos desse grupo nos permite propor possíveis marcadores que diferenciem esse estado de tolerância. Esses marcadores poderão contribuir, no futuro, para identificar indivíduos com um perfil de tolerância operacional, entre o grupo de indivíduos com função estável do enxerto usando doses habituais de imunossupressores e, assim, propor uma redução do uso de drogas imunossupressoras que possa beneficiar a qualidade de vida desses indivíduos.

Ao analisar os dados clínicos dos indivíduos incluídos no estudo, observamos que o grupo de indivíduos com rejeição crônica apresentou os maiores níveis de creatinina sérica, refletindo o seu estado de agressão ao enxerto o que repercute na atividade funcional do enxerto. Entretanto, não observamos diferença significativa em relação ao grupo de tolerantes operacionais, provavelmente, devido ao pequeno

número de indivíduos nesse grupo. Apesar disso, o grupo TO apresentou estabilidade da função renal ao longo do tempo sem uso de imunossupressores enquanto o grupo RC apresentou uma deterioração da função renal com confirmação do seu estado por biópsia. Além disso, o grupo TO não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo Sau. Dessa forma, os resultados encontrados aqui devem refletir os processos imunológicos desencadeados por condições tão contrastantes como tolerância operacional e rejeição crônica.

Uma questão importante a ser avaliada para a validação dos achados no grupo TO é se outras variáveis diferenciais entre os grupos do estudo poderiam ter influenciado os resultados encontrados. Nesse sentido, outros dados clínicos que se associaram com o estado clínico dos indivíduos do estudo foram: tipo de doador (falecido ou vivo) e a função retardada do enxerto (FRE) após o transplante. Ao testarmos se havia associação dessas variáveis com os diferentes grupos do estudo, observamos uma diferença significativa entre os grupos RC e Est, tendo o grupo RC um maior número de doadores falecidos e mais casos de função retardada do enxerto. Apesar dos enxertos oriundos de doadores falecidos (Terasaki, Cecka *et al.*, 1995; Terasaki, Gjertson *et al.*, 1995) e com FRE (Whittaker *et al.*, 1973; Halloran e Hunsicker, 2001), em geral, terem uma pior evolução clínica após o transplante, vale ressaltar que há um indivíduo com enxertos de doadores falecidos e FRE entre os tolerantes operacionais, em nosso trabalho (indivíduo Ltx08) e na literatura (Roussey-Kesler *et al.*, 2006; Newell *et al.*, 2010; Sagoo *et al.*, 2010). Dessa forma, esses fatores não parecem ser os únicos determinantes para o desenvolvimento de rejeição crônica, visto que o perfil imunológico diferencial do grupo TO foi, também,

observado no indivíduo Ltx08. Assim, outros fatores desencadeados pelo sistema imune devem atuar na evolução do enxerto de cada indivíduo.

No sentido de avaliar que fatores do componente humoral da resposta imune poderiam estar atuando sobre o desfecho do transplante para rejeição ou tolerância, iniciamos, primeiramente, uma análise dos alo/autoanticorpos contra antígenos HLA circulantes. Observamos que os nossos grupos do estudo apresentaram, em média, 40% de indivíduos com anticorpos anti-HLA (acHLA) circulantes, sendo 60% para o grupo TO, 31% para o grupo RC, 42% para o Est e 45% para os saudáveis. Como observamos a presença desses anticorpos em todos os grupos, inclusive em Sau, sugerimos que a presença de aloanticorpos circulantes em uma parcela da população é frequente e pode estar envolvida com uma reatividade cruzada desses anticorpos com epitopos presentes em outros antígenos ambientais ou com outros estímulos alogênicos. Quando analisamos estímulos alogênicos como gravidez e eventos de transfusão sanguínea não observamos uma associação estatisticamente significativa com a presença de acHLA. A possibilidade da reatividade cruzada foi discutida, também em trabalho, recentemente publicado, onde foi observado um número considerável de indivíduos saudáveis não sensibilizados com acHLA (Morales-Buenrostro *et al.*, 2008).

Quando comparamos esses dados aos da literatura, observamos que no maior estudo realizado em um único centro envolvendo a técnica de Luminex, para a detecção de aloanticorpos, foi encontrada uma média de 30% dos indivíduos transplantados renais com acHLA (Lachmann *et al.*, 2009). Essa diferença entre o nosso dado (40%) e o do presente na literatura (30%) pode ser devido ao nosso baixo número de indivíduos ou ao fato de poder haver variações na reatividade encontrada

entre diferentes centros transplantadores, visto que há outros trabalhos mostrando uma prevalência de 20% (Terasaki e Ozawa, 2004) e 23% (Terasaki *et al.*, 2007) de indivíduos transplantados com acHLA. O que podemos concluir diante de todos esses dados da literatura e dos nossos é que em cerca de ¼ ou mais dos indivíduos transplantados renais possuem acHLA e que a sua função pode não estar necessariamente associada uma atividade deletéria.

É interessante observar a presença de acHLA em indivíduos tolerantes operacionais. Há dados na literatura em mais de 23 trabalhos indicando que a presença de acHLA está associada com o desenvolvimento de rejeição do aloenxerto e com uma menor sobrevida do transplante (Mckenna *et al.*, 2000), independentemente de os anticorpos serem doador específicos ou não. Dessa forma, a presença desses anticorpos nos indivíduos tolerantes não condiz com esses dados da literatura. Além disso, a presença de acHLA circulantes nesse grupo de indivíduos também já foi relatada em outros estudos (Roussey-Kesler *et al.*, 2006; Miqueu *et al.*, 2010; Newell *et al.*, 2010; Pallier *et al.*, 2010; Sagoo *et al.*, 2010). Uma conclusão do papel desses anticorpos nesse grupo clínico está distante de ser tirada. Uma possibilidade seria que os anticorpos presentes nos indivíduos TO sejam de subclasses não fixadoras de complemento. Entretanto, em trabalho recente não foi observada diferença nos tipos de subclasses circulantes entre diversos grupos de indivíduos transplantados, incluindo TO (Sagoo *et al.*, 2010).

Ao se analisar o padrão de reatividade de anticorpos anti-HLA dos indivíduos positivos, observamos níveis de reatividade diferenciais entre os diferentes grupos clínicos. É interessante ressaltar que a análise desses resultados deve ser vista com cuidado devido ao baixo número de indivíduos acHLA positivos.

O grupo TO apresentou, principalmente, médios a altos títulos de anticorpos contra antígenos HLA de classe I quando comparado com os grupos RC ($p<0,05$) e Sau ($p<0,001$) (Figura 8). Já para antígenos HLA de classe II, o grupo RC apresentou, principalmente, altos títulos de anticorpos, enquanto os demais grupos apresentaram, principalmente, baixos títulos de anticorpos contra essa classe ($p<0,05$) (Figura 10). Esses dados são, de certa forma, intrigantes, visto que não era de se esperar uma alta concentração de acHLA em indivíduos do grupo TO. Isso nos sugere que a presença de altos títulos de anticorpos anti-HLA de classe I pode não estar tão envolvida com a deterioração da função renal, enquanto que altos títulos de anticorpos anti-HLA de classe II podem estar associados com uma perda da função do transplante a longo prazo.

Ao procurar dados referentes à associação de títulos de anticorpos de classe I com uma função protetora no enxerto, encontramos que a ativação celular via moléculas de HLA classe I com baixas concentrações acHLA de classe I, doador específicos, aumenta a expressão de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xl, em células endoteliais, *in vitro*. Esse aumento torna as células endoteliais refratárias à ativação celular e resistentes à lise mediada por complemento (Jindra *et al.*, 2006). Evento, esse, não observado em células endoteliais tratadas com altas concentrações de acHLA de classe I, doador específicos (Jindra *et al.*, 2006). Como os aloanticorpos de classe I dos indivíduos tolerantes apresentaram uma maior concentração no soro do que nos demais grupos (Figura 8), talvez esse não seja um efeito importante no contexto da tolerância operacional. Além disso, nenhum indivíduo tolerante apresentou acHLA de classe I, doador específicos, na circulação. Existe a possibilidade, por exemplo, de esses anticorpos poderem atuar, por

reatividade cruzada, com as moléculas HLA do doador ou do receptor, só que, com uma baixa afinidade. Isso poderia gerar um efeito resultante similar ao observado com baixas concentrações de acHLA de classe I observado no trabalho de Jindra e colaboradores (Jindra *et al.*, 2006).

Podemos considerar ainda outra interpretação para a presença desses anticorpos de classe I em pacientes tolerantes. Há dados na literatura indicando que anticorpos específicos para HLA de classe I estão, geralmente, associados com uma perda precoce e não tardia do transplante (Lee *et al.*, 2009). Ao verificar os dados referentes à presença de acHLA pré-transplante em TO observamos que 2 indivíduos não apresentavam acHLA circulantes e para o terceiro indivíduo não havia relatos disponíveis sobre tal sensibilização. No período imediatamente pós-transplante, infelizmente, não temos dados a respeito da presença de acHLA circulantes, mas, como os indivíduos do grupo TO apresentam em média 14 anos de transplante, isso seria mais um indicativo de que os altos títulos de anticorpos de classe I em TO possivelmente não possuem um efeito importante nesse estado.

O que se tem observado na literatura é uma associação entre o surgimento tardio de anticorpos contra moléculas HLA de classe II (e não de classe I) e o desenvolvimento de rejeição crônica (Lee *et al.*, 2009). Apesar disso, não é relatado e, também, não nos ocorre uma hipótese funcional para associação de acHLA de classe I com a perda precoce e a de classe II com a tardia. Talvez, o processo de ativação do endotélio renal na rejeição crônica, após um longo período pós-transplante, que leva a um aumento na expressão de MHC de classe II por essas células, pode desencadear o surgimento de acHLA de classe II com uma atividade deletéria. Essa associação temporal com a perda do transplante já foi observada

também em outros estudos (Campos *et al.*, 2006; Langan *et al.*, 2007; Issa *et al.*, 2008), inclusive aqui no Brasil (Gerbase-Delima *et al.*, 2006). Dessa forma, os acHLA de classe I, possivelmente, não apresentam um papel deletério em TO e nos demais grupos de estudo enquanto que as altas concentrações de acHLA de classe II encontradas em RC deve se relacionar com o pior prognóstico desse estado.

Além desses dados, outro ponto analisado foi a especificidade dos acHLA presentes nos indivíduos transplantados. Observamos que 13 de 15 indivíduos transplantados apresentaram acHLA não doador específico e somente os indivíduos Ltx04, do grupo RC, e Ltx70, do grupo Est, apresentaram acHLA doador específico. Esse perfil de especificidade encontrado na maioria dos indivíduos nos leva a pensar em duas possibilidades: que esses indivíduos não apresentam anticorpos circulantes dirigidos ao doador porque esses anticorpos podem estar ligados aos antígenos do doador presentes no enxerto; ou que a presença desses anticorpos não doador específicos esteja relacionada com uma reatividade cruzada.

Esses dados apresentados se assemelham a outros estudos da literatura que indicam a presença de anticorpos HLA não específicos aos doadores (NDSA) como mais frequente do que a presença dos anticorpos HLA doadores específicos (DSA) (Terasaki, 2003; Cai e Terasaki, 2005; Terasaki e Cai, 2005; Lachmann *et al.*, 2009). As hipóteses propostas na literatura para essa observação são que nos casos em que a presença de NDSA esteja associada com a disfunção do transplante, provavelmente os DSA estejam absorvidos pelo enxerto (Terasaki e Ozawa, 2005). Ou, a presença de acHLA pode simplesmente indicar que o paciente é imunologicamente altamente responsivo (Saidman, 2007). Apesar desses dados, não há dados na literatura, até onde sabemos, indicando uma possível função desses anticorpos NDSA em

indivíduos estáveis ou possíveis mecanismos associados a sua presença na circulação. Dessa forma, ainda não temos uma explicação plausível para a presença de anticorpos NDSA em nossos grupos.

Outra investigação objetivando encontrar padrões de resposta imune que diferenciem os indivíduos tolerantes operacionais dos demais grupos clínicos foi a análise da reatividade de autoanticorpos circulantes contra peptídeos da HSP60, uma vez que essa proteína pode induzir atividade imunológica tanto reguladora como inflamatória (Pockley, 2003). Encontramos uma alta frequência de indivíduos apresentando reatividade contra ao menos um peptídeo da HSP60 para o isotipo IgM e uma baixa frequência para o isotipo IgG, Porém, sem diferenças marcantes entre os grupos de estudo.

A alta frequência de indivíduos com autoanticorpos dirigidos a peptídeos da HSP60 humana está de acordo com as observações realizadas em modelos experimentais, com outros antígenos, por Nobrega e colaboradores (Haury *et al.*, 1997; Nobrega *et al.*, 2002). Nesses trabalhos foi observado que repertório de IgMs no soro de animais submetidos a estímulos antigênicos distintos apresentava especificidades conservadas contra uma série de antígenos endógenos (Haury *et al.*, 1997; Nobrega *et al.*, 2002). Essa estabilidade de reconhecimento de autoantígenos indica que o repertório de IgM circulante é construído ativamente pelo reconhecimento de autoantígenos pelos linfócitos B (Haury *et al.*, 1997; Nobrega *et al.*, 2002). Dados similares também já foram encontrados em humanos (Mouthon *et al.*, 1995; Merbl *et al.*, 2007). Dessa forma, a alta frequência de reconhecimento dos peptídeos da HSP60 humana, mediado por IgMs circulantes, nos diferentes grupos de estudo, pode estar justamente relacionada à construção de um repertório de IgMs

conservado entre os diferentes indivíduos, através de experiências autorreativas similares, que contribuem de alguma maneira para o equilíbrio do sistema. Além disso, esse repertório é mantido de forma tão estável que, a despeito de condições clínicas tão contrastantes como a tolerância operacional e a rejeição crônica, não observamos alterações nesse perfil de reatividade no transplante renal. Apesar disso, já foi relatado por Quintana e colaboradores que o repertório de autoanticorpos circulantes possui um perfil de reatividade diferencial em doenças autoimunes quando comparado com indivíduos saudáveis (Quintana *et al.*, 2003; Quintana *et al.*, 2004; Quintana *et al.*, 2008). Em trabalho desenvolvido por nosso grupo foram observadas alterações na reatividade mediada por anticorpos do isotipo IgM contra os peptídeos da HSP60 em indivíduos transplantados cardíacos em relação a indivíduos saudáveis (Lin-Wang, 2009). Esses dados sugerem que a reatividade observada no presente trabalho possa estar relacionada também ao tipo de transplante estudado.

Quando analisadas as frequências de reatividade especificamente contra cada peptídeo, observamos que a única diferença de reatividade se deu pela maior frequência de reconhecimento do peptídeo N2, por anticorpos do isotipo IgM, por indivíduos do grupo TO em relação ao grupo Est ($p=0,04$) e, apesar de não significativo, em relação aos grupos RC e Sau. Esse dado nos sugere que o perfil diferencial de IgMs contra o peptídeo N2 pode diferenciar o estado de tolerância dos demais indivíduos transplantados.

Uma possível interpretação é que a presença desses anticorpos circulantes poderia estar envolvida com uma rápida detecção e eliminação desse peptídeo, da circulação, favorecendo o desenvolvimento de condições reguladoras. Há dados na

literatura indicando que a HSP60 endógena atua como um sinal de perigo, indicando ao sistema imune possíveis perturbações e ativando-o para atuar na reparação dessa condição (Chen *et al.*, 1999; Moseley, 2000; Breloer *et al.*, 2001), através da amplificação de processos inflamatórios (Abulafia-Lapid *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999; Quintana e Cohen, 2005b), ou por mecanismos imunorreguladores (Raz *et al.*, 2001; Quintana *et al.*, 2002; Quintana e Cohen, 2005a). Dessa forma, a presença de anticorpos contra o peptídeo N2 poderia promover a sua eliminação da circulação, ou da HSP60, impedindo um possível processo de ativação do sistema imune e, assim, gerando um ambiente mais propício ao desenvolvimento de condições tolerogênicas.

Não obstante, em trabalho realizado em nosso grupo, foi observado que o peptídeo N2, quando incubado com PBMCs, induzia preponderantemente alterações de expressão gênica relacionadas com o desenvolvimento de condições imunorreguladoras, e a sua presença em reações linfocitárias mistas inibiu a proliferação de células T (Martello, 2009). Além disso, já foi observado em uma série de trabalhos que a HSP60 e seus peptídeos podem suprimir respostas inflamatórias exacerbadas em diversas condições como na diabetes autoimune em humanos (Raz *et al.*, 2007), em modelo experimental de arterioesclerose (Maron *et al.*, 2002), no transplante de pele experimental (Luna *et al.*, 2007), dentre outros. Isso nos faz pensar se uma frequência diferencial no reconhecimento do peptídeo N2 pode refletir um processo de regulação em curso que, de alguma maneira, pode culminar na produção de anticorpos contra esse peptídeo no grupo TO. Nesse sentido, Quintana e colaboradores observaram que a reatividade mediada por autoanticorpos dirigidos a um conjunto de autoantígenos conseguiu discriminar indivíduos saudáveis de indivíduos com esclerose múltipla (Quintana *et al.*, 2008).

Dentre os autoantígenos reconhecidos que apresentavam reatividade diferencial se encontravam peptídeos da HSP60. Isso indica que situações tão opostas como a “homeostase” e a doença podem resultar em padrões diferentes da reatividade mediada por anticorpos contra peptídeos da HSP60. O mecanismo de como essa reatividade poderia estar contribuindo para uma condição imunorreguladora não é ainda conhecida.

Uma possibilidade foi observada em estudo envolvendo um modelo artrite autoimune. Os autores observaram que a presença de anticorpos contra um peptídeo da HSP65 micobacteriana (que possui alta similaridade com a HSP60 humana) foi capaz de inibir o desenvolvimento da doença nesse modelo experimental (Ulmansky *et al.*, 2002). Eles observaram, posteriormente, que a incubação dos anticorpos protetores específicos para o peptídeo da HSP65 com células mononucleares murinas e humanas induziu a produção de uma citocina predominantemente imunorreguladora, a IL-10 (Ulmansky *et al.*, 2002). Os autores levantaram como hipótese que esses anticorpos protetores podem atuar impedindo a ativação de processos inflamatórios, justamente pela eliminação de moléculas HSP circulantes (Ulmansky *et al.*, 2002). Entretanto, os autores não sabem ao certo qual mecanismo envolvido na indução de IL-10 pelos anticorpos dirigidos ao peptídeo da HSP65 (Ulmansky *et al.*, 2002). Nesse sentido, pode ser que a presença de anticorpos contra o peptídeo imunoregulador N2 no presente estudo esteja relacionada a atividades reguladoras similares às encontradas no trabalho realizado por Ulmansky e colaboradores (Ulmansky *et al.*, 2002).

Apesar desses dados associando o reconhecimento de peptídeos da HSP60 com uma função imunorreguladora, não podemos deixar de argumentar que o

reconhecimento do peptídeo N2 foi observado em 3 de 5 indivíduos do grupo TO (Ltx03, Ltx08 e Ltx62) não cobrindo a totalidade do grupo, e que houve reconhecimento desse peptídeo também por indivíduos de outros grupos, inclusive RC. Há ainda a possibilidade de que uma atividade inflamatória possa estar associada ao reconhecimento desse peptídeo, como a deposição do complemento em células apresentando esse peptídeo e reconhecidas pelas IgMs circulantes. O que podemos tirar desses dados é que a frequência de reconhecimento do peptídeo N2 pode diferenciar o grupo TO dos demais grupos de estudo e para testar o seu poder de discriminar o grupo TO, seria necessário uma análise da reatividade a esse peptídeo em um número maior de indivíduos.

Outro parâmetro avaliado na caracterização do componente humoral na tolerância operacional foi a quantidade de células B circulantes e suas subpopulações. Inicialmente, analisamos a porcentagem e número absoluto de células B circulantes nos indivíduos de estudo. Observamos que os grupos RC e Est apresentaram números percentuais e absolutos menores que o grupo Sau, sendo estatisticamente significativo para o grupo RC (Figura 23). Além disso, o grupo TO apresentou níveis circulantes de células B similares aos encontrados nos indivíduos saudáveis. Esses dados indicam que o estado de tolerância envolve a manutenção dos níveis circulantes de células B, enquanto que o estado de agressão ao enxerto está associado a uma queda nos números circulantes de células B.

É importante discutir se a queda nos números circulantes de células B para os grupos Est e RC poderia ser devido ao uso de imunossupressores por esses indivíduos (Tabelas 15 e 16 do anexo B). Entretanto, dos imunossupressores utilizados pelos indivíduos desses grupos de estudo, somente o MMF (inibidor da

síntese de purinas) possui efeito sobre a população de células B, enquanto os demais parecem não apresentar um efeito direto sobre essa população celular (Heidt *et al.*, 2008). Apesar disso, não podemos descartar um efeito indireto, via supressão de células T, sobre células B. Como a imunossupressão utilizada pode inibir a ativação e proliferação de células T, principalmente quando o imunossupressor utilizado é um inibidor de calcineurina (ciclosporina ou tacrolimus), e as células B, geralmente, necessitam de interações com células T auxiliares para serem ativadas, poderia ocorrer um efeito indireto sobre o número circulante de células B, via supressão de células T (Heidt *et al.*, 2010). E esse efeito indireto poderia realmente estar em ação visto que, já foi observado que o grupo RC apresenta números de células T circulantes inferiores aos grupos TO e Sau (Louis *et al.*, 2006) e também de células T reguladoras (Vieira *et al.*, 2010). Assim, indicando uma possível associação com a queda nos números da população de células B observada no presente trabalho.

Publicações recentes envolvendo indivíduos tolerantes mostraram resultados similares a alguns dados apresentados no presente trabalho, nos quais indivíduos tolerantes operacionais apresentavam números de células B circulantes similares àqueles de indivíduos saudáveis e maiores do que de indivíduos do grupo RC e Est (Newell *et al.*, 2010; Pallier *et al.*, 2010). Dessa forma, os nossos dados corroboram esses resultados observados em indivíduos tolerantes operacionais, indicando que o estado de tolerância está associado com a manutenção de números normais de células B circulantes.

Recentemente, foi relatada a existência de uma subpopulação de células B com o fenótipo CD19+CD24^{hi}CD38^{hi} (Bregs), em humanos, capaz de inibir a diferenciação de células T para o fenótipo inflamatório Th1 e suprimir a produção

das citocinas inflamatórias IFN- γ e TNF (Blair *et al.*, 2010). Visando investigar se esta população de Breg poderia ser mobilizada de forma diferencial no estado de tolerância operacional, analisamos os percentuais e números absolutos de Bregs circulantes assim como das populações de células B naïve e de memória (CD19+CD24^{int}CD38^{int} e CD19+CD24^{int}CD38⁻, respectivamente) como descritas na literatura (Carsetti *et al.*, 2004; Sims *et al.*, 2005).

Somente as Bregs e células B de memória apresentaram diferenças entre os grupos. Para as Bregs o grupo TO apresentou percentuais de células circulantes e números absolutos similares ao grupo Sau, enquanto que o grupo RC apresentou uma redução dessa subpopulação (Figura 24). Para a subpopulação de células B de memória, observamos que os números absolutos para os indivíduos dos grupos RC foram menores do que no grupo Sau. Esses dados indicam que o estado de homeostase encontrado em indivíduos TO também está associado com a manutenção das subpopulações de células B de forma similar à encontrada em Sau. Em contraste, o processo de rejeição crônica está associado com uma queda nos números de células Breg e memória, o que pode, de certa forma, comprometer o controle da resposta imune e, assim, contribuir para o descontrole do processo de agressão contra o enxerto.

Uma explicação plausível para associação entre a manutenção das subpopulações de células B e o estado de tolerância operacional é o possível papel que as Bregs podem exercer no controle de processos inflamatórios. Em alguns trabalhos em modelos experimentais, as Bregs têm apresentado a capacidade de suprimir respostas imunes e a sua extinção ou ausência leva ao desenvolvimento de respostas autoimunes exacerbadas (Mizoguchi *et al.*, 1997; Fillatreau *et al.*, 2002;

Mauri *et al.*, 2003). Os mecanismos de supressão utilizados por essas células B foram mediadas, principalmente, pela secreção de IL-10 e pelo contato direto com células T CD4⁺ (Mizoguchi *et al.*, 2002; Mauri *et al.*, 2003). Desse modo, a manutenção dos números circulantes de Bregs em TO pode propiciar o desenvolvimento de mecanismos imunorreguladores, mediados pela citocina IL-10, que contribuam para a tolerância ao enxerto.

A citocina IL-10 deve exercer um papel importante, via Breg, no estado de tolerância operacional por ser considerada uma citocina de atividade chave no controle de processos inflamatórios, na supressão de respostas mediadas por células T e na manutenção da tolerância imunológica (Moore *et al.*, 2001). Nesse sentido, pode ser que a manutenção do número de células Breg nos indivíduos TO esteja envolvida com uma capacidade de suprimir respostas inflamatórias contra o enxerto via produção de IL-10 e contato com células T CD4⁺. Populações com fenótipo similar ao encontrado em nosso estudo também já foram relatadas, em outro trabalho, como aumentadas em relação a indivíduos do grupo Est e similar a Sau, entretanto, nesse estudo, não comparou-se com o grupo RC (Newell *et al.*, 2010).

Em relação à subpopulação de células B de memória, pode ser que a diminuição nos números absolutos circulantes dessa subpopulação em conjunto com a diminuição de outras populações celulares como Bregs e Tregs (Vieira *et al.*, 2010) contribua para a construção do cenário de desequilíbrio da resposta imune e desencadeamento da rejeição no grupo RC.

Aprofundando a caracterização do componente humoral da resposta imune em indivíduos tolerantes operacionais, realizamos análises do repertório do receptor de células B dos indivíduos transplantados. Os indivíduos com rejeição crônica

apresentaram uma redução global na diversidade do repertório de CDR3s dos BCRs (Figura 31). Em contrapartida, os tolerantes operacionais apresentaram uma diversidade do repertório sem diferenças significativas em relação aos saudáveis e mesmos a outros grupos, com um valor intermediário sempre entre o grupo RC e Est para ambos os isotipos de imunoglobulina e no repertório global (Figura 31). Uma primeira argumentação que poderia ser pensada para esse resultado observado é que possivelmente o grupo RC apresentou uma redução da diversidade do seu repertório devido ao uso de imunossupressores.

Como descrito anteriormente, o uso de imunossupressores pode levar a uma queda no número de linfócitos B circulantes (Heidt *et al.*, 2008) e, assim, resultar na redução da diversidade do repertório. Essa queda no número de linfócitos circulantes realmente aconteceu, visto que quando analisamos o número de linfócitos B desses indivíduos, observamos uma diminuição nos números de células circulantes em relação aos indivíduos saudáveis (Figura 23). Entretanto, é difícil atribuir essa queda na diversidade do repertório de indivíduos com rejeição a esses dois fatores, devido aos dados apresentados pelos indivíduos do grupo Est. Esses indivíduos também fazem uso de imunossupressores de forma similar aos indivíduos com rejeição crônica, também apresentando uma diminuição nos níveis circulantes de linfócitos B, entretanto, tiveram uma diversidade de repertório bastante similar àquela apresentada por indivíduos saudáveis.

Outra possível explicação seria que o processo inflamatório desencadeado pela rejeição poderia recrutar células para o sítio inflamatório ou linfonodo drenante e, assim, reduzir o número de determinados clones na circulação. Há alguns relatos na literatura mostrando que durante o processo de rejeição as células do enxerto

produzem a quimiocina CXCL13 que atrai linfócitos B para o sítio de inflamação (Steinmetz *et al.*, 2005; Steinmetz *et al.*, 2009; Wehner *et al.*, 2010), além disso, há também a expressão de integrinas como VCAM e ICAM-1 que propiciam a adesão celular no sítio inflamatório (Cornell *et al.*, 2008).

Outra observação que chamou a atenção foi a maior alteração no repertório para o isotipo IgG em indivíduos do grupo RC (Figura 31). Células B que expressam o isotipo IgG são células que já sofreram algum tipo de ativação que leva à mudança de classe de imunoglobulina. Possivelmente, as células B quando ativadas nos linfonodos drenantes realizam a troca de classe de imunoglobulina para IgG e permanecem no local da ativação, dessa forma, reduzindo o repertório de células B circulantes expressando imunoglobulinas do isotipo IgG. O fato de não termos observado uma redução do repertório de IgG nos demais grupos de estudo não indica que não possa, também, estar acontecendo um processo de ativação de linfócitos B nesses indivíduos. Entretanto, a intensidade em que esse processo deve estar ocorrendo no grupo RC pode ter uma maior repercussão na diversidade do repertório levando à redução do repertório observada.

Em seguida, analisamos mais especificamente as famílias das imunoglobulinas. Observamos que no isotipo IgM, das 7 famílias da região variável pesada (VH1-VH7), o grupo RC apresentou uma queda na diversidade do repertório do isotipo IgM para duas famílias: a família VH3 em relação a Est e Sau ($p < 0,01$) e a família VH6 em relação a Sau ($p < 0,05$) (Figura 29). Para o isotipo IgG, as diferenças foram mais pronunciadas; o grupo RC apresentou uma menor diversidade de repertório para todas as famílias, sendo estatisticamente significativa para as famílias VH1, em relação a Est e Sau ($p < 0,01$), e VH3, em relação a Est ($p < 0,01$) e Sau

($p < 0,001$) (Figura 30). Para esse isotipo, também observamos, que o grupo TO apresentou, para a família VH3, uma diversidade do repertório tão restrita quanto aquela apresentada por indivíduos do grupo RC, significativamente diferente de Sau ($p < 0,01$) (Figura 30). Esses dados, em conjunto, nos faz pensar que o estado de agressão ao enxerto envolve uma redução ou mobilização, para o sítio inflamatório, de todo o repertório das famílias VH para o isotipo IgG e algumas do isotipo IgM, enquanto que o estado de tolerância mobiliza ou suprime famílias específicas, como a VH3 do isotipo IgG, possivelmente relacionadas à preservação da integridade do enxerto.

Eles nos fazem pensar isso porque a família VH3 é a maior família VH em seres humanos, com 22 segmentos gênicos funcionais. E por ser a mais abundante, também é a mais frequentemente encontrada no repertório fisiológico de um adulto, correspondendo de 50 a 60% do repertório (Huang *et al.*, 1992; Brezinschek *et al.*, 1997; Wang e Stollar, 1999). Diante da importância dessa família para a formação do repertório de BCRs do indivíduo, levantamos como hipótese que a redução sistêmica da diversidade nos isotipos IgM e IgG pode estar associado, justamente, ao processo de ativação desencadeado pela rejeição do enxerto, discutido anteriormente, que leva ao recrutamento das células B para o sítio inflamatório. No caso dos indivíduos do grupo TO para o qual observamos uma redução da diversidade para VH3 somente para o isotipo IgG, é possível que esteja ocorrendo um bloqueio da mudança de classe de imunoglobulina de IgM para IgG. Talvez, esse bloqueio esteja relacionado com atividades supressoras que impedem o desenvolvimento de clones reativos contra o enxerto, contribuindo, assim, para a condição de homeostase encontrada nesses indivíduos. De encontro com essa hipótese, em trabalho realizado em modelo

experimental de tolerância no transplante cardíaco, foi observado que animais tolerantes apresentavam uma baixa razão IgG/IgM quando comparados a animais em rejeição crônica, sugerindo um bloqueio na mudança de classe de IgM para IgG (Le Texier *et al.*, 2010). Indicando que esse processo esteja relacionado aos dados observados no nosso estudo.

Na mesma linha de raciocínio avaliamos a queda na diversidade da família VH1, isotipo IgG, no grupo RC. A família VH1, por exemplo, é a terceira mais representada no genoma humano com 10 segmentos gênicos (<http://imgt.cines.fr/>). Até o presente momento, ela foi relatada como usada por anticorpos que reconhecem rotavírus (Weitkamp *et al.*, 2003), fator reumatóide (De Re *et al.*, 2002) e a proteína Env do envelope do HIV humano (Gorny *et al.*, 2009). Ou seja, apresentando reatividade tanto contra micro-organismos como por autoantígenos. Assim, é possível a ativação de clones dessa família com reatividade a aloantígenos contribuam para o processo de rejeição crônica.

E por último, a redução em RC da família VH6, isotipo IgM, é interessante devido às características dessa família. Ela é representada por um único segmento gênico, tem por característica ser a família VH com localização física mais próxima do segmento JH e é altamente representada no repertório de células B imaturas fetais (Schroeder *et al.*, 1987; Schroeder e Wang, 1990; Berman *et al.*, 1991; Van Es *et al.*, 1993), o que sugere uma relação com um repertório de reatividade dirigida a autoantígenos. Além disso, há um relato envolvendo a família VH6 com a formação de autoanticorpos (Logtenberg *et al.*, 1989). Dessa forma, a redução de diversidade observada para essa família em indivíduos do grupo RC, no isotipo IgM, poderia estar relacionada com uma redução na diversidade de células B autorreativas

circulantes. É possível que a redução da diversidade dessa família com características autorreativas prejudique a regulação da homeostase, predispondo esses indivíduos a uma perda no controle da inflamação e desencadeando o processo de rejeição, como descrito na teoria do homúnculo imunológico citada na introdução (Cohen, 2007b; 2007a).

Ainda analisando os dados a respeito da diversidade do repertório de células B dos indivíduos do estudo, foi possível observar uma peculiaridade apresentada por 4 indivíduos do grupo RC. Os indivíduos Ltx02, Ltx05, Ltx13 e Ltx26 apresentaram uma diversidade de repertório muito similar àquela encontrada em indivíduos do grupo Est e Sau (Figura 31), diferenciando-se dos demais indivíduos do grupo. Quando analisamos os dados clínicos desses indivíduos, para tentar visualizar uma possível explicação para essa diferença em relação aos demais indivíduos do grupo, observamos que os indivíduos Ltx05, 13 e 26 foram diagnosticados com rejeição crônica mediada por anticorpos, por meio da detecção de C4d em biópsia do enxerto. Além disso, os indivíduos Ltx02 e 05 apresentaram um amplo espectro de anticorpos reativos contra peptídeos da HSP60 humana e os indivíduos Ltx05 e Ltx26 também apresentaram alo acHLA não doador específicos. Considerando que no processo de rejeição mediado por anticorpos há um processo de ativação e seleção de células B para produzirem anticorpos, esperávamos, justamente, uma maior alteração do repertório nos indivíduos com rejeição mediada por anticorpos. Não encontramos uma possível interpretação para esses dados. Talvez, os indivíduos apresentando rejeição mediada por células, apresentem recrutamento, para o enxerto, de células B com função de apresentadora de antígeno, gerando, assim, a redução da diversidade observada no nosso estudo. Entretanto, para um melhor entendimento da relação

entre a redução de diversidade do repertório de BCR e o tipo de rejeição crônica, essa redução deverá ser melhor investigada em maiores números de indivíduos.

O que concluímos é que a manutenção da diversidade do repertório do BCR dos indivíduos TO, Est e Sau, no presente estudo, pode estar associada com a manutenção do estado de equilíbrio, enquanto que uma redução da diversidade parece estar associada com o desenvolvimento do processo da rejeição crônica.

Além desses interessantes dados envolvendo o repertório do BCR, avaliamos mais especificamente o repertório de cada grupo para cada família de imunoglobulina, considerando a representatividade de cada tamanho de CDR3 dentro de todo repertório de cada indivíduo. Assim, consideramos a representatividade observada era similar ao grupo de indivíduos saudáveis ou se ela apresentava expansão ou deleção. Nessa análise o grupo TO apresentou uma expansão da representatividade dos tamanhos de CDR3 de 16aa para a família VH3 do isotipo IgM e de 5aa para a família VH1 do isotipo IgG, em relação aos demais grupos de estudo. Esse resultado foi o único dado que diferenciou os indivíduos do grupo TO dos indivíduos saudáveis e outros grupos. Não foram observados outros picos representados diferencialmente entre os grupos. Além disso, o que nos chamou a atenção, foi o fato das expansões dos tamanhos de CDR3 de 16aa VH3M e 5aa VH1G terem englobado todos os indivíduos do grupo TO. Fato esse que não foi observado para nenhum tamanho nos demais grupos de estudo. Isso nos leva a crer que a expansão expressiva desses dois tamanhos de CDR3 tenha o potencial de ser “uma assinatura do estado de tolerância” para as células B, podendo discriminar esses indivíduos dos demais estados clínicos grupos de estudo. Entretanto, uma confirmação em outra coorte se faz necessária para testar essa hipótese.

A principal pergunta que nos ocorre a partir desses dados é que atividade funcional têm os clones de linfócitos B que expressam os tamanhos de CDR3 expandidos em indivíduos do grupo TO? Uma hipótese para a função desses clones que expandiram pode estar relacionada com o conceito dos “driver clones” proposta por Eli Sercarz (Sercarz, 2000). Sercarz propôs que a existência de clones com uma alta capacidade de acumular sinais (receptores de células T ou B de alta afinidade, altos níveis de receptores de moléculas coestimuladoras e de citocinas) são os iniciadores das repostas tanto inflamatórias quanto reguladoras (Sercarz, 2000). Após o início da resposta ocorreria o espalhamento da resposta para clones secundários que seriam responsáveis pelo desencadeamento e desfecho da resposta iniciada (Sercarz, 2000). Um exemplo da aplicação desse conceito foi observado em modelos de encefalite autoimune experimental (EAE, do inglês, *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*), no qual em animais acometidos pela doença apresentavam um repertório de células T CD4 composto, principalmente, por clones expressando as famílias de receptor de células T V β 14 (90%) e V β 3 (10%) (Kumar, 1998). Entretanto, a perpetuação da doença dependeria da existência contínua de clones expressando a família V β 2 (Kumar, 1998). Nesse contexto, os “driver clones” estavam envolvidos com o desenvolvimento da doença. Nesse sentido, levantamos como hipótese que a presença de clones de células B representados diferencialmente, em indivíduos do grupo TO, possa estar relacionada com processos imunorreguladores. Nesse contexto, esses clones poderiam ser “driver clones” por induzirem processos imunorreguladores envolvidos na homeostase do indivíduo transplantado.

Visando relacionar a expansão desses clones de células B em indivíduos do grupo TO com alguma atividade funcional, avaliamos o repertório do receptor de células B supressoras com o fenótipo, considerado imunorregulador, CD19+CD24^{hi}CD38^{hi} (Bregs) (Blair *et al.*, 2010), de um indivíduo saudável, e verificamos se havia alguma expansão de tamanhos de CDR3 similar à encontrada em indivíduos TO ou mesmo se as famílias expandidas em TO faziam parte do repertório de Breg. Dessa forma, pretendíamos relacionar as expansões encontradas em TO com essa subpopulação de célula B reguladoras. O repertório de BCR dessa subpopulação, assim como de células B maduras naïve (CD19+CD24^{int}CD38^{int}) e de células B de memória (CD19+CD24^{int}CD38⁻) foi diverso, mas com diferenças na expressão de diversos tamanhos de CDR3 entre essas populações (Figura 37). Vale salientar que essa avaliação deve ser considerada com cuidado, visto que, realizamos o repertório de células B supressoras de somente um indivíduo saudável. Assim, não sabemos se em outros indivíduos o repertório de BCR nas Bregs pode ter alguma restrição de diversidade.

Esse é o primeiro relato, até onde sabemos, descrevendo a diversidade do receptor de células B na subpopulação de Bregs. Essa diversidade encontrada era de certa forma esperada, visto que para células T com função reguladora (Tregs), foi descrito que a sua diversidade e que isso parece ser importante para a sua função na regulação de respostas imunes (Pacholczyk *et al.*, 2006). Dessa forma, um repertório diverso em células Bregs também pode ser importante para o desempenho de suas atividades.

Quando comparados os repertórios das 3 subpopulações de célula B com a apresentada por indivíduos TO não observamos similaridades de expansão no

repertório. Entretanto, os tamanhos representados diferencialmente no grupo TO fazem parte do repertório de Bregs, podendo essas expansões ser parte da subpopulação de células Breg. Uma vez que o receptor de BCR em Breg é diverso, provavelmente, não observamos similaridade nas expansões do repertório do grupo TO com o repertório das Bregs do indivíduo saudável estudado, talvez porque cada indivíduo module o seu repertório de células B de forma particular em função de suas experiências imunológicas durante a vida. Assim, a falta de expansões similares entre TO e Bregs do indivíduo saudável não descarta a possibilidade das expansões observadas em TO serem células B com um papel supressor.

Vale ressaltar que, até onde sabemos, esses é o primeiro trabalho envolvendo a análise do repertório do receptor de células B de indivíduos tolerantes operacionais. Até o momento, somente foi relatado um estudo envolvendo o repertório de TCR com indivíduos tolerantes (Brouard *et al.*, 2005). Nesse estudo, foi observado que indivíduos do grupo TO apresentavam um repertório restrito para alguns tamanhos de CDR3 em algumas famílias β do TCR. Além disso, quando eles purificaram células dessas famílias, com tamanhos de CDR3 restritos, do grupo TO, foi observado um baixo acúmulo de transcritos de citocinas, indicando um estado de hiporresponsividade (Brouard *et al.*, 2005). Nesse sentido, apesar de não termos conseguido purificar células dos indivíduos TO para uma análise similar, poderíamos sugerir que um processo similar poderia estar ocorrendo para as células B, como o observado para células T. Talvez as células apresentando os tamanhos 16aa VH3M e 5aa VH1G possuam um perfil mais imunorregulador.

Com o intuito de caracterizar melhor o papel das Bregs no contexto da tolerância operacional, avaliamos, também, parâmetros funcionais dessas células.

Para realizar essa análise funcional propomos experimentos com o intuito de verificar se a via de sinalização por CD40 possuía um perfil de ativação diferencial entre os indivíduos do estudo. Para tanto, analisamos o nível de fosforilação de STAT3 após estímulo da via CD40, utilizando um anticorpo agonista anti-CD40 seguido de *Cross-link*, como descrito no item 3.20 do material e métodos.

Propusemo-nos a estudar essa via porque foi relatado que para as células Bregs exercerem a sua atividade supressora, a sinalização via CD40 tem papel fundamental (Mizoguchi *et al.*, 1997; Fillatreau *et al.*, 2002; Mauri *et al.*, 2003). Além disso, a produção de IL-10 em Bregs é induzida pela estimulação da via CD40 (Blair *et al.*, 2010) e está associada à fosforilação do fator de transcrição STAT3 (do inglês, *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) (Hanissian e Geha, 1997).

Após o estímulo com anti-CD40 realizado nas PBMCs dos indivíduos dos diferentes grupos de estudo, o primeiro fato que nos chamou a atenção foi o aumento na expressão do marcador de superfície CD38 e, no caso das Bregs, um aumento na expressão de CD24 (Figura 39B), observação essa não relatada por Blair e colaboradores em seu trabalho caracterizando a ativação da via de CD40 em Bregs (Blair *et al.*, 2010). O marcador de superfície CD38 é uma glicoproteína de membrana de 42 kDa expressa em diversos tecidos, incluindo a maioria das linhagens hematopoiéticas (Harada *et al.*, 1993; Shubinsky e Schlesinger, 1997; Lund *et al.*, 1998). Há relatos na literatura indicando que a estimulação via CD40, BCR e IFN- γ em células B leva a um aumento da expressão dessa molécula de superfície (Galibert *et al.*, 1996; Guillianio *et al.*, 2001; Willimott *et al.*, 2007). Dessa forma, o aumento de expressão de CD38, pós-estímulo via CD40, em nosso trabalho,

condiz com o presente na literatura e deve estar relacionado ao processo de ativação celular desencadeado no processo de sinalização via CD40, não parecendo ser um artefato da nossa condição experimental.

Já a molécula CD24, também chamada de antígeno estável ao calor (HSA, do inglês, *Heat Stable Antigen*), é uma glicoproteína com diferentes pesos moleculares, variando de 20 a 70 kda dependendo dos resíduos de açúcar adicionados à proteína (Alterman *et al.*, 1990; Kay *et al.*, 1991; Rougon *et al.*, 1991; Wenger *et al.*, 1991). CD24 é expresso em várias células hematopoiéticas e não hematopoiéticas como células B, T, neutrófilos, células dendríticas, células epiteliais, dentre outras (Fang *et al.*, 2010). Provavelmente, devido à caracterização recente de células Bregs em humanos, não encontramos nenhum relato associando a estimulação via CD40 e o aumento da expressão de CD24 nessa subpopulação de células B. Dessa forma, os resultados observados são potencialmente se a expressão dessa molécula tiver alguma relação funcional nessa subpopulação de células B, quando ativadas. Apesar dessas alterações fenotípicas envolvendo a expressão de CD24 e 38 na população de células B após o estímulo, a análise dos resultados não foi comprometida, visto que a delimitação das regiões das subpopulações continuou sendo possível.

A análise das subpopulações de células B após o estímulo da via de CD40 nos revelou que todos os grupos do estudo possuem uma capacidade de fosforilação da molécula STAT3 similar tanto para células Bregs como para células B naïve e de memória (Figura 42A, B e C). Entretanto, quando analisamos a capacidade de cada grupo de promover a mobilização de Bregs não ativadas, para um estado ativado, os grupos de indivíduos tolerantes e saudáveis apresentaram uma capacidade similar de gerar células ativadas, enquanto que o grupo RC apresentou um comprometimento

na capacidade de gerar células ativadas (Figura 43). Para as outras subpopulações de células B não houve diferença entre os grupos (Figura 43).

Provavelmente, essa capacidade comprometida de gerar células ativadas para STAT3, em indivíduos do grupo RC, pode ser mais um fator contribuindo para o desencadeamento do processo inflamatório contra o enxerto. Além de já possuir um menor número de Bregs circulantes, o menor potencial de ativação dessas células pode comprometer, a produção de IL-10 e, assim, impedir as poucas Bregs restantes de atuar regulando a resposta imune desencadeada. No caso dos indivíduos do grupo TO, a manutenção da capacidade gerar células STAT3 fosforiladas deve atuar contribuindo para o estado de não agressão ao enxerto alcançado pelos indivíduos do grupo TO. Possivelmente, a manutenção da capacidade de gerar células STAT3p positivas leva a uma maior produção de IL-10 do que no grupo RC, o que pode estar contribuindo para regulação da resposta dirigida ao enxerto.

Visando avaliar, no nosso sistema, se a sinalização via CD40 levava à uma produção diferencial de IL-10, estimulamos células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de 5 indivíduos TO, 2 RC, 1 Est e 1 Sau, com CD40 ligante, e observamos se havia uma indução da produção de IL-10. O baixo número de indivíduos analisados nesse ensaio foi devido a problemas logísticos com a disponibilidade de CD40L. Além disso, vale ressaltar que o resultado gerado nesse experimento é de difícil associação com os níveis de ativação de STAT3 observados na técnica de *phosflow*. Como utilizamos PBMCs dos indivíduos para fazer a cultura com estímulo com CD40L, além de promover a ativação de células B, promovemos também a ativação dessa via em monócitos e macrófagos, que também expressam CD40 (Elgueta *et al.*, 2009). A ativação dessa via em monócitos e macrófagos,

geralmente, leva à produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α e MIP-1 α (Van Kooten e Banchereau, 2000). Dessa forma, a liberação dessas citocinas pró-inflamatórias poderia levar a mudanças no perfil de ativação das células B e Bregs, mudando o perfil de produção de IL-10, não sendo assim, possível associar diretamente esses resultados àqueles observados para a fosforilação de STAT3. O mais adequado teria sido realizar experimentos com células B purificadas, entretanto, devido à limitação na disponibilidade de material biológico, principalmente dos indivíduos tolerantes, não foi possível realizar o experimento de tal maneira. Apesar disso, temos resultados que nos auxiliam a pensar funcionalmente e discutir esses dados. Observamos que a subpopulação de células Breg apresentou, apesar de não estatisticamente significativa, o maior aumento médio na porcentagem de células produzindo IL-10 em relação às outras subpopulações de células B. O baixo número de indivíduos não permitiu análises por grupo. Isso indica, que a via de sinalização via CD40 realmente possui repercussão na produção de IL-10 por células B, talvez de forma mais intensa para as Bregs, e que a menor capacidade de ativar Bregs para o fator de transcrição STAT3 no grupo RC pode sim estar comprometendo o papel funcional dessas células e, assim, contribuindo para o desfecho clínico observado.

Nesse sentido, a observação de que os indivíduos TO apresentam preservação dos números circulantes de células Bregs e da capacidade de geração de células ativadas para STAT3p, enquanto que RC apresentam esses dois parâmetros comprometidos, nos levam a crer que, possivelmente, a manutenção da produção de IL-10 mediada por essas células em indivíduos TO contribua para a supressão de uma resposta inflamatória contra o enxerto. Um dado que vem de encontro a esse

raciocínio é que Newel e colaboradores observaram que uma população de células B com características fenotípicas similares às Bregs descritas aqui, apresentou um maior nível de produção de IL-10, em indivíduos TO, quando comparadas com células de indivíduos do grupo Est e similar a Sau (Newell *et al.*, 2010). Vale ressaltar que, provavelmente, as Bregs agem em sinergismo com outras subpopulações de células do sistema imune, contribuindo para homeostase observada em indivíduos TO. Como já descrito por nosso grupo e na literatura, indivíduos do grupo TO apresentam números circulantes de células Tregs (CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺) similares à de indivíduos saudáveis (Louis *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2010). Dessa forma, é possível que células Tregs que expressam CD40L (Guiducci *et al.*, 2005) promovam uma interação com células Bregs, sinalizando via CD40 e ativando sua função supressora. Além disso, foi descrito em um modelo experimental de colite que a presença de IL-10 é fundamental para a manutenção da expressão do fator de transcrição de Tregs, Foxp3, e manutenção de suas funções supressoras (Murai *et al.*, 2009). Assim, as Bregs presentes em níveis normais nos indivíduos TO podem contribuir com a produção de IL-10 para a manutenção das funções supressoras de Tregs.

Outra possibilidade de ação sinérgica das Bregs via produção de IL-10 é em conjunto com a população de monócitos. Em trabalho realizado em nosso grupo, foi observado que indivíduos do grupo TO apresentavam monócitos com uma menor capacidade de fosforilação do fator de transcrição STAT6 (Vieira *et al.*, 2010). STAT6 está envolvido com a regulação da expressão de diversos genes envolvidos nas respostas imunes, como MHC-II (Boothby *et al.*, 1988; Mchugh *et al.*, 2001), moléculas de adesão (Bennett *et al.*, 1997), pró-colágeno (Buttner *et al.*, 2004),

CD11b e CD86 (Deszo *et al.*, 2004) em macrófagos e monócitos. A menor fosforilação observada no grupo dos indivíduos tolerantes operacionais pode implicar em uma menor quantidade de monócitos expressando MHC-II, além de poder limitar a diferenciação de monócitos em células dendríticas, por ter uma menor habilidade de ativar essa via de sinalização (Sakamoto *et al.*, 1995; Takeda *et al.*, 1996; Den Dekker *et al.*, 2008). Assim, a baixa fosforilação de STAT6 pode resultar em monócitos com uma menor capacidade de apresentação de antígenos e com pouca expressão de moléculas coestimuladoras o que pode favorecer um contexto tolerogênico. Nesse cenário, as Bregs poderiam, então, atuar sobre a população de monócitos via a produção de IL-10, inibindo a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por essas células (Moore *et al.*, 2001). Dessa forma, as Bregs presentes em TO podem contribuir para manutenção do perfil mais tolerogênico encontrado em monócitos desse grupo.

Depois de termos realizado toda essa caracterização do componente humoral da resposta imune, nos perguntamos se a análise global, considerando os componentes estudados conjuntamente, poderia nos trazer informações relevantes sobre o papel do componente humoral no estado de tolerância operacional. Este tipo de análise poderia nos trazer informações que permitissem uma discussão sobre o sistema como um todo e não ficarmos focados somente em características específicas da resposta humoral. Para realizar essa análise compilamos a Tabela 7 agrupando os principais parâmetros analisados no presente trabalho. Nessa tabela, podemos observar, em conjunto, todos os dados gerados permitindo a análise visual da relação entre os diferentes parâmetros estudados.

Com essa análise, fica clara a diferença na expansão da representatividade dos tamanhos de 5aa VH1-IgG e de 16aa VH3-IgM nos indivíduos tolerantes operacionais em relação aos demais grupos, assim como as demais diferenças descritas. No entanto, não observamos associações claras entre os diversos parâmetros analisados. Por exemplo, buscamos analisar se havia relação entre as expansões dos tamanhos citados com maiores valores de Breg ou maior aumento no percentual de Bregs ativadas para o fator de transcrição STAT3 pós-estímulo com anti-CD40, entretanto não encontramos. Assim, a análise global, feita dessa forma, não nos permitiu tirar conclusões novas, além das já discutidas. Apesar disso, julgamos válida e importante a tentativa de avaliar conjuntamente os dados. Atualmente, nos deparamos muito frequentemente, em trabalhos na literatura, com tentativas de se realizar análises mais amplas do sistema imune, como por exemplo, utilizando-se de análises por *microarray* (Brouard *et al.*, 2007; Martinez-Llordella *et al.*, 2008; Newell *et al.*, 2010), por sequenciamento em larga escala (Durant *et al.*, 2010; Elo *et al.*, 2010; Ebert *et al.*, 2011) e análises de modificações da expressão gênica, por modificações epigenéticas (Beima *et al.*, 2006; Lewis *et al.*, 2007; Miller *et al.*), em todo o genoma. Entretanto, a dificuldade de análise para tamanha complexidade de dados gerados termina, tendenciosamente, nos levando a focar no que consideramos, subjetivamente, mas importante.

Propomos que, para entendermos, de forma mais integrada, como o sistema atua como um todo é preciso ir além da análise focada e aprofundar mais a observação de diversos parâmetros que podem estar atuando em conjunto. Sabemos que esse tipo de proposta não é de execução trivial, devido a nossa restrita capacidade de processamento de tamanho volume de dados e, possivelmente, deve

passar pelo desenvolvimento de algoritmos que nos permitam realizar um tratamento adequado dessas informações. Apesar de não termos conseguido extrair novas relações entre nossos dados, com essa análise, consideramos relevante discutir a importância de buscar caminhos para ampliar nosso foco de observação na direção da relação entre vias moleculares e diferentes sistemas, com o intuito de trazer novas contribuições para a construção do conhecimento.

Em suma, no presente trabalho investigamos, de forma ampla, o potencial envolvimento do componente humoral da resposta imune no estado de tolerância operacional, em humanos. Para tal, realizamos análises de múltiplos parâmetros, envolvendo alo e autoanticorpos circulantes, o repertório do receptor de células B, a quantificação de células B e de suas subpopulações circulantes, e o perfil de ativação do fator de transcrição STAT3 em células Bregs. Dentre todos os parâmetros avaliados, concluímos que o estado de tolerância ao enxerto renal, provavelmente, envolve a manutenção da diversidade do repertório do receptor de células B de forma similar ao encontrado em indivíduos saudáveis. Esse repertório apresentou expansões diferenciais de clones expressando tamanhos específicos da região CDR3 na tolerância operacional, que podem ser possíveis marcadores moleculares, além de potencial envolvimento funcional, nesse estado. Além disso, esse estado tão peculiar apresenta a manutenção dos números de células B e Bregs circulantes em níveis similares àqueles de indivíduos saudáveis e maiores que indivíduos em rejeição crônica. A população de células Bregs apresenta uma manutenção na capacidade gerar células ativadas para STAT3 em indivíduos TO, enquanto RC apresenta essa capacidade comprometida. A análise desses dados nos levam a crer que o

componente humoral possui sim uma contribuição significativa na homeostase com o enxerto.

Gostaríamos, também, de trazer como reflexão que, levando em conta os dados do presente trabalho e da literatura, o estado de tolerância operacional envolve, principalmente, a manutenção de parâmetros do sistema imune de forma muito similar ao encontrado em indivíduos saudáveis, apresentando somente a mobilização diferencial de poucas vias. Isso é importante porque durante anos, a comunidade científica imaginou que estados peculiares como o de tolerância operacional envolveriam induções ou inibições expressivas de vias imunológicas, e que a indução dessas vias poderia levar ao desenvolvimento de tolerância em humanos. No nosso entendimento, parece-nos muito mais plausível pensar em abordagens que direcionem a manutenção de condições homeostáticas, do sistema imune, e, assim, favorecer o desenvolvimento de condições necessárias para o estabelecimento da tão almejada tolerância imunológica em humanos.

Como modelo (Figura 46), propomos que a manutenção dos números de Bregs circulantes, com capacidade de ativação conservada, possa ter relevância no controle da resposta alogênica de diversas maneiras. As células Breg podem interagir diretamente com células CD4⁺ efetoras, por contato, estimulando CTLA4 pela ligação via CD80/86 e, liberando IL-10, impedir ou suprimir a ativação dessas células. As células Breg podem atuar em sinergismo com células Tregs em um *loop de feedback* positivo, onde Tregs ativariam à via de CD40 pela ligação a molécula de CD40L expressa na sua superfície. Isso estimularia as Bregs a produzirem IL-10 que, por sua vez, contribui para a manutenção da expressão de Foxp3 nas Tregs e de suas funções supressoras (Figura 46). Assim, as células Bregs poderiam contribuir para a

supressão da resposta imune mediada por Tregs. Ademais, pela produção de IL-10, as Bregs podem ainda contribuir com a manutenção do estado quiescente apresentado por monócitos nesses indivíduos, como descrito por nosso grupo, e, assim, regular mais um braço da resposta inflamatória (Figura 46). Esse cenário pode ainda ter a participação de “driver clones” de Bregs que apresentam receptores de CDR3 com tamanhos específicos, como sugerimos no presente trabalho.

Pensamos, também, que o desequilíbrio global do componente humoral apresentado pelos indivíduos com rejeição crônica possa levar ao comprometimento desses múltiplos mecanismos imunorreguladores, contribuindo para o estado clínico de perda da função do enxerto.

Atualmente, a indução de tolerância ao enxerto em modelos experimentais já é uma realidade para ciência, entretanto, enfrentamos uma batalha dia após dia para traduzir essas informações geradas no campo experimental para uma aplicação clínica. No presente trabalho, avaliando diversos parâmetros do componente humoral da resposta imune, conseguimos contribuir mais um pouco para a construção do conhecimento nessa área tão importante que é a de tolerância imunológica em humanos. Esperamos que os dados gerados aqui, em conjunto com os já descritos na literatura, venham ser úteis na proposição de novas abordagens para a indução da tolerância em humanos.

Figura 46. Modelo proposto para os mecanismos de controle da resposta imune em indivíduos tolerantes por Bregs circulantes. Os mecanismos propostos incluem: **1)** Ativação via CD40 da produção de IL-10 e concomitante inibição via IL-10 e CTLA-4 da ativação e proliferação de células T efectoras e de processos inflamatórios. **2)** Inibição de atividades pró-inflamatórias, como a produção de citocinas e quimiocinas, por monócitos e contribuição na manutenção do estado hiporresponsivo, observado nessas células, em TO (Vieira *et al.*, 2010). **3)** A produção de IL-10 por Bregs pode contribuir para a manutenção da expressão de Foxp3 por Tregs e das funções supressoras dessas células.

6. Conclusões

1. O estado de tolerância operacional apresentou um perfil imunomolecular, para o compartimento de células B, semelhante àquele observado nos indivíduos saudáveis, em contraste com o estado de rejeição crônica. Isso nos sugere que a preservação numérica e qualitativa desse compartimento desempenhe um papel importante neste estado de homeostase no transplante humano.

2. O estado de tolerância operacional se destacou de todos os grupos pela maior expansão de clones de células B apresentando dois tamanhos específicos da região CDR3 do receptor de célula B: VH3-IgM com 16 aminoácidos e VH1-IgG com 5 aminoácidos. Além do seu potencial valor para o diagnóstico, a expansão diferencial desses clones apóia a idéia da existência de atividade funcional do componente B da resposta imune operante na tolerância operacional.

3. O estado de rejeição crônica apresentou diversas deficiências qualitativas e funcionais no componente B da resposta imune, como: diminuição dos números de linfócitos B, de células B de memória e de células B reguladoras; diminuição da diversidade do repertório do receptor de células B e menor capacidade na geração de células B ativadas para o fator de transcrição STAT3, importante para a produção de IL-10. Esses dados nos levam a interpretar que o desequilíbrio no componente B altere o controle de mecanismo imunorreguladores da resposta imune, contribuindo para a evolução do processo de rejeição crônica.

4. Considerando os resultados do presente trabalho e o conjunto de dados da literatura, concluímos que o estado de tolerância operacional envolve, principalmente, a preservação de múltiplos caminhos imunorreguladores, ocorrendo

a mobilização diferencial de apenas algumas vias imunorreguladoras, resultando em um perfil imunomolecular sistêmico muito similar àquele encontrado em indivíduos saudáveis.

ANEXOS

ANEXO A

**Reatividade humoral dirigida a antígenos
HLA e Tipificação HLA dos indivíduos do
estudo.**

Tabela 8. Reatividade a antígenos HLA mediada por anticorpos circulantes, em indivíduos tolerantes operacionais.

Paciente	Grupo clínico	Painel pré tx		Painel soro coleta 1		Painel soro coleta 3		Alelos reconhecidos		HLA RECEPTOR	HLA DOADOR	Especificidade dos anticorpos
		Classe I	Classe II	Classe I	Classe II	Classe I	Classe II	Classe I	Classe II	HLA-A; B; DR (A, A; B, B; DR; DR)	HLA-A; B; DR (A, A; B, B; DR; DR)	
LTX03	TO	ND	ND	Neg	Neg	Neg	Neg	NA	NA	ND	ND	NA
LTX08	TO	0%	0%	Pos	Pos	Pos	Pos	A80; B42; B54; B55; B56; B67; B7; B81; B8201; Cw2; Cw4; Cw14; DP1	DP1	1, 3; 44, 57; 1, 7	2, 11; 27, 44; 1, 4	NDSA
LTX10	TO	ND	ND	Neg	Neg	Neg	Neg	NA	NA	3, 34; 7, 18; 3, 17	3, 34; 7, 18; 4, 17	NA
LTX16	TO	ND	ND	Pos	Neg	ND	ND	A1; A11; A26; A36; A43; A80; B76; Cw2	NA	2, 0; 15, By5-W4-W6; nd, nd	ND	NDSA
LTX62	TO	0%	0%	Neg	Pos	Neg	Pos	NA	DQ5; DQ6; DR7; DR12; DR13	2, 26; 44, X; 17, 4	26, 28; 38, 20 ; 0	NDSA

Todas as reações para determinação da reatividade humoral dos indivíduos do estudo foram realizadas por Luminex como descrito no item 3.6. Tx: Transplante; TO: Tolerante operacional; NDSA: Anticorpos não doador específicos; ND: Não disponível; Pos: Positivo; Neg: Negativo; NA: Não se aplica. Em negrito as diparidades de antígenos HLA do doador em relação ao receptor.

Tabela 9. Reatividade a antígenos HLA mediada por anticorpos circulantes, em indivíduos com rejeição crônica.

Paciente	Grupo clínico	Biópsia C4d+	Painel pré tx		Painel soro coleta 1		Painel soro coleta 3		Alelos reconhecidos		HLA RECEPTOR	HLA DOADOR	Especificidade dos anticorpos
			Classe I	Classe II	Classe I	Classe II	Classe I	Classe II	Classe I	Classe II	HLA-A; B; DR (A, A; B, B; DR; DR)	HLA-A; B; DR (A, A; B, B; DR; DR)	
LTX01	RC	ND	ND	ND	Neg	Neg	ND	ND	NA	NA	ND	ND	NA
LTX02	RC	ND	ND	ND	Neg	Neg	ND	ND	NA	NA	ND	ND	NA
LTX04	RC	Neg	ND	ND	Pos	Neg	Pos	Neg	A2; B35; B44; B45; B49; B50; B51 ; B52; B53; B56; B57; B58; B62; B63; B71; B72; B75; B76; B77; B8201	NA	24, 34; 8, 27; 3, 13	66, 68; 51, 18; 12, 8	DSA (B51)/NDSA
LTX05	RC	C4d+	ND	ND	Pos	Pos	Pos	Pos	B13; B45; B49; B50; B56; B59; B8201;	DQ2; DQ4; DQ7; DR16	31, 68; 51, 62; 4, 0	2, 0; 8, 0; 17, 9	NDSA
LTX06	RC	Neg	ND	ND	Neg	Neg	Neg	Neg	NA	NA	2, 0; 51, 0; 4, 53	2, 68; 35, 0; 4, 13	NA
LTX07	RC	Neg	ND	ND	Neg	Neg	Neg	Neg	NA	NA	3, 0; 7, 55; 4, 8	33, 68; 58, 35; 13, 14	NA
LTX13	RC	C4d+	0%	0%	Neg	Neg	Neg	Neg	NA	NA	2, 24; 44, 45; nd, nd	24, 30 ; 45, 0; 15, 13	NA
LTX24	RC	Neg	0%	0%	Neg	Pos	Neg	Pos	NA	DQ2; DQ4; DQ6; DQ7; DQ8; DQ9; DR9	2, 3; 51, 71; 10, 16	29, 30; 57, 42; 4, 10	NDSA
LTX25	RC	Neg	ND	ND	Neg	Neg	Neg	Neg	NA	NA	26, 31; 51, 50; 4, 14	24, 0; 46, 59; 0,	NA
LTX26	RC	C4d+	0%	0%	Neg	Pos	Neg	Pos	NA	DQ2	2, 11; 51, 55; 14, 8	2, 31; 8, 44; 7, 17	NDSA
LTX32	RC	Neg	ND	ND	Neg	Neg	Neg	Neg	NA	NA	2, X; 18, 37; nd, nd	2, 31; 62 ; nd; 0, nd	NA
LTX67	RC	Neg	ND	ND	Neg	Neg	Neg	Neg	NA	NA	24, 31; 7, 63; 9, 0	24, X; 7, X; 1, X	NA
LTX72	RC	Neg	0%	0%	Neg	Neg	ND	ND	NA	NA	24, 29; 7, 44; 15, 0	2, 26; 45, 50; 13, 7	NA

Todas as reações para determinação da reatividade humoral dos indivíduos do estudo foram realizadas por Luminex como descrito no item 3.6.

Tx: Transplante; RC: Rejeição Crônica; DSA: Anticorpos doador específicos; NDSA: Anticorpos não doador específicos; ND: Não disponível; Pos: Positivo; Neg: Negativo. NA: Não se aplica. Em negrito as diparidades de antígenos HLA do doador em relação ao receptor.

Tabela 10. Reatividade a antígenos HLA mediada por anticorpos circulantes, em indivíduos estáveis com doses habituais de imunossupressores.

Paciente	Grupo clínico	Painel pré tx		Painel soro coleta 1		Painel soro coleta 3		Antígenos reconhecidos		HLA RECEPTOR	HLA DOADOR	Especificidade dos anticorpos
		Classe I	Classe II	Classe I	Classe II	Classe I	Classe II	Classe I	Classe II	HLA-A; B; DR (A, A; B, B; DR; DR)	HLA-A; B; DR (A, A; B, B; DR; DR)	
LTX09	EST	0%	0%	Neg	Neg	Neg	Neg	NA	NA	2, 3; 7, 48; 9, 15	3, 26; 35, 0; 9, 15	NA
LTX11	EST	0%	0%	Pos	Neg	Neg	Neg	A11; A24; A32; B13; B37; B8; B8201; Cw4; Cw7	NA	29, 30; 81, 42; 15, 18	23, 0; 7, 72; 1, 7	NDSA
LTX12	EST	0%	0%	Neg	Neg	Neg	Pos	NA	DQ2; DQ4; DQ5; DQ7; DQ8; DQ9; DP1; DP3; DP14; DP17; DR53	1, 2; 14, 53; 11, 13	29, 33; 44, 65; 1, 7	NDSA
LTX14	EST	0%	0%	Neg	Pos	Neg	Pos	NA	DQ2; DQ7; DQ9; DR52	2, 11; 7, 51; 8, 14	11, 30; 51, 18; 14, 17	NDSA
LTX17	EST	21%	0%	Pos	Neg	Pos	Neg	B8201	NA	2, 0; 15, 35; 8, 13	2, 23; 39, 44; 8, 13	NDSA
LTX19	EST	0%	0%	Neg	Neg	Neg	Neg	NA	NA	2, 24; 45, 65; 0, 13	1, 2; 62, 45; 13, 52	NA
LTX20	EST	0%	0%	Neg	Neg	Neg	Neg	NA	NA	30, 68; 51, 72; 7, 11	23, 74; 72, 81; 11, 0	NA
LTX21	EST			Pos	Neg	Pos	Neg	A31; A33	NA	19, 0; 14, 21; nd, nd	1, 0; 8, 21; nd; nd	NDSA
LTX22	EST	0%	0%	Pos	Neg	Pos	Neg	B7; B27; B39; B42; B54; B55; B64; B67; B78; B8; B81; Cw10	NA	1, 2; 13, 49; 13, 15	1, 31; 49, 52; 4, 13	NDSA

Todas as reações para determinação da reatividade humoral dos indivíduos do estudo foram realizadas por Luminex como descrito no item 3.6. Tx: Transplante; Est: Indivíduos com função estável do enxerto e doses habituais de imunossupressores; DSA: Anticorpos doador específicos; NDSA: Anticorpos não doador específicos; ND: Não disponível; Pos: Positivo; Neg: Negativo. NA: Não se aplica. Em negrito as diparidades de antígenos HLA do doador em relação ao receptor.

Tabela 10 (continuação). Reatividade a antígenos HLA mediada por anticorpos circulantes, em indivíduos estáveis com doses habituais de imunossuppressores.

Paciente	Grupo clínico	Painel pré tx		Painel soro coleta 1		Painel soro coleta 3		Antígenos reconhecidos		HLA RECEPTOR	HLA DOADOR	Especificidade dos anticorpos
		Classe I	Classe II	Classe I	Classe II	Classe I	Classe II	Classe I	Classe II	HLA-A; B; DR (A, A; B, B; DR; DR)	HLA-A; B; DR (A, A; B, B; DR; DR)	
LTX23	EST	71%	67%	Pos	Pos	Pos	Pos	A1; A23; A24; A25; A32; A66; B13; B27; B37; B38; B44; B45; B47; B49; B50; B51; B52; B53; B55; B59; B63; B77;	DQ4; DQ5; DQ6; DR15; DR16	29, 0; 35, 0; 17, 11	29, 11 ; 35, 18 ; 17, 4	NDSA
LTX27	EST			Neg	Neg	Neg	Neg	NA	NA	ND	ND	NA
LTX28	EST			Neg	Neg	ND	ND	NA	NA	nd, nd; nd, nd; 4, 11	ND	NA
LTX29	EST	32%	0%	Neg	Neg	ND	ND	NA	NA	2, 3; 35, 38; 1, 11	3, 30 ; 65 , 71 ; 1, 15	NA
LTX30	EST			Neg	Neg	Neg	Neg	NA	NA	1, X; 7, X; nd, nd	2, 3; 44, 62; nd, 0	NA
LTX31	EST	0%	0%	Neg	Neg	Neg	Neg	NA	NA	2, 29; 8, 51; 11, 17	2, 30 ; 35 , 51; 11, 18	NA
LTX33	EST	0%	0%	Neg	Neg	Neg	Neg	NA	NA	1, 23; 37, 51; 11, 14	3 , 24 ; 7 , 35 ; 1, 14	NA
LTX34	EST			Neg	Neg	ND	ND	NA	NA	ND	ND	NA
LTX70	EST	0%	0%	Pos	Neg	ND	ND	A1; A26; A29; A36; A80; Cw1	NA	25, 32; 35, 44; 4, 11	1 , 2 ; 51 , 53 ; 13 , 8	DSA (A1) / NDSA
LTX71	EST	0%	0%	Neg	Neg	ND	ND	NA	NA	2, 30; 53, 72; 4, 13	30, 68 ; 51 , 53; 13, 13	NA

Todas as reações para determinação da reatividade humoral dos indivíduos do estudo foram realizadas por Luminex como descrito no item 3.6. Tx: Transplante; Est: Indivíduos com função estável do enxerto e doses habituais de imunossuppressores; DSA: Anticorpos doador específicos; NDSA: Anticorpos não doador específicos; ND: Não disponível; Pos: Positivo; Neg: Negativo. NA: Não se aplica. Em negrito as diparidades de antígenos HLA do doador em relação ao receptor.

Tabela 11. Reatividade a antígenos HLA mediada por anticorpos circulantes, em indivíduos saudáveis doadores renais.

Paciente	Grupo clínico	Painel soro 1 coleta		Painel soro 3 coleta		Antígenos reconhecidos		HLA RECEPTOR	Especificidade dos anticorpos
		Classe I	Classe II	Classe I	Classe II	Classe I	Classe II	HLA-A; B; DR (A,A;B,B;DR;DR)	
LTX15	Sau	Neg	Neg	ND	ND	NA	NA	ND	NA
LTX18	Sau	Pos	Neg	Pos	Neg	A25; A26; A43; A66; A80	NA	ND	NDSA
LTX36	Sau	Neg	Neg	Neg	Neg	NA	NA	3, 24; 7, 35; 1, 14	NA
LTX37	Sau	Neg	Pos	Neg	Pos	NA	DR13	2, 24; 45, 51; 12, 8	NDSA
LTX38	Sau	Pos	Neg	Pos	Neg	A1; A25; A26; A34; A66; B8201; Cw2; Cw7	NA	2, 24; 8, 65; 1, 15	NDSA
LTX39	Sau	Pos	Pos	Pos	Pos	B7; B42; B48; B60; B81;	DR11; DR12; DR13; DR14; DR17; DR18; DR7; DR8; DR9	24, 0; 60, 54; 4, 0	NDSA
LTX40	Sau	Pos	Neg	Pos	Neg	A23; A24; A31; A33; B7; B13; B27; B48; B60; B61; B73; B81	NA	1, 11; 44, 62; 4, 13	NDSA
LTX41	Sau	Neg	Neg	Neg	Neg	NA	NA	1, 68; 55, 71; 17, 11	NA
LTX42	Sau	Neg	Neg	Neg	Neg	NA	NA	24, 30; 45, 0; 15, 13	NA
LTX43	Sau	Neg	Neg	Neg	Neg	NA	NA	1, 2; 62, 45; 13, 52	NA
LTX44	Sau	Neg	Neg	Neg	Neg	NA	NA	1, 31; 49, 52; 4, 13	NA

Todas as reações para determinação da reatividade dos indivíduos do estudo foram realizadas por luminex como descrito no item 3.6; Sau: Indivíduos saudáveis doadores renais; NDSA: Anticorpos não doadores específicos; ND: Não disponível; Pos: Positivo; Neg: Negativo. NA: Não se aplica.

Tabela 12. Especificidade e intensidade de reatividade dos anticorpos anti-HLA de classe I.

Grupos do estudo							
TO				RC			
Ltx08		Ltx16		Ltx04		Ltx 05	
Antígenos reconhecidos	MFI	Antígenos reconhecidos	MFI	Antígenos reconhecidos	MFI	Antígenos reconhecidos	MFI
B81	9760,13	A1	8724,98	B57	5377,82	B49	2156,1
B56	9324,52	A36	4756,24	B45	4223,7	B45	2076,66
A80	9248,3	A26	2930,54	B58	4142	B8201	1682,99
B8201	8958,71	A80	2770,12	A2	3334,33	B50	1416,44
B7	7847,21	A43	2298,29	B76	2652,35	B13	1032,23
B42	7422,63	B76	1485,82	B44	2195,56	B59	893,27
B67	6378,67	A11	1027,66	B8201	1762,98	B56	715,65
B54	5631,41	A29	968,74	B50	1703,49		
B55	4420,81	Cw2	892,55	B62	1386,12		
Cw4	1693,66			B52	1230,54		
Cw2	764,94			B51(DSA)	1224,61		
Cw14	645,56			B63	1067,97		
				B49	957,36		
				B75	875,63		
				B35	874,85		
				B72	743,13		
				B53	693,01		
				B71	675,82		
				B77	675		
				B56	636,39		
Número de antígenos HLA reconhecidos				Número de antígenos HLA reconhecidos			
Ltx08		Ltx16		Ltx04		Ltx05	
Antígenos A reconhecidos	1		7		1		0
Antígenos B reconhecidos	8		1		19		7
Antígenos C reconhecidos	3		1		0		0
Total	12		9		20		7

Todas as reações para determinação da reatividade humoral dos indivíduos do estudo foram realizadas por Luminex como descrito no item 3.6. TO: Tolerante operacional; RC: Rejeição Crônica; MFI: mediana de intensidade de fluorescência. DSA: Anticorpo doador específico.

Tabela 12 (continuação). Especificidade e intensidade de reatividade dos anticorpos anti-HLA de classe I.

Grupo do estudo											
Est											
Ltx11		Ltx17		Ltx21		Ltx22		Ltx23		Ltx70	
Antígenos reconhecidos	MFI	Antígenos reconhecidos	MFI	Antígenos reconhecidos	MFI	Antígenos reconhecidos	MFI	Antígenos reconhecidos	MFI	Antígenos reconhecidos	MFI
A11	1704,09	B8201	1783,08	A31	9557,86	B55	1668,4	A32	7491,15	A29	3859,6
B8201	1075,82			A33	3101,35	B27	1508,69	B49	7150,22	A80	3039
A32	1069,15					B42	1390,94	B51	6908,56	A1 (DSA)	2188,77
B37	985,79					B64	954,85	B38	6708,86	A26	1580,7
B8	718,51					B7	954,84	A25	6571,5	A36	1345,66
Cw4	675,37					B81	871,71	A23	6213,52	Cw1	759,85
A24	641,95					B8	772,6	B27	6101,75		
Cw7	632,88					B67	768,17	B59	5629,04		
B13	611,32					Cw10	720,32	B53	5619,83		
						B39	699,99	A24	5283,6		
						B78	660,29	B52	5263,26		
						B54	566,7	B77	5242,24		
								B37	4973,46		
								B13	4817,88		
								B45	4623,32		
								B44	4620,42		
								B50	4030,1		
								B63	3964,98		
								B47	3095,31		
								A1	2368,31		
								A66	1955,51		
								B55	1862,98		
Número de antígenos HLA reconhecidos											
	Ltx11		Ltx17		Ltx21		Ltx22		Ltx23		Ltx70
Antígenos A reconhecidos	3		0		2		0		6		5
Antígenos B reconhecidos	4		1		0		11		16		0
Antígenos C reconhecidos	2		0		0		1		0		1
Total	9		1		2		12		22		6

Todas as reações para determinação da reatividade humoral dos indivíduos do estudo foram realizadas por Luminex como descrito no item 3.6. Est: Indivíduos com função estável do enxerto tomando doses habituais de imunossupressores; MFI: mediana de intensidade de fluorescência. DSA: Anticorpo doador específico.

Tabela 12 (continuação). Especificidade e intensidade de reatividade dos anticorpos anti-HLA de classe I.

Grupo do estudo							
Sau							
Ltx18		Ltx38		Ltx39		Ltx40	
Antígenos reconhecidos	MFI	Antígenos reconhecidos	MFI	Antígenos reconhecidos	MFI	Antígenos reconhecidos	MFI
A80	1066,29	A34	3025,26	B7	7259,8	A31	1971,66
A43	669,78	A66	1020,5	B81	7068,76	B81	1843,12
A66	647,53	A25	708,11	B48	7039,69	B27	1753,24
A26	582,23	A26	682,48	B60	4964,02	B7	1495,61
A25	579,94	B8201	636,63	B42	1001,12	B48	1338,19
		A1	624,85			B61	1268,92
		Cw2	595,45			B60	1160
		Cw7	587,56			B13	935,19
						A23	838,29
						B73	760,67
						A33	617,99
						A24	541,83
Número de antígenos HLA reconhecidos							
	Ltx18		Ltx38		Ltx39		Ltx40
Antígenos A reconhecidos	5		5		0		4
Antígenos B reconhecidos	0		1		5		8
Antígenos C reconhecidos	0		2		0		0
Total	5		8		5		12

Todas as reações para determinação da reatividade humoral dos indivíduos do estudo foram realizadas por Luminex como descrito no item 3.6. Sau: Indivíduos saudáveis doadores renais; MFI: mediana de intensidade de fluorescência.

Tabela 13. Especificidade e intensidade de reatividade dos anticorpos anti-HLA de classe II.

Grupos do estudo							
TO				Sau			
Ltx08		Ltx62		Ltx37		Ltx39	
Antígenos reconhecidos	MFI	Antígenos reconhecidos	MFI	Antígenos reconhecidos	MFI	Antígenos reconhecidos	MFI
DP1	1705,21	DQ5	4073,35	DR13	746,69	DR17	3760,89
		DQ6	2593,5			DR12	3713,58
		DR12	2465,13			DR14	3483,94
		DR7	1297,42			DR13	3206,41
		DR13	928,64			DR8	3097,44
						DR11	2644,9
						DR18	2464,43
						DR9	774,09
						DR7	686,63
Número de antígenos HLA reconhecidos				Número de antígenos HLA reconhecidos			
	Ltx08		Ltx62		Ltx37		Ltx39
Antígenos DR reconhecidos	0		3		1		9
Antígenos DQ/DP reconhecidos	1		2		0		0
Total	1		5		1		9

Todas as reações para determinação da reatividade humoral dos indivíduos do estudo foram realizadas por Luminex como descrito no item 3.6. TO: Tolerante operacional; Sau: Indivíduos saudáveis doadores renais; MFI: mediana de intensidade de fluorescência.

Tabela 13 (continuação). Especificidade e intensidade de reatividade dos anticorpos anti-HLA de classe II .

Grupo do estudo					
RC					
Ltx 05		Ltx24		Ltx26	
Antígenos reconhecidos	MFI	Antígenos reconhecidos	MFI	Antígenos reconhecidos	MFI
DQ7	14863,79	DQ8	14108,15	DQ2	8077.94
DQ4	13592,54	DQ6	13772,77		
DQ2	13029,47	DQ2	13060,69		
DR16	1516,42	DQ4	12481,6		
		DQ9	9348,33		
		DQ7	7679,3		
		DR9	1693,45		
Número de antígenos HLA reconhecidos					
	Ltx05		Ltx24		Ltx26
Antígenos DR reconhecidos	1		1		0
Antígenos DQ/DP reconhecidos	3		6		1
Total	4		7		1

Todas as reações para determinação da reatividade humoral dos indivíduos do estudo foram realizadas por Luminex como descrito no item 3.6. RC: Rejeição Crônica; MFI: mediana de intensidade de fluorescência.

Tabela 13 (continuação). Especificidade e intensidade de reatividade dos anticorpos anti-HLA de classe II.

Grupo do estudo					
Ltx12		Est	Ltx23		
Antígenos reconhecidos		MFI	Antígenos reconhecidos		MFI
DR53	7695,8	DQ2	15979,94	DQ6	9054,46
DQ7	7231,7	DQ7	3430,82	DQ5	8108,12
DQ2	6077,3	DQ9	2221,1	DQ4	3663,95
DQ5	4319,83	DR52	922,64	DR15	3296,44
DQ9	3582,71			DR16	2319,84
DQ8	1432,54				
DQ4	926,45				
DP14	893,95				
DP1	690,5				
DP3	667,12				
DP17	591,89				
Número de antígenos HLA reconhecidos					
	Ltx12		Ltx14		Ltx23
Antígenos DR reconhecidos	1		1		2
Antígenos DQ/DP reconhecidos	10		3		3
Total	11		4		5

Todas as reações para determinação da reatividade humoral dos indivíduos do estudo foram realizadas por Luminex como descrito no item 3.6 . Est: Indivíduos com função estável do enxerto tomando doses habituais de imunossupressores; MFI: mediana de intensidade de fluorescência.

ANEXO B

Dados clínicos Individuais.

Tabela 14. Dados demográficos e clínicos dos indivíduos em estado de tolerância operacional.

Pacientes	Grupo Clínico	Sexo	Idade	Doença de Base	Nº de Gestações	Tempo de Hemodiálise(meses)	Nº de Transfusões	Nº de Transplantes	Tempo de Transplante (anos)	Tipo de Doador	Disparidades HLA
LTx03	TO	M	54	Glomerulonefrite membrano proliferativo	NA	ND	ND	ND	25	Vivo não aparentado	3
LTx08	TO	M	41	Glomerulonefrite crônica	NA	24	2	2	7	Falecido	4
LTx10	TO	F	42	Nefropatia diabética	2	NA	0	1	9	Vivo aparentado	Idêntico
LTx16	TO	F	48	Glomerulonefrite crônica	ND	54	>50	1	25	Vivo aparentado	Idêntico
LTx62	TO	M	31	Glomerulonefrite esclerose segmentar focal	NA	ND	ND	1	14	Vivo aparentado	3

Tx: Transplante; TO: Tolerância operacional; M: Masculino; F: Feminino; NA: não se aplica; ND: não disponível;

Tabela 14 (Continuação). Dados demográficos e clínicos dos indivíduos em estado de tolerância operacional.

Pacientes	Grupo Clínico	Tempo de Isquemia	Função Retardada do Enxerto	Terapia de Indução	Rejeição Aguda	Rejeição Crônica	Terapia IS Inicial	Terapia IS Atual	Comorbidades	Creatinina Sérica
LTx03	TO	ND	NC	NC	Não	Não	ND	Sem IS desde 2002	Hipertensão arterial; Obesidade	1,15 (04/11/09)
LTx08	TO	16:00	Sim	Basilixmab	Sim	Não	Pred, Tacro, MMF	Sem IS desde 07/2006	HBV e HCV	1,62 (16/04/08)
LTx10	TO	1:00	Não	Não	Não	Não	Cya, Aza, Pred	Sem IS desde 05/2003	Múltiplos abscessos perianal; jan/2004 - Infarto agudo miocárdio com angioplastia; 10/03/08 - Abscesso de mama; 10/08/08 - Infarto agudo miocárdio	0.89
LTx16	TO	NC	Não	Não	Não	Não	Pred, Aza	Sem IS desde 03/2000	HCV	0.74
LTx62	TO	1:00	Não	Não	Não	Não	Cya, Aza, Pred	Sem IS desde 2005	Recidiva de GESF no rim Tx	1.71

Tx, Transplante; TO: Tolerância operacional; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; MMF: Micofenolato mofetil; MPS Micofenolato sódico; Rapa: Rapamicina; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona. HBV: Hepatite B; HCV: Hepatite C; GESF: Gloméruloesclerose segmentar e focal. NA: não se aplica; ND: não disponível; IS: Imunossupressão. Basiliximab: Anticorpo monoclonal quimérico anti-CD25. Daclizumab: Anticorpo monoclonal humanizado anti-CD25.

Tabela 15. Dados demográficos e clínicos dos indivíduos em estado de Rejeição Crônica.

Pacientes	Grupo Clínico	Sexo	Idade	Doença de Base	Nº de Gestações	Tempo de Hemodiálise(meses)	Nº de Transfusões	Nº de Transplantes	Tempo de Transplante (anos)	Tipo de Doador	Disparidades HLA
LTX01	RC	F	45	Glomerulonefrite crônica	3	ND	ND	1	11	Vivo	ND
LTX02	RC	M	48	Glomerulonefrite crônica	NA	ND	0	1	12	Falecido	ND
LTX04	RC	M	46	Glomerulonefrite crônica	NA	ND	8	1	6	Falecido	6
LTX05	RC	M	35	Glomerulonefrite crônica	NA	60	0	1	9	Falecido	6
LTX06	RC	M	64	Insuficiência renal sem causa definida	NA	ND	20	1	11	Vivo aparentado	3
LTX07	RC	M	58	Insuficiência renal sem causa definida	0	52	ND	1	9	Falecido	6
LTX13	RC	F	28	Glomerulonefrite crônica	0	12	1	1	12	Vivo aparentado	2
LTX24	RC	M	20	Insuficiência renal sem causa definida	NA	10	2	1	8	Falecido	5
LTX25	RC	M	51	Glomerulonefrite crônica	NA	55	2	1	15	Falecido	6
LTX26	RC	M	55	Nefroesclerose hipertensiva	NA	46	0	1	6	Vivo não aparentado	5
LTX32	RC	M	28	Nefropatia de refluxo	NA	48	ND	1	13	Falecido	4
LTX67	RC	F	41	Glomerulonefrite crônica	0	25	ND	1	13	Vivo aparentado	1
LTX72	RC	M	53	Glomerulonefrite crônica	NA	48	3	1	5	Vivo não aparentado	5

Tx: Transplante; RC: Rejeição Crônica; M: Masculino; F: Feminino; NA: não se aplica; ND: não disponível;

Tabela 15 (Continuação). Dados demográficos e clínicos dos indivíduos em estado de Rejeição Crônica.

Pacientes	Grupo Clínico	Função Retardada do Enxerto	Terapia de Indução	Rejeição Aguda	Rejeição Crônica	Última Biópsia (anos)	Histologia	Terapia IS Inicial	Terapia IS Atual	(C0) do inibidor de calcineurina	Comorbidades	Creatinina Sérica
LTX01	RC	ND	ND	Não	Sim	ND	ND	ND	Cya, Aza, Pred	ND	Anemia; Hipertensão arterial; Cisto no ovário; Mioma; HPV	5.2
LTX02	RC	ND	ND	Sim	Sim	ND	ND	Cya, Aza, Pred	Pred, Rapa	ND	Hipertensão arterial; Hérnia indisional	2
LTX04	RC	Sim	ND	Sim	Sim	19-12-05	NCE Banff II, fibrose focal	ND	Pred; MMF; Tacro	5,2 ng/ml	ND	1.21
LTX05	RC	Sim	ATG	Não	Sim	26-09-04	NCE, grau I de Banff, arteriolesclerose hialia, C4D+	Cya, MMF, Pred	Pred; Cya; MPS	ND	HCV, Herpes simples; 12/01 - Candidíase genital; Amidalite	1.41
LTX06	RC	Não	ND	Sim	Sim	22-05-06	NCE Banff I, Fibrose focal	ND	Pred; Cya; MMF	ND	ND	1.34
LTX07	RC	Sim	Basiliximab	Sim	Sim	24-04-06	Biopsia marginal pela classificação de Banff, Rejeição crônica vascular	Cya, Aza, Pred	Pred; MPS; Tacro	4,6 ng/ml	05 e 06/05 - Pneumonia; 01/06 - ITU	1.95
LTX13	RC	Sim	Não	Sim	Sim	09-11-06	NCE com glomerulopatia do transplante, C4d positivo	Cya, Aza, Pred	Pred; MMF; Tacro	7,7 ng/ml	2008 - CMV; 1999 - Condiloma acuminado; 2005 - Pneumonia ; 2008 - Herpes simples	1.64

Tx: Transplante; RC: Rejeição Crônica; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; MMF: Micofenolato mofetil; MPS Micofenolato sódico; Rapa: Rapamicina; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona; HCV: Hepatite C; CMV: citomegalovírus; ITU: Infecção do trato urinário; NA: não se aplica; ND: não disponível; IS: Imunossupressão. Basiliximab: Anticorpo monoclonal quimérico anti-CD25. Daclizumab: Anticorpo monoclonal humanizado anti-CD25. ATG: Timoglobulina Anti-timocitária. NCE: Nefropatia crônica do enxerto.

Tabela 15 (Continuação). Dados demográficos e clínicos dos indivíduos em estado de Rejeição Crônica.

Pacientes	Grupo Clínico	Função Retardada do Enxerto	Terapia de Indução	Rejeição Aguda	Rejeição Crônica	Última Biópsia (anos)	Histologia	Terapia IS Inicial	Terapia IS Atual	(C0) do inibidor de calcineurina	Comorbidades	Creatinina Sérica
LTX24	RC	Não	Daclizumab	Sim	Sim	06-03-06	NCE Banff I, fibrose focal, atrofia tubular	Pred, Tacro, MMF	Pred; MPS; Tacro	8 ng/ml	Amidalite;CMV	1.81
LTX25	RC	Sim	Não	Sim	Sim	05-03-07	arteriolaesclerose hialina extensa, atrofia e fibrose focais	Cya, Aza, Pred	Pred; MMF; Rapa	ND	30/01/96 e 29/07/97 - Pneumonia lobar ; 17/06/03 - Herpes Zoster	2.26
LTX26	RC	Não	Daclizumab	Não	Sim	05-07-06	NCE com C4d positivo, atrofia e fibrose focais com capilarite de cáilares peritubulares	Cya, Pred e MMF	Pred; Cya; MMF	68 ng/ml	30/09/07 - Apendicite com choque septico; 27/02/08 - Herpes Zoster cutâneo	1.61
LTX32	RC	Sim	Não	Sim	Sim	19-09-02	NCE, banff 2A + nefrotoxicidade por ciclosporina	Cya, Aza, Pred	Pred; MPS, Tacro	4,7 ng/ml	Septicemia (ITU- 1997); HCV; 17/01/2007 - Tuberculose	1.34
LTX67	RC	Não	Não	Não	Sim	13-01-05	NCE Banf II	Cya, Aza, Pred	Pred; Cya; MPS	128ng/ml	2005- ITU; 1999 - Cisto ovariano esquerdo + Salpingectomia esquerda; Endometriose; Hipertensão arterial; Dislipidemia; 2004; 2006 - Gota; 2007 - Herpes Zoster cutaneo	2.06
LTX72	RC	não	basiliximab	Não	Sim	18-02-05	Biopsia renal sem intercorrências/arterioesclerose renal	Pred;MMF;Tacro	MPS;Tacro; Pred	ND	Hipertensão Arterial Sistêmica;Esquitossomose;alcoolismo;hipotireoidismo	2.33

Tx: Transplante; RC: Rejeição Crônica; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; MMF: Micofenolato mofetil; MPS Micofenolato sódico; Rapa: Rapamicina; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona; HCV: Hepatite C; CMV: citomegalovírus; ITU: Infecção do trato urinário; NA: não se aplica; ND: não disponível; IS: Imunossupressão. Basiliximab: Anticorpo monoclonal quimérico anti-CD25. Daclizumab: Anticorpo monoclonal humanizado anti-CD25. ATG: Timoglobulina Anti-timocitária. NCE: Nefropatia crônica do enxerto.

Tabela 16. Dados demográficos e clínicos dos indivíduos com função estável do enxerto tomando doses habituais de imunossupressores.

Pacientes	Grupo Clínico	Sexo	Idade	Doença de Base	Nº de Gestações	Tempo de Hemodiálise(meses)	Nº de Transfusões	Nº de Transplantes	Tempo de Transplante (anos)	Tipo de Doador	Disparidades HLA
LTx09	EST	M	47	Insuficiência renal sem causa definida	NA	18	ND	1	6	Vivo	3
LTx11	EST	M	54	Nefrosclerose hipertensiva	NA	18	ND	1	6	Falecido	6
LTx12	EST	M	55	Nefrosclerose hipertensiva	NA	18	0	1	5	Falecido	6
LTx14	EST	F	45	Nefropatia diabética	2	24	0	1	4	Falecido	3
LTx17	EST	F	52	Glomerulonefrite crônica	ND	107	ND	1	7	Vivo aparentado	3
LTx19	EST	F	30	Nefrite lupica	0	14	4	1	5	Falecido	3
LTx20	EST	M	58	Nefrosclerose hipertensiva	NA	28	0	1	4	Vivo aparentado	5
LTx21	EST	M	61	Pielonefrite	NA	ND	ND	1	22	Falecido	3
LTx22	EST	F	33	Glomerulonefrite crônica	2	16	4	1	4	Falecido	3
LTx23	EST	F	34	Glomerulonefrite crônica	0	96	15	2	5	Vivo não aparentado	3

Tx: Transplante; Est: indivíduos com função estável do enxerto tomando doses habituais de imunossupressores; M: Masculino; F: Feminino; NA: não se aplica; ND: não disponível;

Tabela 16 (Continuação). Dados demográficos e clínicos dos indivíduos com função estável do enxerto tomando doses habituais de imunossupressores.

Pacientes	Grupo Clínico	Sexo	Idade	Doença de Base	Nº de Gestações	Tempo de Hemodiálise(meses)	Nº de Transfusões	Nº de Transplantes	Tempo de Transplante (anos)	Tipo de Doador	Disparidades HLA
LTx27	EST	F	47	Glomerulonefrite crônica	ND	60	>5	1	24	Vivo	3
LTx28	EST	M	56	Glomerulonefrite crônica	NA	2	ND	1	36	Falecido	3
LTx29	EST	M	78	Nefropatia isquêmica	NA	6	1	1	3	Falecido	4
LTx30	EST	F	55	InsuficiêNDia renal a esclarecer	3	64	10	1	13	Falecido	5
LTx31	EST	M	56	Insuficiência renal a esclarecer	NA	26	2	1	7	Vivo aparentado	3
LTx33	EST	F	40	Esclerose tuberosa (angiomiolipoma+doença cística adquirida)	1	58	3	1	5	Falecido	5
LTx34	EST	F	64	Glomerulonefrite	3	11	2	1	24	Vivo aparentado	ND
Ltx70	EST	M	62	Pielonefrite	na	24	1	1	7	Falecido	6
Ltx71	EST	F	25	Glomerulonefrite Crônica	0	9	2	1	2	Falecido	2

Tx: Transplante; Est: indivíduos com função estável do enxerto tomando doses habituais de imunossupressores; M: Masculino; F: Feminino; NA: não se aplica; ND: não disponível;

Tabela 16 (Continuação). Dados demográficos e clínicos dos indivíduos com função estável do enxerto tomando doses habituais de imunossupressores.

Pacientes	Grupo Clínico	Função Retardada do Enxerto	Terapia de Indução	Rejeição Aguda	Rejeição Crônica	Terapia IS Inicial	Terapia IS Atual	(C0) do inibidor de calcineurina	Comorbidades	Creatinina Sérica
LTx09	EST	ND	Basilixmab	Não	Não	Pred,Tacro, MMF	Pred; MMF; Tacro	4,4 ng/ml	Blastocitose	0,89
LTx11	EST	Sim	Daclizumab	Sim	Não	Pred,Tacro, MMF	Pred; MPS; Tacro	3,7 ng/ml	ITU, Micose superficial	1,51
LTx12	EST	Não	Daclizumab	Não	Não	Pred, Tacro, MPS	Pred; MPS; Tacro	4,3 ng/ml	14/07/06- Candidíase esofágica ; 04/07/08 - Infecções vias aéreas superior; CMV	1,15
LTx14	EST	Não	Basilixmab	Não	Não	Pred, Tacro, MMF	Pred; MMF; Tacro	4,3 ng/ml	ND	0,88
LTx17	EST	Sim	Basilixmab	Não	Não	Pred, Tacro, MMF	Pred; MMF; Tacro	6,7 ng/ml	CMV; 27/02/04 - Infecção de vias aéreas; 05, 07, 08/04 e 09/08 - Herpes ; 05/05 - Herpes Zoster; 04 e 12/06, 01/08 - ITU	0,99
LTx19	EST	Não	Daclizumab	Sim	Não	Pred, Tacro, MPS	Pred; MMF; Tacro	7,1 ng/ml	Herpes; Traqueibronquite; Sinusite; ITU; CMV	0,8
LTx20	EST	Não	Basilixmab	Não	Não	Pred,Tacro, MMF	Pred; MMF; Tacro	5,2 ng/ml	ND	1,21
LTx21	EST	Não	ND	Não	Não	ND	Pred; Aza	NA	Carcinoma basocelular; Prostatite crônica; 17/09/07 - ITU de repetição; Carcinoma espino celular	1,68
LTx22	EST	Não	Basilixmab	Não	Não	Pred, Tacro, MMF	Pred; MPS; Tacro	8,7 ng/ml	ND	1,04
LTx23	EST	Não	ATG e IVIG	Sim	Não	Pred, Tacro, MPS	Pred; Aza; Tacro	3,2 ng/ml	ND	0,69

Tx: Transplante; Est: Indivíduos com função estável do enxerto tomando doses habituais de imunossupressores; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; MMF: Micofenolato mofetil; MPS Micofenolato sódico; Rapa: Rapamicina; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona; CMV: citomegalovírus; ITU: Infecção do trato urinário NA: não se aplica; ND: não disponível; IS: Imunossupressão. Basiliximab: Anticorpo monoclonal quimérico anti-CD25. Daclizumab: Anticorpo monoclonal humanizado anti-CD25; ATG: Timoglobulina Anti-timocitária. IVIG: Imunoglobulina intra-venosa.

Tabela 16 (Continuação). Dados demográficos e clínicos dos indivíduos com função estável do enxerto tomando doses habituais de imunossupressores.

Pacientes	Grupo Clínico	Função Retardada do Enxerto	Terapia de Indução	Rejeição Aguda	Rejeição Crônica	Terapia IS Inicial	Terapia IS Atual	(C0) do inibidor de calcineurina	Comorbidades	Creatinina Sérica
LTx27	EST	NC	Não	Sim	Não	Pred, Aza	Pred; Aza	NA	ND	0,86
LTx28	EST	NC	Não	Não	Não	Pred, Aza	Pred; Aza	NA	22/02/04 - Celulite	1,23
LTx29	EST	Não	Basilixmab	Não	NC	Pred, Tacro, MPS	Pred; Tacro	6,3 ng/ml	Tumor renal (no momento do tx foi retirado os 2 rins que possuíam tumor); Carcinoma de células claras; Insuficiência coronariana (pré tx); Herpes zoster	1,27
LTx30	EST	Não	Não	Sim	ND	Cya, Aza, Pred	Pred; Cya	78ng/ml	HBV e HCV pós tx; Uveíte por toxoplasmose	0,79
LTx31	EST	Não	Daclizumab	Sim	Não	Pred, Tacro, MMF	Pred; MPS; Tacro	ND	Candidíase , 30/04/08 - Adenocarcinoma de próstata	1,28
LTx33	EST	Não	Daclizumab	Não	Não	Pred, Tacro, MPS	Pred; MMF; Tacro	6 ng/ml	Não	0,85
LTx34	EST	ND	ND	ND	ND	ND	MMF; Pred	NA	ND	1,7
Ltx70	EST	Não	Daclizumab/Basiliximab	Não	Não	CYA,PRED,M MF	Pred;Cya;MPS	66 ng/ml	30/11/2006- Biopsia de prostata - Hiperplasia benigna/26/07/2009- Pielonefrite aguda / Tremores nas extremidades.	1,09
Ltx71	EST	Não	Basiliximab/Daclizumab	Não	Não	Pred;tacro,MP S	MPS;Tacro; Pred	7,2 ng/ml	02/04/2007 -Hipertensão arteria sistêmica	0,79

Tx: Transplante; Est: Indivíduos com função estável do enxerto tomando doses habituais de imunossupressores; Aza: Azatioprina; Cya: Ciclosporina A; MMF: Micofenolato mofetil; MPS Micofenolato sódico; Rapa: Rapamicina; Tacro: Tacrolimus; Pred: Prednisolona; HBV: Hepatite B; HCV: Hepatite C; CMV: citomegalovírus; ITU: Infecção do trato urinário; NA: não se aplica; ND:não disponível; IS: Imunossupressão. Basiliximab: Anticorpo monoclonal quimérico anti-CD25. Daclizumab: Anticorpo monoclonal humanizado anti-CD25.

ANEXO C

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

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

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

1. NOME DO PACIENTE :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐

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

ENDEREÇO Nº..... APTO:

BAIRRO: CIDADE CEP:.....

TELEFONE: DDD (.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

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

.....

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

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE: CEP: TELEFONE:

DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

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

PESQUISADOR: Verônica Coelho (coordenadora e gerente do projeto)

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

Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 45907

.....

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO **RISCO MÍNIMO X** RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

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

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos

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

1. justificativa e os objetivos da pesquisa ;

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

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

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

poderemos utilizar um fragmento do material retirado do enxerto para fazer a pesquisa. Mas, a biópsia não será realizada por causa da pesquisa. Caso aceite participar deste estudo, você deverá assinar este documento concordando que seja colhido o seu sangue para este propósito, de acordo com o seguinte roteiro:

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

3. desconfortos e riscos esperados;

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

4. benefícios que poderão ser obtidos;

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

5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Não se aplica.

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

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

2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. O sujeito de pesquisa está livre para retirar o seu consentimento a qualquer momento e desistir de participar desta pesquisa. O fato de não querer participar desta pesquisa não vai trazer nenhum prejuízo para o seu tratamento. O paciente vai receber todos os tratamentos disponíveis e necessários para o seu caso.

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

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

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

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

1. Coordenação do projeto

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

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, _____ de _____ de 20____.

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador coordenador
(carimbo ou nome Legível)

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 06/08/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0476/08**, intitulado: **"TOLERÂNCIA OPERACIONAL NO TRANSPLANTE RENAL HUMANO: REPERTÓRIO DE LINFÓCITOS B E DE ALO E AUTO-ANTICORPOS."** apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

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

Pesquisador (a) Executante: **Hernandez Moura Silva**

CAPPesq, 07 de Agosto de 2008

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

COMISSÃO CIENTÍFICA
 RECEBIDO

08 / 08 / 08
Rebora

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

7 .Referências Bibliográficas.

- ABTO. Transplantes Realizados no Brasil. Registro Brasileiro de Transplantes. 2009;5.
- Abulafia-Lapid, R., Elias, D., Raz, I., Keren-Zur, Y., Atlan, H. e Cohen, I. R. T cell proliferative responses of type 1 diabetes patients and healthy individuals to human hsp60 and its peptides. *J Autoimmun.* 1999;12(2):121-9.
- Alterman, L. A., Crispe, I. N. e Kinnon, C. Characterization of the murine heat-stable antigen: an hematolymphoid differentiation antigen defined by the J11d, M1/69 and B2A2 antibodies. *Eur J Immunol.* 1990;20(7):1597-602.
- Ansari, M. J., Tinckam, K. e Chandraker, A. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med.* 2005;352(19):2027-8; author reply 2027-8.
- Ashton-Chess, J., Brouard, S. e Souillou, J. P. Is clinical tolerance realistic in the next decade? *Transpl Int.* 2006;19(7):539-48.
- Ashton-Chess, J., Giral, M., Souillou, J. P. e Brouard, S. Using biomarkers of tolerance and rejection to identify high- and low-risk patients following kidney transplantation. *Transplantation.* 2009;87(9 Suppl):S95-9.
- Axelrod, D. A., Mccullough, K. P., Brewer, E. D., Becker, B. N., Segev, D. L. e Rao, P. S. Kidney and pancreas transplantation in the United States, 1999-2008: the changing face of living donation. *Am J Transplant.* 2010;10(4 Pt 2):987-1002.
- Bedford, P., Garner, K. e Knight, S. C. MHC class II molecules transferred between allogeneic dendritic cells stimulate primary mixed leukocyte reactions. *Int Immunol.* 1999;11(11):1739-44.
- Beima, K. M., Miazgowicz, M. M., Lewis, M. D., Yan, P. S., Huang, T. H. e Weinmann, A. S. T-bet binding to newly identified target gene promoters is cell type-independent but results in variable context-dependent functional effects. *J Biol Chem.* 2006;281(17):11992-2000.
- Bennett, B. L., Cruz, R., Lacson, R. G. e Manning, A. M. Interleukin-4 suppression of tumor necrosis factor alpha-stimulated E-selectin gene transcription is mediated by STAT6 antagonism of NF-kappaB. *J Biol Chem.* 1997;272(15):10212-9.
- Berman, J. E., Nickerson, K. G., Pollock, R. R., Barth, J. E., Schuurman, R. K., Knowles, D. M., *et al.* VH gene usage in humans: biased usage of the VH6 gene in immature B lymphoid cells. *Eur J Immunol.* 1991;21(5):1311-4.
- Bian, H., Reidhaar-Olson, J. F. e Hammer, J. The use of bioinformatics for identifying class II-restricted T-cell epitopes. *Methods.* 2003;29(3):299-309.
- Blair, P. A., Norena, L. Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D. J., Isenberg, D. A., Ehrenstein, M. R., *et al.* CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity.* 2010;32:129-140.
- Bolland, S. An innate path to human B cell tolerance. *Immunity.* 2008;29(5):667-9.
- Bonsib, S. M., Abul-Ezz, S. R., Ahmad, I., Young, S. M., Ellis, E. N., Schneider, D. L., *et al.* Acute rejection-associated tubular basement membrane defects and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int.* 2000;58(5):2206-14.
- Boothby, M., Gravallese, E., Liou, H. C. e Glimcher, L. H. A DNA binding protein regulated by IL-4 and by differentiation in B cells. *Science.* 1988;242(4885):1559-62.

- Bouaziz, J. D., Yanaba, K. e Tedder, T. F. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol Rev.* 2008;224:201-14.
- Braudeau, C., Ashton-Chess, J., Giral, M., Dugast, E., Louis, S., Pallier, A., *et al.* Contrasted blood and intragraft toll-like receptor 4 mRNA profiles in operational tolerance versus chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation.* 2008;86(1):130-6.
- Braudeau, C., Racape, M., Giral, M., Louis, S., Moreau, A., Berthelot, L., *et al.* Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. *Transpl Int.* 2007;20(10):845-55.
- Breloer, M., Dorner, B., More, S. H., Roderian, T., Fleischer, B. e Von Bonin, A. Heat shock proteins as "danger signals": eukaryotic Hsp60 enhances and accelerates antigen-specific IFN-gamma production in T cells. *Eur J Immunol.* 2001;31(7):2051-9.
- Brezinschek, H. P., Foster, S. J., Brezinschek, R. I., Dorner, T., Domiati-Saad, R. e Lipsky, P. E. Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *J Clin Invest.* 1997;99(10):2488-501.
- Brouard, S., Dupont, A., Giral, M., Louis, S., Lair, D., Braudeau, C., *et al.* Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am J Transplant.* 2005;5(2):330-40.
- Brouard, S., Mansfield, E., Braud, C., Li, L., Giral, M., Hsieh, S. C., *et al.* Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(39):15448-53.
- Brownlie, R. J., Lawlor, K. E., Niederer, H. A., Cutler, A. J., Xiang, Z., Clatworthy, M. R., *et al.* Distinct cell-specific control of autoimmunity and infection by FcgammaRIIb. *J Exp Med.* 2008;205(4):883-95.
- Buttner, C., Skupin, A. e Rieber, E. P. Transcriptional activation of the type I collagen genes COL1A1 and COL1A2 in fibroblasts by interleukin-4: analysis of the functional collagen promoter sequences. *J Cell Physiol.* 2004;198(2):248-58.
- Cai, J. e Terasaki, P. I. Humoral theory of transplantation: mechanism, prevention, and treatment. *Hum Immunol.* 2005;66(4):334-42.
- Caldas, C., Luna, E., Spadafora-Ferreira, M., Porto, G., Iwai, L. K., Oshiro, S. E., *et al.* Cellular autoreactivity against heat shock protein 60 in renal transplant patients: peripheral and graft-infiltrating responses. *Clin Exp Immunol.* 2006;146(1):66-75.
- Caldas, C., Spadafora-Ferreira, M., Fonseca, J. A., Luna, E., Iwai, L. K., Kalil, J., *et al.* T-cell response to self HSP60 peptides in renal transplant recipients: a regulatory role? *Transplant Proc.* 2004;36(4):833-5.
- Campos, E. F., Tedesco-Silva, H., Machado, P. G., Franco, M., Medina-Pestana, J. O. e Gerbase-Delima, M. Post-transplant anti-HLA class II antibodies as risk factor for late kidney allograft failure. *Am J Transplant.* 2006;6(10):2316-20.
- Cancro, M. P. e Kearney, J. F. B cell positive selection: road map to the primary repertoire? *J Immunol.* 2004;173(1):15-9.

- Cappione, A. J., Pugh-Bernard, A. E., Anolik, J. H. e Sanz, I. Lupus IgG VH4.34 antibodies bind to a 220-kDa glycoform of CD45/B220 on the surface of human B lymphocytes. *J Immunol.* 2004;172(7):4298-307.
- Carsetti, R., Rosado, M. M. e Wardmann, H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev.* 2004;197:179-91.
- Castellaneta, A., Thomson, A. W., Nayyar, N., De Vera, M. e Mazariegos, G. V. Monitoring the operationally tolerant liver allograft recipient. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15(1):28-34.
- Chen, W., Syldath, U., Bellmann, K., Burkart, V. e Kolb, H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol.* 1999;162(6):3212-9.
- Chomczynski, P. e Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
- Cohen, I. R. The cognitive paradigm and the immunological homunculus. *Immunol Today.* 1992;13(12):490-4.
- Cohen, I. R. Biomarkers, self-antigens and the immunological homunculus. *J Autoimmun.* 2007a.
- Cohen, I. R. Real and artificial immune systems: computing the state of the body. *Nat Rev Immunol.* 2007b;7(7):569-74.
- Colgan, S. P., Hershberg, R. M., Furuta, G. T. e Blumberg, R. S. Ligation of intestinal epithelial CD1d induces bioactive IL-10: critical role of the cytoplasmic tail in autocrine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(24):13938-43.
- Collette, A. e Six, A. ISEApeaks: an Excel platform for GeneScan and Immunoscope data retrieval, management and analysis. *Bioinformatics.* 2002;18(2):329-30.
- Colvin, R. B. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(4):1046-56.
- Colvin, R. B. e Nickleleit, V. Renal Transplant Pathology. In: J. Jennette, J. Olson, M. Schwartz e F. Silva, editors. *Heptinstall's Pathology of the Kidney.* Philadelphia: Lippincott-Raven; 2006. p. 1347-1490.
- Colvin, R. B. e Smith, R. N. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(10):807-17.
- Cornell, L. D., Smith, R. N. e Colvin, R. B. Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:189-220.
- Costell, M., Gustafsson, E., Aszodi, A., Morgelin, M., Bloch, W., Hunziker, E., *et al.* Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol.* 1999;147(5):1109-22.
- Dalwadi, H., Wei, B., Schrage, M., Spicher, K., Su, T. T., Birnbaumer, L., *et al.* B cell developmental requirement for the G alpha i2 gene. *J Immunol.* 2003;170(4):1707-15.
- Datta, S. R., Brunet, A. e Greenberg, M. E. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 1999;13(22):2905-27.
- De Re, V., De Vita, S., Gasparotto, D., Marzotto, A., Carbone, A., Ferraccioli, G., *et al.* Salivary gland B cell lymphoproliferative disorders in Sjogren's syndrome present a restricted use of antigen receptor gene segments similar to those used by hepatitis C virus-associated non-Hodgkins's lymphomas. *Eur J Immunol.* 2002;32(3):903-10.

- Delgado, J. F., Manito, N., Segovia, J., Almenar, L., Arizon, J. M., Camprecios, M., *et al.* The use of proliferation signal inhibitors in the prevention and treatment of allograft vasculopathy in heart transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*. 2009;23(2):69-79.
- Den Dekker, E., Grefte, S., Huijs, T., Ten Dam, G. B., Versteeg, E. M., Van Den Berk, L. C., *et al.* Monocyte cell surface glycosaminoglycans positively modulate IL-4-induced differentiation toward dendritic cells. *J Immunol*. 2008;180(6):3680-8.
- Denzer, K., Van Eijk, M., Kleijmeer, M. J., Jakobson, E., De Groot, C. e Geuze, H. J. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol*. 2000;165(3):1259-65.
- Deszo, E. L., Brake, D. K., Kelley, K. W. e Freund, G. G. IL-4-dependent CD86 expression requires JAK/STAT6 activation and is negatively regulated by PKCdelta. *Cell Signal*. 2004;16(2):271-80.
- Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T. e Schuler, G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*. 2001;193(11):1303-10.
- Dragun, D. Humoral responses directed against non-human leukocyte antigens in solid-organ transplantation. *Transplantation*. 2008;86(8):1019-25.
- Dragun, D., Muller, D. N., Brasen, J. H., 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;352(6):558-69.
- Duddy, M. E., Alter, A. e Bar-or, A. Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J Immunol*. 2004;172(6):3422-7.
- Durant, L., Watford, W. T., Ramos, H. L., Laurence, A., Vahedi, G., Wei, L., *et al.* Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity*. 2010;32(5):605-15.
- Ebert, A., Mcmanus, S., Tagoh, H., Medvedovic, J., Salvaggio, G., Novatchkova, M., *et al.* The distal v(h) gene cluster of the igh locus contains distinct regulatory elements with pax5 transcription factor-dependent activity in pro-B cells. *Immunity*. 2011;34(2):175-87.
- Eikmans, M., Sijpkens, Y. W., Baelde, H. J., De Heer, E., Paul, L. C. e Bruijn, J. A. High transforming growth factor-beta and extracellular matrix mRNA response in renal allografts during early acute rejection is associated with absence of chronic rejection. *Transplantation*. 2002;73(4):573-9.
- Elgueta, R., Benson, M. J., De Vries, V. C., Wasiuk, A., Guo, Y. e Noelle, R. J. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*. 2009;229(1):152-72.
- Elo, L. L., Jarvenpaa, H., Tuomela, S., Raghav, S., Ahlfors, H., Laurila, K., *et al.* Genome-wide profiling of interleukin-4 and STAT6 transcription factor regulation of human Th2 cell programming. *Immunity*. 2010;32(6):852-62.
- Epstein, M. M., Di Rosa, F., Jankovic, D., Sher, A. e Matzinger, P. Successful T cell priming in B cell-deficient mice. *J Exp Med*. 1995;182(4):915-22.
- Erlich, H. A., Opelz, G. e Hansen, J. HLA DNA typing and transplantation. *Immunity*. 2001;14(4):347-56.
- Fae, K., Kalil, J., Toubert, A. e Guilherme, L. Heart infiltrating T cell clones from a rheumatic heart disease patient display a common TCR usage and a degenerate antigen recognition pattern. *Mol Immunol*. 2004;40(14-15):1129-35.

- Fahim, T., Bohmig, G. A., Exner, M., Huttary, N., Kerschner, H., Kandutsch, S., *et al.* The cellular lesion of humoral rejection: predominant recruitment of monocytes to peritubular and glomerular capillaries. *Am J Transplant.* 2007;7(2):385-93.
- Fang, X., Zheng, P., Tang, J. e Liu, Y. CD24: from A to Z. *Cell Mol Immunol.* 2010;7(2):100-3.
- Ferry, H., Leung, J. C., Lewis, G., Nijnik, A., Silver, K., Lambe, T., *et al.* B-cell tolerance. *Transplantation.* 2006;81(3):308-15.
- Feucht, H. E., Schneeberger, H., Hillebrand, G., Burkhardt, K., Weiss, M., Riethmuller, G., *et al.* Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int.* 1993;43(6):1333-8.
- Fillatreau, S., Sweeney, C. H., Mcgeachy, M. J., Gray, D. e Anderton, S. M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol.* 2002;3(10):944-50.
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000;192(7):1027-34.
- Fuchs, E. J. e Matzinger, P. B cells turn off virgin but not memory T cells. *Science.* 1992;258(5085):1156-9.
- Galibert, L., Burdin, N., De Saint-Vis, B., Garrone, P., Van Kooten, C., Banchereau, J., *et al.* CD40 and B cell antigen receptor dual triggering of resting B lymphocytes turns on a partial germinal center phenotype. *J Exp Med.* 1996;183(1):77-85.
- Game, D. S., Rogers, N. J. e Lechler, R. I. Acquisition of HLA-DR and costimulatory molecules by T cells from allogeneic antigen presenting cells. *Am J Transplant.* 2005;5(7):1614-25.
- Gerbase-Delima, M., Campos, E. F., Tedesco-Silva, H., Machado, P. G., Franco, M. e Medina-Pestana, J. O. Anti-HLA class II antibodies and chronic allograft nephropathy. *Clin Transpl.* 2006:201-5.
- Gershon, R. K. e Kondo, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology.* 1970;18(5):723-37.
- Gilliet, M. e Liu, Y. J. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med.* 2002;195(6):695-704.
- Gorny, M. K., Wang, X. H., Williams, C., Volsky, B., Revesz, K., Witover, B., *et al.* Preferential use of the VH5-51 gene segment by the human immune response to code for antibodies against the V3 domain of HIV-1. *Mol Immunol.* 2009;46(5):917-26.
- Guiducci, C., Valzasina, B., Dislich, H. e Colombo, M. P. CD40/CD40L interaction regulates CD4+CD25+ T reg homeostasis through dendritic cell-produced IL-2. *Eur J Immunol.* 2005;35(2):557-67.
- Guilliano, M. J., Foxx-Orenstein, A. E. e Lebman, D. A. The microenvironment of human Peyer's patches inhibits the increase in CD38 expression associated with the germinal center reaction. *J Immunol.* 2001;166(4):2179-85.
- Guleria, I., Khosroshahi, A., Ansari, M. J., Habicht, A., Azuma, M., Yagita, H., *et al.* A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *J Exp Med.* 2005;202(2):231-7.

- Hall, T. BioEdti: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis programa for Windows 95/98/NT. Carlsbad: Ibis Biosciences 2007.
- Halloran, P. F. e Hunsicker, L. G. Delayed graft function: state of the art, November 10-11, 2000. Summit meeting, Scottsdale, Arizona, USA. *Am J Transplant.* 2001;1(2):115-20.
- Hammer, J., Sturniolo, T. e Sinigaglia, F. HLA class II peptide binding specificity and autoimmunity. *Adv Immunol.* 1997;66:67-100.
- Hanissian, S. H. e Geha, R. S. Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells. *Immunity.* 1997;6(4):379-87.
- Harada, N., Santos-Argumedo, L., Chang, R., Grimaldi, J. C., Lund, F. E., Brannan, C. I., *et al.* Expression cloning of a cDNA encoding a novel murine B cell activation marker. Homology to human CD38. *J Immunol.* 1993;151(6):3111-8.
- Harshyne, L. A., Watkins, S. C., Gambotto, A. e Barratt-Boyes, S. M. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol.* 2001;166(6):3717-23.
- Hart, P. H., Bonder, C. S., Balogh, J., Dickensheets, H. L., Donnelly, R. P. e Finlay-Jones, J. J. Differential responses of human monocytes and macrophages to IL-4 and IL-13. *J Leukoc Biol.* 1999;66(4):575-8.
- Hauray, M., Sundblad, A., Grandien, A., Barreau, C., Coutinho, A. e Nobrega, A. The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact. *Eur J Immunol.* 1997;27(6):1557-63.
- Heidt, S., Roelen, D. L., Eijssink, C., Eikmans, M., Van Kooten, C., Claas, F. H., *et al.* Calcineurin inhibitors affect B cell antibody responses indirectly by interfering with T cell help. *Clin Exp Immunol.* 2010;159(2):199-207.
- Heidt, S., Roelen, D. L., Eijssink, C., Van Kooten, C., Claas, F. H. e Mulder, A. Effects of immunosuppressive drugs on purified human B cells: evidence supporting the use of MMF and rapamycin. *Transplantation.* 2008;86(9):1292-300.
- Herrera, O. B., Golshayan, D., Tibbott, R., Salcido Ochoa, F., James, M. J., Marelli-Berg, F. M., *et al.* A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol.* 2004;173(8):4828-37.
- Hoffmann, S. C., Hale, D. A., Kleiner, D. E., Mannon, R. B., Kampen, R. L., Jacobson, L. M., *et al.* Functionally significant renal allograft rejection is defined by transcriptional criteria. *Am J Transplant.* 2005;5(3):573-81.
- Hourmant, M., Cesbron-Gautier, A., Terasaki, P. I., Mizutani, K., Moreau, A., Meurette, A., *et al.* Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(9):2804-12.
- Huang, C., Stewart, A. K., Schwartz, R. S. e Stollar, B. D. Immunoglobulin heavy chain gene expression in peripheral blood B lymphocytes. *J Clin Invest.* 1992;89(4):1331-43.
- Hunt, J. S., Petroff, M. G., McIntire, R. H. e Ober, C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *Faseb J.* 2005;19(7):681-93.
- Issa, N., Cosio, F. G., Gloor, J. M., Sethi, S., Dean, P. G., Moore, S. B., *et al.* Transplant glomerulopathy: risk and prognosis related to anti-human leukocyte antigen class II antibody levels. *Transplantation.* 2008;86(5):681-5.

- Ito, T., Yang, M., Wang, Y. H., Lande, R., Gregorio, J., Perng, O. A., *et al.* Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med.* 2007;204(1):105-15.
- Jensen, P., Johansen, H. K., Carmi, P., Hoiby, N. e Cohen, I. R. Autoantibodies to pancreatic hsp60 precede the development of glucose intolerance in patients with cystic fibrosis. *J Autoimmun.* 2001;17(2):165-72.
- Jerne, N. K. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris).* 1974;125C(1-2):373-89.
- Jin, Y. P., Fishbein, M. C., Said, J. W., Jindra, P. T., Rajalingam, R., Rozengurt, E., *et al.* Anti-HLA class I antibody-mediated activation of the PI3K/Akt signaling pathway and induction of Bcl-2 and Bcl-xL expression in endothelial cells. *Hum Immunol.* 2004;65(4):291-302.
- Jindal, S., Dudani, A. K., Singh, B., Harley, C. B. e Gupta, R. S. Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65-kilodalton mycobacterial antigen. *Mol Cell Biol.* 1989;9(5):2279-83.
- Jindra, P. T., Jin, Y. P., Rozengurt, E. e Reed, E. F. HLA class I antibody-mediated endothelial cell proliferation via the mTOR pathway. *J Immunol.* 2008;180(4):2357-66.
- Jindra, P. T., Zhang, X., Mulder, A., Claas, F., Veale, J., Jin, Y. P., *et al.* Anti-HLA antibodies can induce endothelial cell survival or proliferation depending on their concentration. *Transplantation.* 2006;82(1 Suppl):S33-5.
- Kay, R., Rosten, P. M. e Humphries, R. K. CD24, a signal transducer modulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor. *J Immunol.* 1991;147(4):1412-6.
- Kindt, T. J., Osborne, B. A. e Goldsby, R. A. Kuby Immunology: W.H. Freeman. 2002. 574 p.
- Knoechel, B., Lohr, J., Zhu, S., Wong, L., Hu, D., Ausubel, L., *et al.* Functional and molecular comparison of anergic and regulatory T lymphocytes. *J Immunol.* 2006;176(11):6473-83.
- Kumar, V. TCR peptide-reactive T cells and peripheral tolerance to myelin basic protein. *Res Immunol.* 1998;149(9):827-34; discussion 852-4, 855-60.
- Kyewski, B. e Klein, L. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:571-606.
- Lachmann, N., Terasaki, P. I., Budde, K., Liefeldt, L., Kahl, A., Reinke, P., *et al.* Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation.* 2009;87(10):1505-13.
- Langan, L. L., Park, L. P., Hughes, T. L., Irish, A., Luxton, G., Witt, C. S., *et al.* Post-transplant HLA class II antibodies and high soluble CD30 levels are independently associated with poor kidney graft survival. *Am J Transplant.* 2007;7(4):847-56.
- Lassila, O., Vainio, O. e Matzinger, P. Can B cells turn on virgin T cells? *Nature.* 1988;334(6179):253-5.
- Lawson, C., Holder, A. L., Stanford, R. E., Smith, J. e Rose, M. L. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibodies in sera of heart transplant recipients: a role in endothelial cell activation. *Transplantation.* 2005;80(2):264-71.

- Le Rond, S., Azema, C., Krawice-Radanne, I., Durrbach, A., Guettier, C., Carosella, E. D., *et al.* Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/ regulatory T cells. *J Immunol.* 2006;176(5):3266-76.
- Le Texier, L., Thebault, P., Lavault, A., Usal, C., Merieau, E., Quillard, T., *et al.* Long-Term Allograft Tolerance Is Characterized by the Accumulation of B Cells Exhibiting an Inhibited Profile. *Am J Transplant.* 2010.
- Lechler, R. I. e Batchelor, J. R. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med.* 1982;155(1):31-41.
- Lee, P. C., Zhu, L., Terasaki, P. I. e Everly, M. J. HLA-specific antibodies developed in the first year posttransplant are predictive of chronic rejection and renal graft loss. *Transplantation.* 2009;88(4):568-74.
- Lemaoult, J., Caumartin, J., Daouya, M., Favier, B., Le Rond, S., Gonzalez, A., *et al.* Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. *Blood.* 2007;109(5):2040-8.
- Lerut, E., Naesens, M., Kuypers, D. R., Vanrenterghem, Y. e Van Damme, B. Subclinical peritubular capillaritis at 3 months is associated with chronic rejection at 1 year. *Transplantation.* 2007;83(11):1416-22.
- Lewis, M. D., Miller, S. A., Miazgowicz, M. M., Beima, K. M. e Weinmann, A. S. T-bet's ability to regulate individual target genes requires the conserved T-box domain to recruit histone methyltransferase activity and a separate family member-specific transactivation domain. *Mol Cell Biol.* 2007;27(24):8510-21.
- Lim, A., Lemercier, B., Wertz, X., Pottier, S. L., Huetz, F. e Kourilsky, P. Many human peripheral VH5-expressing IgM+ B cells display a unique heavy-chain rearrangement. *Int Immunol.* 2008;20(1):105-16.
- Lin-Wang, H. T. Auto-reatividade humoral ao peptídeos da miosina cardíaca e proteína de choque térmico 60 : Estudo seqüencial em pacientes transplantados cardíacos e indivíduos sadios. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Medicina da USP, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- Liu, Y. J. A unified theory of central tolerance in the thymus. *Trends Immunol.* 2006;27(5):215-21.
- Logtenberg, T., Young, F. M., Van Es, J. H., Gmelig-Meyling, F. H. e Alt, F. W. Autoantibodies encoded by the most Jh-proximal human immunoglobulin heavy chain variable region gene. *J Exp Med.* 1989;170(4):1347-55.
- Louis, S., Braudeau, C., Giral, M., Dupont, A., Moizant, F., Robillard, N., *et al.* Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation.* 2006;81(3):398-407.
- Luna, E., Postol, E., Caldas, C., Benvenuti, L. A., Rodrigues, J. M., Jr., Lima, K., *et al.* Treatment with encapsulated Hsp60 peptide (p277) prolongs skin graft survival in a murine model of minor antigen disparity. *Scand J Immunol.* 2007;66(1):62-70.
- Luna, E., Postol, E., Caldas, C., Mundel, L. R., Porto, G., Iwai, L. K., *et al.* Diversity of physiological cell reactivity to heat shock protein 60 in different mouse strains. *Cell Stress Chaperones.* 2007;12(2):112-22.
- Lund, F. E. Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(3):332-8.

- Lund, F. E., Cockayne, D. A., Randall, T. D., Solvason, N., Schuber, F. e Howard, M. C. CD38: a new paradigm in lymphocyte activation and signal transduction. *Immunol Rev.* 1998;161:79-93.
- Maron, R., Sukhova, G., Faria, A. M., Hoffmann, E., Mach, F., Libby, P., *et al.* Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation.* 2002;106(13):1708-15.
- Martello, F. G. Hsp60 e imunorregulação: estratégias para identificação de peptídeos imunorreguladores. (Dissertação de Mestrado). Alergia e Imunopatologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. 167 p.
- Martinez-Llordella, M., Lozano, J. J., Puig-Pey, I., Orlando, G., Tisone, G., Lerut, J., *et al.* Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest.* 2008;118(8):2845-57.
- Martins, H. L., Silva, C., Martini, D. e Noronha, I. L. Detection of B lymphocytes (CD20+) in renal allograft biopsy specimens. *Transplant Proc.* 2007;39(2):432-4.
- Mauri, C. e Ehrenstein, M. R. The 'short' history of regulatory B cells. *Trends Immunol.* 2008;29(1):34-40.
- Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N. e Londei, M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med.* 2003;197(4):489-501.
- Mazariegos, G. V., Zahorchak, A. F., Reyes, J., Chapman, H., Zeevi, A. e Thomson, A. W. Dendritic cell subset ratio in tolerant, weaning and non-tolerant liver recipients is not affected by extent of immunosuppression. *Am J Transplant.* 2005;5(2):314-22.
- Mcgaha, T. L., Sorrentino, B. e Ravetch, J. V. Restoration of tolerance in lupus by targeted inhibitory receptor expression. *Science.* 2005;307(5709):590-3.
- Mchugh, K. P., Kitazawa, S., Teitelbaum, S. L. e Ross, F. P. Cloning and characterization of the murine beta(3) integrin gene promoter: identification of an interleukin-4 responsive element and regulation by STAT-6. *J Cell Biochem.* 2001;81(2):320-32.
- Mckenna, R. M., Takemoto, S. K. e Terasaki, P. I. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation.* 2000;69(3):319-26.
- Merbl, Y., Zucker-Toledano, M., Quintana, F. J. e Cohen, I. R. Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics. *J Clin Invest.* 2007;117(3):712-8.
- Miller, S. A., Mohn, S. E. e Weinmann, A. S. Jmjd3 and UTX play a demethylase-independent role in chromatin remodeling to regulate T-box family member-dependent gene expression. *Mol Cell.* 2010;40(4):594-605.
- Miqueu, P., Degauque, N., Guillet, M., Giral, M., Ruiz, C., Pallier, A., *et al.* Analysis of the peripheral T-cell repertoire in kidney transplant patients. *Eur J Immunol.* 2010.
- Miqueu, P., Guillet, M., Degauque, N., Dore, J. C., Soullillou, J. P. e Brouard, S. Statistical analysis of CDR3 length distributions for the assessment of T and B cell repertoire biases. *Mol Immunol.* 2007;44(6):1057-64.
- Mizoguchi, A. e Bhan, A. K. A case for regulatory B cells. *J Immunol.* 2006;176(2):705-10.

- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Smith, R. N., Preffer, F. I. e Bhan, A. K. Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor alpha mutant mice. *J Exp Med*. 1997;186(10):1749-56.
- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R. S. e Bhan, A. K. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity*. 2002;16(2):219-30.
- Mizutani, K., Terasaki, P., Bignon, J. D., Hourmant, M., Cesbron-Gautier, A., Shih, R. N., *et al.* Association of kidney transplant failure and antibodies against MICA. *Hum Immunol*. 2006;67(9):683-91.
- Moore, K. W., De Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. e O'garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765.
- Morales-Buenrostro, L. E., Terasaki, P. I., Marino-Vazquez, L. A., Lee, J. H., El-Awar, N. e Alberu, J. "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation*. 2008;86(8):1111-5.
- Morelli, A. E., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Sullivan, M. L., Stolz, D. B., Papworth, G. D., *et al.* Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*. 2004;104(10):3257-66.
- Morgun, A., Shulzhenko, N., Unterkircher, C. S., Pereira, A. B., Silva, M. S., Nishida, S. K., *et al.* Allo- and autoantibodies in human cardiac allograft recipients. *Transplant Proc*. 1999;31(7):2976-7.
- Moseley, P. Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology*. 2000;48(3):299-302.
- Mouthon, L., Nobrega, A., Nicolas, N., Kaveri, S. V., Barreau, C., Coutinho, A., *et al.* Invariance and restriction toward a limited set of self-antigens characterize neonatal IgM antibody repertoires and prevail in autoreactive repertoires of healthy adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(9):3839-43.
- Murai, M., Turovskaya, O., Kim, G., Madan, R., Karp, C. L., Cheroutre, H., *et al.* Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol*. 2009;10(11):1178-84.
- Naji, A., Le Rond, S., Durrbach, A., Krawice-Radanne, I., Creput, C., Daouya, M., *et al.* CD3+CD4^{low} and CD3+CD8^{low} are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance. *Blood*. 2007;110(12):3936-48.
- Newell, K. A., Asare, A., Kirk, A. D., Gisler, T. D., Bourcier, K., Suthanthiran, M., *et al.* Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. 2010;120(6):1836-47.
- Nishimura, E., Sakihama, T., Setoguchi, R., Tanaka, K. e Sakaguchi, S. Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol*. 2004;16(8):1189-201.
- Nobrega, A., Stransky, B., Nicolas, N. e Coutinho, A. Regeneration of natural antibody repertoire after massive ablation of lymphoid system: robust selection mechanisms preserve antigen binding specificities. *J Immunol*. 2002;169(6):2971-8.
- Okazaki, T. e Honjo, T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol*. 2006;27(4):195-201.

- Pacholczyk, R., Ignatowicz, H., Kraj, P. e Ignatowicz, L. Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells. *Immunity*. 2006;25(2):249-59.
- Pallier, A., Hillion, S., Danger, R., Giral, M., Racape, M., Degauque, N., *et al.* Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int.* 2010;78(5):503-13.
- Pannetier, C., Cochet, M., Darche, S., Casrouge, A., Zoller, M. e Kourilsky, P. The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(9):4319-23.
- Pannetier, C., Even, J. e Kourilsky, P. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today.* 1995;16(4):176-81.
- Piccirillo, C. A. e Shevach, E. M. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol.* 2001;167(3):1137-40.
- Pockley, A. G. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *The Lancet.* 2003;362:469-76.
- Poletaev, A. e Osipenko, L. General network of natural autoantibodies as immunological homunculus (Immunculus). *Autoimmun Rev.* 2003;2(5):264-71.
- Quintana, F. J., Carmi, P., Mor, F. e Cohen, I. R. Inhibition of adjuvant arthritis by a DNA vaccine encoding human heat shock protein 60. *J Immunol.* 2002;169(6):3422-8.
- Quintana, F. J. e Cohen, I. R. DNA vaccines coding for heat-shock proteins (HSPs): tools for the activation of HSP-specific regulatory T cells. *Expert Opin Biol Ther.* 2005a;5(4):545-54.
- Quintana, F. J. e Cohen, I. R. Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. *J Immunol.* 2005b;175(5):2777-82.
- Quintana, F. J., Farez, M. F., Viglietta, V., Iglesias, A. H., Merbl, Y., Izquierdo, G., *et al.* Antigen microarrays identify unique serum autoantibody signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(48):18889-94.
- Quintana, F. J., Getz, G., Hed, G., Domany, E. e Cohen, I. R. Cluster analysis of human autoantibody reactivities in health and in type 1 diabetes mellitus: a bio-informatic approach to immune complexity. *J Autoimmun.* 2003;21(1):65-75.
- Quintana, F. J., Hagedorn, P. H., Elizur, G., Merbl, Y., Domany, E. e Cohen, I. R. Functional immunomics: microarray analysis of IgG autoantibody repertoires predicts the future response of mice to induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101 Suppl 2:14615-21.
- Raats, C. J., Bakker, M. A., Hoch, W., Tamboer, W. P., Groffen, A. J., Van Den Heuvel, L. P., *et al.* Differential expression of agrin in renal basement membranes as revealed by domain-specific antibodies. *J Biol Chem.* 1998;273(28):17832-8.
- Racusen, L. C., Solez, K., Colvin, R. B., Bonsib, S. M., Castro, M. C., Cavallo, T., *et al.* The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int.* 1999;55(2):713-23.
- Ravetch, J. V. e Lanier, L. L. Immune inhibitory receptors. *Science.* 2000;290(5489):84-9.

- Raz, I., Avron, A., Tamir, M., Metzger, M., Symer, L., Eldor, R., *et al.* Treatment of new-onset type 1 diabetes with peptide DiaPep277 is safe and associated with preserved beta-cell function: extension of a randomized, double-blind, phase II trial. *Diabetes Metab Res Rev.* 2007;23(4):292-8.
- Raz, I., Elias, D., Avron, A., Tamir, M., Metzger, M. e Cohen, I. R. Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet.* 2001;358(9295):1749-53.
- Robertson, H., Wheeler, J., Kirby, J. A. e Morley, A. R. Renal allograft rejection--in situ demonstration of cytotoxic intratubular cells. *Transplantation.* 1996;61(10):1546-9.
- Rouas-Freiss, N., Naji, A., Durrbach, A. e Carosella, E. D. Tolerogenic functions of human leukocyte antigen G: from pregnancy to organ and cell transplantation. *Transplantation.* 2007;84(1 Suppl):S21-5.
- Rougon, G., Alterman, L. A., Dennis, K., Guo, X. J. e Kinnon, C. The murine heat-stable antigen: a differentiation antigen expressed in both the hematology and neural cell lineages. *Eur J Immunol.* 1991;21(6):1397-402.
- Roussey-Kesler, G., Giral, M., Moreau, A., Subra, J. F., Legendre, C., Noel, C., *et al.* Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2006;6(4):736-46.
- Rowe, V., Banovic, T., Macdonald, K. P., Kuns, R., Don, A. L., Morris, E. S., *et al.* Host B cells produce IL-10 following TBI and attenuate acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 2006;108(7):2485-92.
- Sagoo, P., Perucha, E., Sawitzki, B., Tomiuk, S., Stephens, D. A., Miqueu, P., *et al.* Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest.* 2010;120(6):1848-61.
- Saidman, S. Significance of anti-HLA and donor-specific antibodies in long-term renal graft survival. *Transplant Proc.* 2007;39(3):744-6.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. e Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151-64.
- Sakamoto, O., Hashiyama, M., Minty, A., Ando, M. e Suda, T. Interleukin-13 selectively suppresses the growth of human macrophage progenitors at the late stage. *Blood.* 1995;85(12):3487-93.
- Schroeder, H. W., Jr., Hillson, J. L. e Perlmutter, R. M. Early restriction of the human antibody repertoire. *Science.* 1987;238(4828):791-3.
- Schroeder, H. W., Jr. e Wang, J. Y. Preferential utilization of conserved immunoglobulin heavy chain variable gene segments during human fetal life. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(16):6146-50.
- Schwartz, R. H. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nature Immunology.* 2005;6:327.
- Sercarz, E. E. Driver clones and determinant spreading. *J Autoimmun.* 2000;14(4):275-7.
- Shoenfeld, Y. The idiotypic network in autoimmunity: antibodies that bind antibodies that bind antibodies. *Nat Med.* 2004;10(1):17-8.
- Shortman, K. e Liu, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(3):151-61.

- Shoskes, D. A. e Wood, K. J. Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol Today*. 1994;15(1):32-8.
- Shubinsky, G. e Schlesinger, M. The CD38 lymphocyte differentiation marker: new insight into its ectoenzymatic activity and its role as a signal transducer. *Immunity*. 1997;7(3):315-24.
- Sims, G. P., Ettinger, R., Shirota, Y., Yarboro, C. H., Illei, G. G. e Lipsky, P. E. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*. 2005;105(11):4390-8.
- Sis, B., Campbell, P. M., Mueller, T., Hunter, C., Cockfield, S. M., Cruz, J., *et al.* Transplant glomerulopathy, late antibody-mediated rejection and the ABCD tetrad in kidney allograft biopsies for cause. *Am J Transplant*. 2007;7(7):1743-52.
- Sis, B., Mengel, M., Haas, M., Colvin, R. B., Halloran, P. F., Racusen, L. C., *et al.* Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant*. 2010;10(3):464-71.
- Smyth, L. A., Afzali, B., Tsang, J., Lombardi, G. e Lechler, R. I. Intercellular transfer of MHC and immunological molecules: molecular mechanisms and biological significance. *Am J Transplant*. 2007;7(6):1442-9.
- Solez, K., Colvin, R. B., Racusen, L. C., Sis, B., Halloran, P. F., Birk, P. E., *et al.* Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant*. 2007;7(3):518-26.
- Steele, D. J., Laufer, T. M., Smiley, S. T., Ando, Y., Grusby, M. J., Glimcher, L. H., *et al.* Two levels of help for B cell alloantibody production. *J Exp Med*. 1996;183(2):699-703.
- Steinmetz, O. M., Panzer, U., Kneissler, U., Harendza, S., Lipp, M., Helmchen, U., *et al.* BCA-1/CXCL13 expression is associated with CXCR5-positive B-cell cluster formation in acute renal transplant rejection. *Kidney Int*. 2005;67(4):1616-21.
- Steinmetz, O. M., Stahl, R. A. e Panzer, U. Chemokines and B cells in renal inflammation and allograft rejection. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2009;1:13-22.
- Sumitran-Holgersson, S., Wilczek, H. E., Holgersson, J. e Soderstrom, K. Identification of the nonclassical HLA molecules, mica, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. *Transplantation*. 2002;74(2):268-77.
- Takeda, K., Kamanaka, M., Tanaka, T., Kishimoto, T. e Akira, S. Impaired IL-13-mediated functions of macrophages in STAT6-deficient mice. *J Immunol*. 1996;157(8):3220-2.
- Taylor, A. L., Negus, S. L., Negus, M., Bolton, E. M., Bradley, J. A. e Pettigrew, G. J. Pathways of helper CD4 T cell allorecognition in generating alloantibody and CD8 T cell alloimmunity. *Transplantation*. 2007;83(7):931-7.
- Terasaki, P. I. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant*. 2003;3(6):665-73.
- Terasaki, P. I. e Cai, J. Humoral theory of transplantation: further evidence. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(5):541-5.
- Terasaki, P. I., Cecka, J. M., Gjertson, D. W. e Takemoto, S. High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N Engl J Med*. 1995;333(6):333-6.

- Terasaki, P. I., Gjertson, D. W., Cecka, J. M. e Takemoto, S. Proposed HLA matching scheme for improved cadaveric kidney allocation. *Transplant Proc.* 1995;27(1):61-3.
- Terasaki, P. I. e Ozawa, M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant.* 2004;4(3):438-43.
- Terasaki, P. I. e Ozawa, M. Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: results of a 2-year prospective trial. *Transplantation.* 2005;80(9):1194-7.
- Terasaki, P. I., Ozawa, M. e Castro, R. Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am J Transplant.* 2007;7(2):408-15.
- Tinckam, K. J., Djurdjev, O. e Magil, A. B. Glomerular monocytes predict worse outcomes after acute renal allograft rejection independent of C4d status. *Kidney Int.* 2005;68(4):1866-74.
- Tokita, D., Mazariegos, G. V., Zahorchak, A. F., Chien, N., Abe, M., Raimondi, G., *et al.* High PD-L1/CD86 ratio on plasmacytoid dendritic cells correlates with elevated T-regulatory cells in liver transplant tolerance. *Transplantation.* 2008;85(3):369-77.
- Ulmansky, R., Cohen, C. J., Szafer, F., Moallem, E., Fridlender, Z. G., Kashi, Y., *et al.* Resistance to adjuvant arthritis is due to protective antibodies against heat shock protein surface epitopes and the induction of IL-10 secretion. *J Immunol.* 2002;168(12):6463-9.
- Van Eden, W., Van Der Zee, R. e Prakken, B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(4):318-30.
- Van Es, J. H., Raaphorst, F. M., Van Tol, M. J., Meyling, F. H. e Logtenberg, T. Expression pattern of the most JH-proximal human VH gene segment (VH6) in the B cell and antibody repertoire suggests a role of VH6-encoded IgM antibodies in early ontogeny. *J Immunol.* 1993;150(1):161-8.
- Van Kooten, C. e Banchereau, J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol.* 2000;67(1):2-17.
- Vela, J. L., Ait-Azzouzene, D., Duong, B. H., Ota, T. e Nemazee, D. Rearrangement of mouse immunoglobulin kappa deleting element recombining sequence promotes immune tolerance and lambda B cell production. *Immunity.* 2008;28(2):161-70.
- Victoria, G. D., Bilate, A. M., Socorro-Silva, A., Caldas, C., Lima, R. C., Kalil, J., *et al.* Mother-child immunological interactions in early life affect long-term humoral autoreactivity to heat shock protein 60 at age 18 years. *J Autoimmun.* 2007;29(1):38-43.
- Vieira, P. M., Silva, H. M., Takenaka, M. C., Monteiro, S. M., Lemos, F., Saitovitch, D., *et al.* Differential Monocyte STAT6 Activation and CD4+CD25+Foxp3+ T cell in Kidney Operational Tolerance Transplanted individuals. *Hum Immunol.* 2010.
- Wahrmann, M., Exner, M., Schillinger, M., Haidbauer, B., Regele, H., Kormoczi, G. F., *et al.* Pivotal role of complement-fixing HLA alloantibodies in presensitized kidney allograft recipients. *Am J Transplant.* 2006;6(5 Pt 1):1033-41.
- Wang, X. e Stollar, B. D. Immunoglobulin VH gene expression in human aging. *Clin Immunol.* 1999;93(2):132-42.

- Warrens, A. N., Lombardi, G. e Lechler, R. I. Presentation and recognition of major and minor histocompatibility antigens. *Transpl Immunol.* 1994;2(2):103-7.
- Wehner, J. R., Fox-Talbot, K., Halushka, M. K., Ellis, C., Zachary, A. A. e Baldwin, W. M., 3rd. B cells and plasma cells in coronaries of chronically rejected cardiac transplants. *Transplantation.* 2010;89(9):1141-8.
- Weitkamp, J. H., Kallewaard, N., Kusuhara, K., Bures, E., Williams, J. V., Lafleur, B., *et al.* Infant and adult human B cell responses to rotavirus share common immunodominant variable gene repertoires. *J Immunol.* 2003;171(9):4680-8.
- Wells, A. D., Li, X. C., Strom, T. B. e Turka, L. A. The role of peripheral T-cell deletion in transplantation tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001;356(1409):617-23.
- Wenger, R. H., Ayane, M., Bose, R., Kohler, G. e Nielsen, P. J. The genes for a mouse hematopoietic differentiation marker called the heat-stable antigen. *Eur J Immunol.* 1991;21(4):1039-46.
- Whittaker, J. R., Veith, F. J., Soberman, R., Lalezari, P., Tellis, I., Freed, S. Z., *et al.* The fate of the renal transplant with delayed function. *Surg Gynecol Obstet.* 1973;136(6):919-22.
- Wick, G., Knoflach, M. e Xu, Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:361-403.
- Willimott, S., Baou, M., Huf, S., Deaglio, S. e Wagner, S. D. Regulation of CD38 in proliferating chronic lymphocytic leukemia cells stimulated with CD154 and interleukin-4. *Haematologica.* 2007;92(10):1359-66.
- Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Haas, K. M., Poe, J. C., Fujimoto, M. e Tedder, T. F. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity.* 2008;28(5):639-50.
- Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Matsushita, T., Tsubata, T. e Tedder, T. F. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J Immunol.* 2009;182(12):7459-72.
- Yoshitomi, M., Koshiba, T., Haga, H., Li, Y., Zhao, X., Cheng, D., *et al.* Requirement of protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression after liver transplantation. *Transplantation.* 2009;87(4):606-14.
- Zanin-Zhorov, A., Tal, G., Shvitiel, S., Cohen, M., Lapidot, T., Nussbaum, G., *et al.* Heat shock protein 60 activates cytokine-associated negative regulator suppressor of cytokine signaling 3 in T cells: effects on signaling, chemotaxis, and inflammation. *J Immunol.* 2005;175(1):276-85.