Susan Caroline Pinto Borba

Pesquisa de anticorpos anti-megalina em pacientes transplantados renais

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

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia
Orientador: Prof. Dr. Jorge Kalil

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

Borba, Susan Caroline Pinto
Pesquisa de anticorpos anti-megalina em pacientes transplantados renais / Susan Caroline Pinto Borba. -- São Paulo, 2010.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientador: Jorge Kalil.

Descritores: 1.Transplante de rim 2.Rejeição de enxerto 3.Anticorpos 4.Megalina

USP/FM/DBD-172/10

À Deus por iluminar meu caminho

Aos meus pais, Magno e Magnólia meus alicerces, pelo amor e apoio incondicional. Que mesmo longe sempre estiveram ao meu lado.

Agradecimentos

Agradeço a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil, meu orientador, por ter me recebido em seu laboratório como sua aluna. Pelo imenso aprendizado durante as discussões e reuniões cientificas que muito contribuíram na minha formação.

Ao Prof. Dr. Nicolas Panajotopoulos, meu co-orientador, que me acompanhou durante todos esses anos, pelo apoio, pela grande amizade construída durante esse tempo, por ter colaborado para o meu amadurecimento cientifico e pessoal. Gratidão (Ευγνωμοσύνη) é a palavra que melhor define meus sentimentos em relação a você. Só pude chegar a reta final desse trabalho, em virtude da sua paciência, dedicação e carinho. Serei eternamente grata!

Ao Hélcio Rodrigues, pela amizade, sugestões, pelo seu apoio, me estimulando sempre. Esses anos de convivência que levarei sempre comigo, me renderam um rico crescimento profissional e pessoal. Você é uma pessoa muito especial. Obrigada por tudo!

Aos amigos do laboratório de HLA: Carlos Sérgio, Germano Phreus, Claúdia Rosales, Ivete Maria, Célia Yamaguti, Olga Morita, Marcelo Barrocal, Mario D´Angelo, Thiago Guerino , Fernanda Vilalva, Karina Blanez e Jonas Klein, por todo apoio, pela alegre convivência e amizade durante todo esse processo. Vocês foram minha segunda família. À vocês muito obrigada!

Aos amigos Carla, Susanne, Patrícia, Amanda, Hernandez e especialmente à Maisa, por dividirem comigo todas as minhas angústias e aflições, por fazerem meu dia-a-dia mais agradável e pela importante ajuda em varias etapas deste trabalho.

A toda equipe da Unidade de Transplante Renal por ter fornecido os dados clínicos dos pacientes que participaram deste estudo.

À Dra. Francine, pela sua colaboração com a parte clínica, ajuda com a obtenção de biopsias e por aceitar a participar da banca de qualificação. Suas sugestões e visão crítica sem dúvida me ajudaram muito.

À Dra Denise Malheiros, sempre solicita, me auxiliando na identificação das estruturas renais.

Aos Profs. Drs. Luis Vicente Rizzo e Ricardo Giordano, por toda ajuda disponibilizada.

Aos chefes de grupo: Verônica Coelho, Dr.Edécio Cunha e Dra.Luiza Guglielmi por serem tão prestativos, e sempre dispostos a ajudar.

À Maria Lúcia, "Malu", pelo seu enorme carinho, estímulo, apoio, pela paciência e por sua incrível dedicação e preocupação. Muito Obrigada!!!.

Às amigas de pós-graduação pelo apoio, pela convivência sempre prazerosa e principalmente pela amizade sincera.

À Ana Garippo pelas suas sugestões e obtenção das fotos de imunofluorescência.

À Rose, pela sinceridade, pelo carinho, pela amizade e ajuda com a técnica de Imunofluorescência.

À Helen, pela sua amizade e análises utilizando a bioinformática.

À Tânia, Andréia, Gisele, Sônia, Silvano e Sr. Jair por sempre me ajudarem com tanto empenho.

À Raí e a Elaine, pelo carinho e cuidado com nosso material de laboratório; pessoas fundamentais para o nosso trabalho.

A todos os colegas do laboratório, funcionários e alunos que dedicaram um pouco de seus tempos para compartilharem conhecimento, sejam eles técnicos ou científicos.

A minha irmã Alyne, por todo carinho, cuidado e amor que sempre teve por mim

Aos meu pais, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado. A vocês, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que fossem trilhados sem medo e cheios de esperanças, não bastaria um muito obrigado. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudéssemos realizar os nossos. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que nos acontece agora, quando procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras. Amo vocês!

"E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais".

Willian Shakespeare

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.* Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO..... 2

1.1 Sistema HLA 3

1.2 Bases Imunológicas da Rejeição 3

1.2.1 Vias de Alo-reconhecimento 3

1.2.2 Mecanismos efetores da Rejeição 5

1.2.3.Classificação das Rejeições 6

1.3. Antígenos não-HLA..... 9

1.4 Megalina 14

1.5 Megalina e Transplante Renal 15

2. OBJETIVOS 23

3. MÉTODOS..... 25

3.1. Casuística 25

3.1.1 Pacientes: Transplantados Renais 25

3.2 Obtenção e Armazenamento de Soros..... 27

3.3. Peptídeos..... 27

3.3.1. Síntese de Peptídeos..... 27

3.3.2. Anticorpos policlonais anti-peptídeo 18 e 19..... 29

3.4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 29

3.4.1. Titulação dos conjugados 29

3.4.2. Procedimento do teste de ELISA 30

3.4.3 Controles utilizados no teste de ELISA 31

3.4.4. Ponto de Corte "cut-off" para ELISA 32

3.5. Análise estatística 33

3.6. Imunofluorescência Indireta 33

3.6.1. Coleta e armazenamento de biopsias renais 33

4. RESULTADOS 36

4.1 Pacientes: 36

4.2. Reprodutibilidade do estudo piloto 37

4.3. Síntese e controle de qualidade dos peptídeos 40

4.4. Teste utilizando peptídeos re-sintetizados 42

4.5 Estruturas reconhecidas pelos anticorpos anti-peptídeos 18 e 19..... 43

4.6 Titulação do anticorpo anti-peptídeo 18 e do anticorpo secundário IgG conjugados com peroxidase (ELISA) 45

4.7 Pesquisa de reatividade inespecífica dos anticorpos anti-peptídeo da megalina contra o tampão de bloqueio (gelatina) 45

4.8 Pesquisa de anticorpos IgG e IGM anti-peptídeo 18 e 19 da megalina (soros pré-transplante) 46

4.9 Dados demográficos e Clínicos dos pacientes positivos para o peptídeo 19 51

4.10 Soros reativos contra peptídeos 18 e 19 vs Rejeição 52

4.11 Soros reativos contra peptídeo 19 vs C4d 57

4.12 Soros reativos contra peptídeo 19 vs perda da função renal 58

4.13 Comparações entre reatividade no pré-transplante vs pós-transplante (anti-pep19 IgM)..... 60

5. DISCUSSÃO 62

6. CONCLUSÕES 71

7. PERSPECTIVAS 71

8. REFERÊNCIAS 73

Lista de Abreviaturas

- AAM – Anticorpo anti-megalina
- *ADCC* – do inglês *antibody dependent cell mediated cytotoxicity*
- *AECA* – do inglês *Antiiendothelial cell antibodies*
- AGH – antiglobulina humana
- APC – do inglês *antigen presenting cell*
- AT1R – Anticorpo anti-receptor da angiotensina II Tipo I
- BSA – Albumina de soro bovino
- CDC – Citotoxicidade Dependente de Complemento
- CE – Célula Endotelial
- CPH – Complexo Principal de Histocompatibilidade
- DAPI – do inglês *4'-6-Diamidino-2-phenylindole*
- DMEM – do inglês *Dulbecco´s Modified Eagle Medium*
- DMSO – Dimetil-sulfoxido
- DO – Densidade óptica
- EDTA – sal di-sódico do ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA – do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
- EM – Endotélio Monócito
- FACS – do inglês *Fluorescence-Activated Cell Sorter*
- FITC – do inglês *Fluorescein isothiocyanate*
- FMOC – Flurenilmetilcarbonil
- HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica
- HLA – do inglês *Human Leukocyte Antiges*

- HPLC – do inglês *High Performance Liquide Chromatography*
- HUVECs – do inglês *Human umbilical vein endothelial cells*),
- IFI – Imunofluorescência Idireta
- IVIg – do inglês *Intravenous immune globulin*
- LDL– Low Density Lipoprotein
- LRP2 – Low Density Lipoprotein-related Protein-2
- MHC – do inglês *Major Histocompatibility Complex*
- MICA – do inglês *MHC class I Chain related gene A*
- NK – do inglês *Natural Killer*
- NTA – Necrose Tubular Aguda
- PBS – Tampão Salina Fosfato
- PC – Prova Cruzada
- PE – do inglês *Phycoerythrin*
- PRA – Reatividade Contra Painel
- RMA – Rejeição Mediada por Anticorpo
- RMC – Rejeição Mediada por Célula
- RVA – Rejeição vascular aguda
- SNP – do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*
- TCR – do inglês *T cell receptor*
- Tx – Transplante
- UNOS – *United Network Organ Sharing*
- UTR-HC-FMUSP – Unidade de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- VEC – do inglês *vascular endothelial cell*

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura tridimensional da megalina..... 18

Figura 2. Reprodutibilidade dos controles utilizados no estudo piloto..... 38

Figura 3. Teste com peptídeo 10 da miosina 39

Figura 4. Controle de qualidade dos peptídeo19..... 41

Figura 5. Controle de qualidade dos peptídeos 19 (re-sintetizados)..... 41

Figura 6. Análise do tempo de retenção pelo HPLC do peptídeo 19..... 42

Figura 7. Teste comparativo entre pep-18 re-sintetizado (InCor) e pep-18 (estudo piloto). 42

Figura 8. Repetição dos soros controle (estudo piloto). 43

Figura 9. Teste para verificar estruturas renais reconhecidas pelos anticorpos anti-peptídeo 18 e 19..... 44

Figura 10. Titulação do anticorpo anti-peptídeo 18..... 45

Figura 11. Pesquisa de ligação inespecífica dos anticorpos anti-peptídeo da megalina com a o tampão de bloqueio (gelatina)..... 46

Figura 12. Pesquisa de Anticorpos anti-P18 (IgG)..... 48

Figura 13. Pesquisa de Anticorpos anti-P19 (IgG)..... 49

Figura 14. Pesquisa de Anticorpos anti-P18 (IgM)..... 50

Figura 15. Pesquisa de Anticorpos anti-P19 (IgM)..... 51

Figura 16. Número de pacientes positivos e negativos para o peptídeo 18 nos grupos com e sem rejeição..... 52

Figura 17. Número de pacientes positivos e negativos para o peptídeo 19 nos grupos com e sem rejeição..... 53

Figura 18. Número de pacientes positivos e negativos para o peptídeo 19 nos grupos com AMR e sem rejeição..... 54

Figura 19. Número de pacientes positivos e negativos para o peptídeo 19 nos grupos com RMC e sem rejeição:)..... 54

Figura 20 Pacientes com presença exclusiva de Anti-Pep18 , Pep19 e presença de ambos os anticorpos..... 55

Figura 21 Pacientes com anticorpos anti- P19 na casuística de 81 transplantes consecutivos..... 57

Figura 22 Número de pacientes positivos e negativos anti-P19 nos grupos com C4d pos e C4d neg..... 58

Figura 23 Número de pacientes positivos e negativos anti-P19 nos grupos com perda do enxerto por RMA..... 59

Figura 24 Comparação entre reatividade no pré-transplante vs pós-transplante Pep19 (IgM)..... 60

Lista de Tabelas

Tabela 1. Comparação de resultados obtidos por Facs (linhagem Eahy 926) e ELISA (P18 e P19) em 10 eluatos renais 18

Tabela 2. Reatividade contra P18 e P19 dos soros pré-transplante..... 19

Tabela 3. Dados demográficos e clínicos dos 105 pacientes estudados..... 37

Tabela 4. Dados demográficos e clínicos dos pacientes positivos para o peptídeo 19..... 51

Tabela 5. Características dos pacientes positivos para o P19..... 56

Tabela 6. Característica dos pacientes que perderam o rim..... 59

Resumo

RESUMO

Borba SC. Pesquisa de anticorpos anti-megalina em pacientes transplantados Renais [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

Introdução: O papel do sistema HLA na evolução do transplante é indiscutível. Dados da literatura internacional e do nosso laboratório têm mostrado que este não é o único sistema envolvido nos processos de RMA (rejeição mediada por anticorpo) Esse fato é comprovado a partir da constatação de que transplantes realizados entre irmãos com total identidade HLA também são alvos da RMA. Entretanto, os alvos antigênicos desses anticorpos permanecem desconhecidos, dificultando assim o diagnostico e tratamento da RMA não-HLA. No transplante renal a presença desses anticorpos têm sido associada com anticorpos anti células endoteliais, células epiteliais tubulares, podocitos, células mesangiais e monócitos. Nosso objetivo neste estudo foi avaliar a presença e a relevância clínica de anticorpos contra a megalina, membro da família de receptores de LDL, expressa na membrana apical dos túbulos proximais, com importante papel na reabsorção de proteínas no rim. **Métodos:** Soros pré-transplante de 105 pacientes submetidos a transplante renal, realizado no Serviço de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (UTR-HC-FMUSP) foram testados por ELISA contra 2 peptídeos da megalina estudados e sintetizados em nosso laboratório. (convencionalmente chamados 18 e 19) **Resultado:** Não foi detectada a presença de anticorpos do isotipo IgG nas amostras pré-transplante dos pacientes estudados. Entretanto, foi detectada a presença de anticorpos do isotipo IgM anti-peptídeo 18 em 33 (31,4%) amostras de soro e anti-peptídeo 19 em 23 (21,9%). Para avaliar a significância clinica desses anticorpos dividimos os pacientes em 2 grupos: pacientes com pelo menos 1 episodio de rejeição aguda (Grupo I) e pacientes sem rejeição (Grupo II) e observamos a distribuição dos pacientes positivos nos 2 grupos. O numero de pacientes com anticorpos anti-peptídeo 18 foi igualmente distribuída nos dois grupos. (12/42, 28,5% no Grupo I e 21/63, 33,3% no Grupo II p=ns). A maioria dos pacientes com anticorpos anti-peptídeo 19 pertenciam ao grupo I (17/42, 40,5% ; 6/63, 9,5% p=0,0003). Esta analise demonstrou uma boa correlação entre presença de anticorpos anti-peptídeo 19 no soro pré-transplante e rejeição.
Conclusão: Nossos dados sugerem que anticorpos IgM anti-megalina no pré-transplante podem ser um fator de risco na rejeição do aloenxerto renal. É importante salientar que a nosso conhecimento este é o primeiro estudo envolvendo megalina e rejeição no transplante clínico.

Descritores: (1. Transplante de Rim; 2. Rejeição do enxerto; 3. Anticorpos; 4. Megalina)

Summary

SUMARY

Borba SC. *Anti-megalin Antibodies in kidney Transplantation [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.*

Background. Preformed donor-specific human leukocyte antigen (HLA)-antibodies are accountable for the majority of antibody-mediated rejections (AMR). However, recipients of HLA identical kidneys can develop AMR implicating putative pathogenic antibodies that are directed against non-HLA antigens. Unknown immune targets and consecutive lack of detection methods make non-HLA AMR particularly difficult to diagnose and treat. In renal transplant rejection, the presence of antibodies to non-HLA has been associated with antibodies against endothelial cells, tubular epithelial cells, podocytes, mesangial cells and monocytes. The aim of this study was to evaluate the presence and clinical relevance of preformed antibodies against megalin, a member of the LDL receptor family, expressed on the apical membrane of proximal tubules. Megalin performs a central role in renal protein reabsorption. **Methods.** Pré-transplant sera of 105 recipients of kidney allograft transplanted at Serviço de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (STR-HCFMUSP) were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) against 2 megalin-peptides (conventionally named 18 and 19) studied and synthetized in our laboratory. **Results.** Antibodies were not detected in pretranplant sera when tested for IgG isotype. However, in 33 (31,4%) sera we detected the presence of IgM antibodies to megalin-peptide18 and in 23 (21,9%) to megalin-peptide 19. To evaluate the clinical significance of these antibodies we divided the patients in 2 groups: Group I - 42 patients with at least one rejection episode during the first post-transplant year and Group II – 63 patients without any rejection episode and observed the distribution of positive patients in each of the 2 groups. Patients with megalin-peptide18 antibodies had the same distribution in both groups. (12/42, 28, 5% Group I and 21/63, 33,3% no Group II p=ns). However, patients with megalin-peptide19 antibodies were more frequent in group I. (17/42, 40,5% group I and 6/63, 9,5% group II p=0,0003). This analysis demonstrated a good correlation between preformed anti-megalin-peptide19 antibodies and allograft rejection **Conclusion.** Our data suggest that presence of IgM megalin antibodies before transplantation might be a risk factor for kidney allograft rejection. To our knowledge, this is the first study involving megalin and rejection in clinical transplantation.

Descriptors: (1. kidney Transplantation; 2. Graft Rejection; 3. Antibodies; 4. Megalin)

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O transplante renal é considerado hoje a terapia de escolha em caso de insuficiência renal crônica terminal, objetivando o prolongamento e uma melhor qualidade de vida para os pacientes. Isso se deve aos avanços alcançados no refinamento das técnicas cirúrgicas, ao surgimento de melhores drogas imunossupressoras, à melhoria nas técnicas imunológicas de seleção de órgãos e à cuidadosa monitorização clínica pós-transplante. Estes avanços permitiram um aumento significativo da sobrevida do enxerto, principalmente no primeiro ano pós-transplante. Os dados da UNOS *(United Network Organ Sharing*) demonstram que houve um aumento de 13% e 15% na sobrevida do enxerto nos últimos 10 anos para transplante com doador falecido e vivo, respectivamente. (Checka *et al.,*2002). Segundo a Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, a sobrevida do enxerto renal de doador falecido entre os anos de 1998 a 2009 foi de 83.4% no primeiro ano e de 59% no décimo ano. (Secretaria do Estado de SP., 2009). No entanto, a rejeição ainda é, entre outras, uma importante causa de perda de enxertos (Meier-Kriesche *et al*., 2004).

A rejeição é um processo de agressão ao órgão transplantado pelo sistema imune do hospedeiro, dirigido, principalmente, contra moléculas HLA (do inglês, *Human Leukocyte Antigen*) expressas na superfície das células do enxerto (Kamoun *et al.,*2001).

1.1 Sistema HLA

As moléculas HLA são glicoproteínas codificadas por genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH do inglês, *MHC - Major Histocompatibility Complex*) localizados no braço curto do cromossomo 6 humano. Estão divididas em duas classes: Classe I e Classe II. As moléculas de Classe I são codificadas pelos *loci* HLA A, B e C e estão expressas em todas as células nucleadas. As moléculas de Classe II são codificadas pelos *loci* DR, DQ e DP e estão expressas em células apresentadoras de antígenos (APC do inglês, Antigen Presenting Cells), entre elas células dendriticas, macrófagos, monócitos e linfócitos B e outras células quando ativadas, tais como linfócitos T e células endoteliais. As moléculas HLA de Classe I apresentam antígenos endógenos que são, geralmente, reconhecidos pelos linfócitos T CD8+, enquanto que as moléculas HLA de classse II apresentam antígenos de origem exógena que são, geralmente, reconhecidos pelos linfócitos T CD4+ (Delves e Roitt 2000).

1.2 Bases Imunológicas da Rejeição

1.2.1 Vias de Alo-reconhecimento

No contexto do transplante, o evento inicial da resposta imune é o reconhecimento de aloantígenos pelo receptor de células T (TCR, do inglês,

T cell receptor) alorreativas na superfície das APC. O reconhecimento do aloenxerto pelas células T pode ocorrer por duas vias distintas, porém não excludentes, podendo ambas estar envolvidas na mediação da rejeição simultaneamente ou em tempos diferentes. São elas: a via de alorreconhecimento direta e a indireta (Hernandez- Fuentes *et al.,.*2003).

Na via direta, as células T do receptor reconhecem peptídeos acoplados às moléculas intactas de MHC do doador, na superfície de APCs do doador. Na via de aloreconhecimento indireta, as células T do receptor reconhecem alo-antígenos processados e apresentados na forma de peptídeos presentes na superfície celular das APCs do receptor.

Acredita-se que a via direta tem um importante papel durante a fase precoce da rejeição do enxerto, devido à presença de leucócitos "passageiros", células sangüíneas que estariam de passagem no órgão transplantado e que apresentariam antígenos do doador deflagrando a resposta alo-específica (Rocha *et al.,*2003; Jiang *et al.,*2004).

Mais recentemente, foi descrita a via semi-direta de alo-reconhecimento. Nesta via, moléculas HLA-peptídeo do doador seriam transferidas intactas para as APCs do receptor, e mesmo aos linfócitos (contato direto ou vesículas exossomais), e seriam reconhecidas diretamente (sem processamento) pelos linfócitos T do receptor (Colvin *et al.,*1997; Afzali *et al.,*2007).

1.2.2 *Mecanismos efetores da Rejeição*

Após o aloreconhecimento antigênico, as células T aloreativas proliferam dando origem a clones de células T que migram para o órgão transplantado, desencadeando um processo de agressão ao enxerto. (Rose e Yacoub *et al.*,1989; Wecker *et al.*,1992). Entre estes clones estão presentes linfócitos T CD8+ e CD4+. Os antígenos HLA de classe I ativam os linfócitos T CD8+ e iniciam sua atividade citotóxica no enxerto através de pelo menos duas vias descritas: a via da perforina e granzima, que são proteínas citolíticas que criam poros na membrana da célula alvo levando à morte por lise celular, e indução de apoptose pela ligação de Fas-L à molécula de Fas, presente na superfície da célula alvo (Sheresta *et al.,*1998). Os antígenos HLA de classe II ativam os linfócitos T CD4+ auxiliares, dando início à produção de citocinas com perfil Th1 (pró-inflamatório) que através da produção de INF-y e interleucina-2 (IL-2), levam à reação de hipersensibilidade tardia no tecido transplantado, assim como auxiliam na produção de anticorpos IgG pelos linfócitos B e induzem apoptose nas células alvo. Por outro lado, linfócitos T CD4+ com perfil Th2 , produzem interleucina 4 (IL-4), 5 (IL-5), 10 (IL-10) e 13 (IL-13). Além disso, estão envolvidas na resposta humoral e têm ação imunoreguladoras ou antiinflamatórias. (Mosmam *et al.,*1986).

As interleucinas de perfil Th2, principalmente a IL-4, por serem fatores de crescimento de linfócitos B, levam a expansão clonal de plasmócitos e à produção de anticorpos, cuja interação com aloantígenos específicos desencadeia uma resposta inflamatória envolvendo a ativação

do sistema complemento. Outro mecanismo de ação dos anticorpos pode ser por citotoxidade celular dependente de anticorpo (*ADCC* do inglês, *Antibody dependent Cellular Cytotoxicicity*) com ativação de células NK (do inglês, *natural killer*) ou de macrófagos, promovendo lise das células-alvo (Rocha *et al.,*2003).

Nos casos mais severos de rejeição, com lesão endotelial intensa, pode ocorrer ativação da cascata do complemento e do sistema de coagulação, induzindo a migração de polimorfonucleares e plaquetas para o parênquima do órgão transplantado, levando à formação de trombos e obstrução vascular, evoluindo, muitas vezes para a perda do enxerto.

Essa cascata de eventos pode culminar em lesão tecidual e manifestações clínicas variadas, podendo levar à rejeição aguda ou crônica. Drogas imunossupressoras são usadas para bloquear esse processo de rejeição.

1.2.3 *Classificação das Rejeições*

A rejeição do aloenxerto pode ser classificada em: aguda e crônica, mediada por células e/ou por anticorpos, segundo o critério de *Banff*

A rejeição aguda caracteriza-se pela rápida diminuição da função do enxerto devido à resposta imune do hospedeiro. Ocorre, predominantemente, nos primeiros seis meses após o transplante renal, mas pode ocorrer mais tardiamente, principalmente se coexistir imunossupressão inadequada ou não adesão do paciente ao tratamento. Episódios de rejeição

aguda ocorrem em 20 a 30% dos pacientes transplantados, dependendo do grau de incompatibilidade HLA, da imunossupressão empregada e do centro transplantador (Sousa *et al.,*2008). Cerca de 90% das rejeições agudas são, predominantemente, mediadas por células T e são facilmente revertidas com tratamento imunossupressor clássico adequado (Helderman *et al.,* 2001). No entanto, cerca de 8-10% das rejeições agudas são mediadas por anticorpos (Crespo *et al.,*2006; Racusen *et al.,*2003; Tiloux *et al.,* 2010). Estes anticorpos ativam a cascata de complemento e levam a injúria vascular do enxerto. As rejeições mediadas por anticorpos nem sempre são revertidas pela imunossupressão clássica, necessitando de tratamento diferenciado, como plasmaferese e IVIg (do inglês *Intravenous immuneglobulin*).

A rejeição crônica ocorre de forma latente, meses ou anos, após o transplante e evolui para uma perda progressiva da função renal. As principais manifestações clínicas são: hipertensão arterial e proteinúria, (Joosten *et al.,* 2005). Histologicamente caracteriza-se por esclerose glomerular, atrofia tubular, espessamento e/ou duplicação da membrana basal glomerular e fibrose intersticial. Sua patogênese ainda não é totalmente entendida, acredita-se que tanto fatores não imunológicos, tais como toxicidade por droga e dislipidemia, quanto fatores imunológicos como deposição de imunoglobulinas no vaso, denudação endotelial e o constante infiltrado inflamatório na parede vascular participam do processo de rejeição crônica. (Nankivell *et al.,* 2006).

Na busca de entendimento da rejeição mediada por anticorpo, a recente inclusão da pesquisa de C4d em capilares peritubulares tem

emergido como uma importante ferramenta no auxílio ao diagnóstico de rejeição humoral (Feucht *et al.,*1993). O C4d é um produto da degradação do fator C4 da via clássica de ativação do sistema complemento, que se liga covalentemente (ligação forte e estável) à superfície da célula endotelial. Sua detecção por técnicas como imunohistoquímica ou imunofluorescência funciona como um indicador indireto de resposta mediada por anticorpos em biópsia renal (Nickeleit *et al.,* 2003; Herzenberg *et al.,*2001)

Recentemente, foi incorporada à classificação de *Banff* o diagnóstico de RMA, que tem por objetivo padronizar as diversas lesões estruturais do rim transplantado e estabelecer de modo uniforme e reprodutível para clínicos e patologistas avaliarem os diferentes graus de severidade das rejeições e de outras lesões. (Solez *et al.,*2007) como segue:

1. Evidências morfológicas de lesão tecidual aguda:

- Necrose tubular aguda ou;

- Neutrófilos e/ou células mononucleares em capilares peritubulares e/ou glomérulos, e/ou trombose capilar, ou ainda;

- Arterite intimal/necrose fibrinóide/ arterite intramural ou transmural

2. Evidências imunopatológicas de ação de anticorpos:

- Deposição de C4d e/ou;

- Deposição de imunoglobulinas nos capilares peritubulares (raro), ou ainda;

- Deposição de imunoglobulinas e complemento nas áreas de necrose arterial fibrinóide.

3. Evidências sorológicas de anticorpos circulantes:

- Presença de anticorpos dirigidos contra antígenos HLA do doador; ou;

- Presença de anticorpos contra antígenos endoteliais (anticorpos anti-células endoteliais).

Atualmente, a biópsia do rim transplantado é largamente utilizada na avaliação da disfunção renal dos enxertos e, apesar de suas limitações evidentes, é o método "padrão-ouro" no diagnóstico diferencial da disfunção aguda do enxerto.(Mauiyyedi *et al.*, 2002)

1.3. Antígenos não-HLA

Apesar do indiscutível papel do sistema HLA na evolução do transplante, dados da literatura internacional e do nosso laboratório têm mostrado que este não é o único sistema envolvido nos processos de rejeição. Esse fato é comprovado a partir da constatação de que transplantes realizados entre doador-receptor com total identidade HLA e até mesmo entre irmãos gêmeos idênticos também pode ocorrer rejeição humoral (Kalil J*et al.,* 1989; Cerilli *et al.,* 1987; Sumitran-Karuppan *et al.*,1997)

A partir desses achados começaram a aparecer trabalhos na literatura direcionados à identificação de anticorpos que reconhecessem antígenos

não pertencentes ao sistema HLA. Dentre estes, destacam-se os antígenos próprios das células endoteliais vasculares (VEC do inglês, *vascular endothelial cell*), pois estas fazem a interface entre o órgão transplantado e o sistema imune do receptor, sendo assim, considerados o primeiro alvo da rejeição. (Perrey *et al.,* 1998).

As VECs são populações muito heterogêneas que diferem entre o endotélio de diferentes espécies, tanto na expressão de proteínas como na composição antigênica (Page *et al.,* 1992; Ribatti *et al.,*2002). A VEC apresenta na sua superfície uma variedade de antígenos, sendo alguns expressos constitutivamente e outros apenas após ativação. Entre os expressos constitutivamente estão os antígenos do sistema ABO, (Paul *et al.,*1985) HLA classe I (Paul *et al.,* 1985; Rose *et al.,*1998) e antígenos próprios da VEC (Colvin *et al.,*1991). A VEC pode ser induzida à expressar HLA de classe II em resposta à citocinas inflamatórias durante a resposta imune, podendo então desempenhar um importante papel como célula apresentadora de antígenos, desencadeando uma resposta imune tanto celular como humoral (Pober *et al.,*1996). As VECs não só atuam como fonte de aloantígenos, mas também contribuem para uma eficiente integridade e funcionamento do endotélio (Victor *et al.,*2001), participando na manutenção do fluxo sanguíneo, prevenção da formação de trombos, regulação de extravasamento de solutos, hormônios, e no controle do recrutamento de leucócitos em áreas inflamatórias. Quando este balanço é afetado, ocorre uma alteração no equilíbrio hemodinâmico que pode tornar as células endoteliais ativadas. O endotélio ativado pode sofrer mudanças em

determinadas áreas, tanto morfológicas como antigênicas (Doukas *et al.,*1990) e esta ativação permite que o endotélio expresse um novo repertório ou aumente a expressão de moléculas com atividades diferenciadas, como as moléculas de adesão (Denton *et al.,*2000). Essas moléculas de membrana são responsáveis pelo estabelecimento de um contato intercelular direto, bem como pelo contato entre célula e matrix extracelular, podendo também funcionar como moléculas acessórias nas interações leucocitárias.

Anticorpos direcionados contra VEC foram inicialmente definidos como sendo autoanticorpos, em 1970, e foram associados à numerosas patologias autoimunes, como lúpus eritematoso disseminado (Song *et al.,* 2000), síndrome dos antifosfolípideos (Lanir *et al.,*1998), artrite reumatóide (Wang *et al.,*1993), e ainda na doença de Behçet (Lee *et al.,* 2002).

No transplante renal, o sistema de antígenos endotélio-monócito foi primeiramente descrito por Moraes e Stastny em 1975, os quais, estudando pacientes transplantados renais, relataram que 53% das amostras de soros desses pacientes possuíam anticorpos que reagiam contra células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVECs, do inglês *Human umbilical vein endothelial cells*) mas não contra os linfócitos. Os autores propuseram que tais anticorpos estariam reconhecendo um novo sistema aloantigênico, distinto do HLA e que estariam compartilhados entre células endoteliais e monócitos, uma vez que os soros que reagiam contra as HUVECs também reagiam contra os monócitos correspondentes.

Cerili *et al.*(1987) estudaram soros de 40 pacientes com perdas de enxerto por rejeição humoral que receberam rim de irmão HLA idêntico. Trinta e dois pacientes apresentaram anticorpos anti-células endoteliais (AECA do inglês*, antiendothelial cell antibodies*) antes do transplante, com prova cruzada (PC) monocitária positiva e PC contra linfócitos T e B, negativa. Esses resultados demonstraram que os linfócitos não expressam todos os antígenos implicados na rejeição.

Kalil *et al.*(1989) demonstraram que podem ocorrer rejeições humorais em pacientes que receberam enxerto de irmãos HLA idênticos com PC negativas. Foi possível demonstrar pela técnica de "*immunoblotting*", a reatividade do soro destes pacientes contra lisados de célula endoteliais, onde foi observada uma banda simples de peso molecular correspondente a 47kD.

Em trabalho de tese realizado em nosso laboratório, foi evidenciada a presença de AECA nos soros de pacientes transplantados renais que perderam o enxerto devido à rejeição humoral. Estes soros foram testados por microcitotoxicidade dependente de complemento contra um painel de HUVECs, bem como contra monócitos e linfócitos T e B. A reatividade foi específica apenas contra célula endotelial, não sendo compartilhada com monócitos e linfócitos (Macaúbas 1991).

Em outro estudo, desenvolvido em nosso laboratório baseado na marcação por imunofluorescência de pele do doador após incubação com o soro do receptor, foram detectados anticorpos provavelmente anti-endotélio, que se fixavam nos queratinócitos do doador. Este estudo sugeriu que a PC

de pele positiva é relativamente freqüente no primeiro transplante porém, sem significância clínica. Por outro lado, a PC positiva foi precisa em predizer perda precoce nos receptores que tinham anteriormente rejeitado um primeiro transplante. (Panajotopoulos *et al.,*1999)

Lucchiari *et al.,* (2000) pesquisaram o envolvimento de AECA em 22 eluatos obtidos de rins nefrectomizados que foram perdidos por diferentes tipos de rejeição. As PCs contra amostras de soro pré-transplante, pré-nefrectomia, uma e duas semanas pós-nefrectomia, foram negativas, excluindo assim a presença de anticorpos anti-HLA contra o doador. Os eluatos foram testados contra um painel de HUVECs. Em 8/22 casos foram detectados anticorpos do isótipo IgM, não citotóxicos, que se ligavam às células endoteliais. Vale a pena ressaltar, que a presença destes anticorpos foi observada em 8/9 dos eluatos provenientes dos enxertos dos pacientes com rejeição vascular aguda (RVA).

Ronda*, et al.,*(2006) pesquisaram AECA em eluatos, amostras de soro pré-transplante e pré-rejeição de pacientes que perderam o enxerto precocemente por rejeição mediada por anticorpo. A presença de anticorpos anti-HLA específicos para o doador foi excluída através de prova cruzada em soros pré-transplante, pré-nefrectomia, uma e duas semanas pós-nefrectomia. Foi realizada também absorção com ‘pool” de plaquetas para a depleção de anticorpos anti-HLA classe I não específicos para os antígenos do doador. A absorção desses anticorpos foi confirmada posteriormente por ELISA. Essas amostras e os eluatos foram testados contra linhagem EAHy.926, que consiste em um hibridoma da fusão de célula endotelial

HUVEC e célula epitelial A549 (linhagem de células tumorais do epitélio pulmonar). Não foram detectados anticorpos anti-endotélio nos soros pré-transplante, porém 3/4 soros pré-rejeição e 9/12 eluatos reagiram contra essa linhagem. Esses resultados indicaram que AECA podem estar envolvidos no processo de rejeição humoral.

Recentemente, vários estudos têm avaliado o papel da molécula MICA (do inglês *MHC class I Chain related gene A*) na resposta imune ao transplante alogênico. Codificada no CPH, próximo ao gene HLA-B, a molécula MICA é altamente polimórfica e tem expressão constitutiva restrita às células endoteliais, epitélio gastro-intestinal e fibroblastos (Zwirner *et al.,*2000). A caracterização molecular dos alelos MICA permitiu a padronização de testes de fase sólida por meio dos quais foi detectado o envolvimento de anticorpos anti-MICA na rejeição humoral aguda e crônica. (Zou *et al.,*2007; Terasaki *et al.,*2007)

Alguns dados publicados recentemente sugerem também o envolvimento de anticorpos anti-receptor da angiotensina II tipo I na rejeição do aloenxero renal. Entretanto, a incidência e prevalência desses anticorpos em pacientes na lista para transplante renal é desconhecida. (Dragun *et al.,*2005)

1.4 Megalina

A megalina também conhecida como LRP2 (do inglês *Low density lipoprotein-related protein-2*) é uma glicoproteína transmembranica

endocítica pertencente à família de receptores da lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês *low density lipoprotein receptor*). Foi nomeada inicialmente de gp330 de acordo com o seu peso molecular depois foi clonada por Saito *et al* (1994) mostrando ser uma glicoproteina de 600kDa sugerindo o nome “Megalina”.

O seu papel patogênico em doenças autoimunes foi primeiramente descrito em modelo experimental de ratos Lewis na nefrite de Heymann´s correspondente a glomerulonefrite membranosa em humanos, entretanto, em humanos esses anticorpos não são implicados na doença, pois a megalina não está expressa nem em podócitos e nem nos glomérulos. (Kerjaschki, *et al.,* 1982)

A megalina é codificada no cromossomo 2q31-q32 em humanos e está expressa nos túbulos proximais renais e em vários outros epitélios de absorção. A principal função da megalina é manutenção da endocitose do túbulo terminal. A megalina exerce também um importante papel na reabsorção e purificação de substâncias do filtrado glomerular, incluindo albumina e proteínas de baixo peso molecular (Saito, *et al.,* 2010).

1.5 Megalina e Transplante Renal

Trabalhos não só na área de transplante, mas também na auto-imunidade apresentaram várias tentativas na caracterização dos antígenos do sistema endotelial através de técnicas como *western blotting*,

imunoprecipitação e *imunoscreening*, porém, não foi obtido nenhum resultado conclusivo através destas técnicas (Meroni *et al.,* 2005).

Nosso laboratório recorreu à sofisticada técnica de *Phage display* que consiste na apresentação de peptídeos exógenos na superfície de fagos filamentosos, vírus que infectam células bacterianas. Isso foi demonstrado, primeiramente, por Smith em 1985 e, desde então, o *Phage display* tem sido amplamente empregado com a finalidade de identificar ligantes através de interações moleculares e obter informações sobre a relação receptor-ligante.

Sequências aleatórias de DNA são introduzidas no gene que codifica a proteína do capsídeo do fago (camada externa e protetora). Desta forma, sequências aleatórias de peptídeos fundidas à proteína do capsídeo (pIII ou pVIII, dependendo do sistema a ser empregado) são geradas durante a produção da partícula viral (Smith *et a*l., 1985). No fim do processo, bilhões de bacteriófagos são gerados, cada um deles apresentando um peptídeo diferente. Esta coleção de partículas virais recebe o nome de biblioteca apresentadora de peptídeos.

Estas bibliotecas de peptídeos são, então, incubadas com as moléculas alvo do estudo (receptores purificados, células expressando seus receptores de superfície, anticorpos, entre outros). Este processo denominado *biopanning*, ou simplesmente *panning*, permite selecionar os fagos ligantes, expressando peptídeos que mimetizam ligantes naturais destas moléculas. (revisado por Azzazy *et al.,* 2002).

Em estudo piloto não publicado, foram analisados eluatos de rins perdidos por rejeição humoral, entre 1990-1995, os quais foram testados

contra uma biblioteca de peptídeos (CX7C) pela técnica de *Phage display*. A análise estatística das 1200 sequências geradas mostrou uma forte reatividade dos eluatos testados com 27 peptídeos pertencentes a uma mega proteína denominada megalina.

A megalina é uma glicoproteína de membrana plasmática, fortemente expressa no epitélio do túbulo proximal renal (Birn *et al.,*2001) e tem como principais funções a endocitose e a reabsorção de várias proteínas, dentre as quais a albumina. Estudos experimentais mostraram que a ausência ou disfunção da megalina juntamente com a cubilina, que também é um receptor endocítico, pode causar albuminúria podendo progredir para insuficiência renal crônica. (Christensen *et al.,*2001, Yammani *et al.,*2002).

Os 27 peptídeos reconhecidos pelos eluatos analisados foram sintetizados e em seguida testados através da técnica de ELISA com soros e eluatos de outros pacientes, incluindo aqueles estudados por Ronda, (2007) que não compunham a amostra original, assim como com amostras de soros controles provenientes de doadores renais vivos. Foi observado que somente os soros pré-transplante e eluatos de rins de pacientes com rejeição humoral reconheciam com grande especificidade 2 peptídeos da megalina convencionalmente chamados de peptídeo 18 e peptídeo 19. O peptídeo 19 apresenta um SNP (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*) 19* que leva a uma troca no aminoácido (Ser3→Asp3). Os dois peptídeos possuem regiões expostas ao meio, as quais podem facilitar ligação dos anticorpos específicos, como mostrado na figura 1.

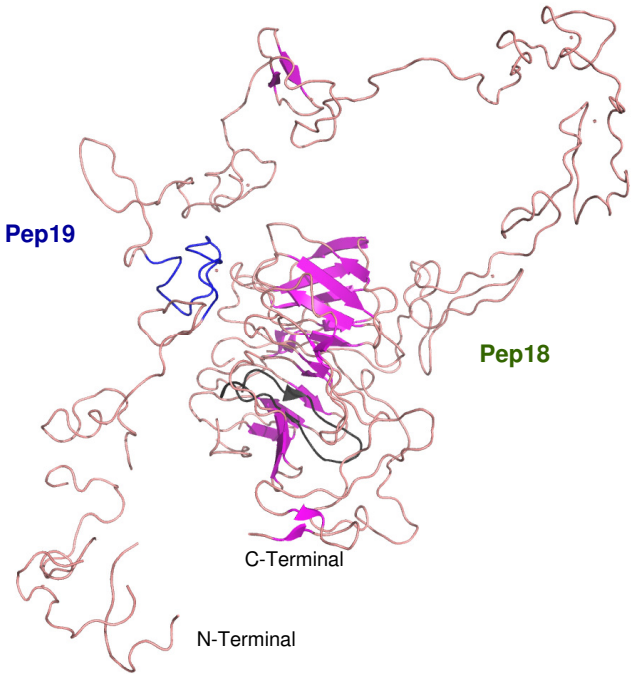

Figura 1. Estrutura tridimensional da megalina. Código de acesso - PDB:1N7D

Esses dados foram comparados com os resultados obtidos por citometria de fluxo com a linhagem Eahy 926 e foi observado que a maioria das amostras positivas para AECA foi também positiva para os peptídeos 18 e 19 da megalina testados por ELISA, conforme mostra a Tabela 1

Tabela 1. Comparação de resultados obtidos por Facs (linhagem Eahy 926) e ELISA (P18 e P19) em 10 eluatos renais

	Peptídeo (ELISA)							
FACS Eahy 926	**P18**		**P19**		**P18+19**		**P18 e/ou 19**	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
Pos	6	2	6	2	5	3	7	1
Neg	1	1	2	0	0	1	2	0

Pos = Positivo; Neg = Negativo

Na tentativa de caracterizar melhor a especificidade dos AAM (anticorpos anti-megalina) foram analisados soros de 3 grupos de pacientes: pacientes que perderam o enxerto por RMA, pacientes com pelo menos um episódio de rejeição e boa evolução clínica e pacientes sem episódios de rejeição, com seguimento de um ano. Verificou-se reatividade apenas no grupo de pacientes com rejeição humoral, mostrando uma alta especificidade na detecção desta rejeição (tabela 2). Assim, se esses resultados forem confirmados em uma casuística maior, a pesquisa de AAM poderia ser usada como teste imunológico com alto valor preditivo para rejeição humoral.

Tabela 2. Reatividade contra os peptídeos 18 e 19 dos soros pré-transplante

	Grupo I (10)	**Grupo II (10)**	**Grupo III (10)**	**Grupo IV (10)**
Peptídeo 18	7	0	0	0
Peptídeo 19	6	0	0	0

Grupo I: Pacientes com perda (RMA); II: paciente com rejeição e boa evolução clínica; III : pacientes sem episódios de rejeição; IV: doadores renais vivos ; (10): 10 soros de pacientes.

Esses dados nos encorajaram a seguir com esse estudo para tentar esclarecer melhor o papel dos AAM e verificar se esses anticorpos podem ser usados como marcadores preditivos de rejeição. É importante salientar que não existem estudos, pelo menos no campo do transplante, envolvendo AAM.

O diagnóstico precoce da rejeição é clinicamente relevante para o estabelecimento de uma estratégia terapêutica adequada e especifica

considerando que hoje com a utilização da IVIg é possível reverter uma rejeição humoral causada por anticorpos dirigidos contra antígenos do sistema ABO e HLA. (revisado por Crespo et al.,2006).

A IVIg é um concentrado de imunoglobulinas humanas preparadas a partir de “pool” de plasma de mais de 1000 doadores de sangue (Morell et al.,1986; Kazatchkine *et al.,*2001). Dados recentes sugerem que a terapia com a IVIg leva a redução de ligação de anticorpos anti-HLA em pacientes hipersensibilizados, podendo negativar a prova cruzada e, desta forma, tornar viável o transplante renal (Castro *et al.,*2004). A IVIg mostrou-se também eficaz em tratamentos de episódios de rejeição humoral (revisado por Jordan *et al.,*2006). Estudo *in vitro* realizado em nosso grupo demonstrou que a IVIg pode ser eficaz na diminuição da ligação de anticorpos AECA. Neste estudo foram testados 9 eluatos positivos para AECA por citometria de fluxo, com e sem adição de IVIg para observar uma possível eficácia no bloqueio da ligação dos AECA com a célula alvo. Em todos os 9 casos a adição da IVIg resultou em forte diminuição da ligação de AECA, da mesma forma como já foi mostrado para anticorpos anti-HLA. Em frente a esses dados, seria interessante observar se esse tratamento seria eficaz sobre os AAM.

Assim, uma melhor compreensão sobre os anticorpos AAM em pacientes transplantados renais poderia identificar um novo marcador preditivo para rejeição humoral através de uma metodologia não invasiva e contribuir na elaboração de estratégias de prevenção e tratamento deste tipo

de rejeição com a utilização de terapias imunossupressoras mais direcionadas, como por exemplo, a plasmaferese e a IVIg.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Verificar a presença e a significância clínica de anticorpos anti-megalina em pacientes transplantados renais

Objetivos Específicos

- Verificar o valor preditivo dos anticorpos anti-megalina na rejeição mediada por anticorpos

- Caracterizar os anticorpos anti-megalina quanto ao isotipo, reconhecimento de estruturas renais e verificar se estes anticorpos são fixadores ou não de complemento.

Métodos

3. MÉTODOS

3.1. Casuística

Este é um estudo retrospectivo e unicêntrico, que tem com finalidade avaliar a presença de anticorpos anti-peptídeos pertencentes à megalina em pacientes submetidos a transplante renal isolado, primário ou não, com doador falecido ou vivo (parente ou não parente), realizado na Unidade de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (UTR-HCFMUSP) durante um período de 12 meses após o transplante.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 18.04.07 sob o protocolo de pesquisa de nº 0148/07.

3.1.1 Pacientes: Transplantados Renais

Foram estudados 105 pacientes transplantados renais, com consentimento informado por escrito, na Unidade de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (UTR-FMUSP). Destes, 81 foram transplantados entre junho de 2005-

julho de 2006. Estes pacientes foram avaliados em estudo prévio entitulado*: "Relevância da monitorização dos anticorpos anti-HLA após o transplante renal: estudo clínico e anatomopatológico".* No decorrer do trabalho foram avaliados 14 pacientes que tiveram episódios de rejeição mediada por anticorpos entre janeiro de 2007 e dezembro de 2008 e 10 pacientes transplantados entre 1999 a 2001, que perderam o rim por rejeição mediada por anticorpos não-HLA e não-MICA, previamente estudados para pesquisa de AECA. A ausência de anticorpos anti-HLA contra o doador foi verificada nos momentos pré-transplante, pré-rejeição, pré e pós nefrectomia, através da realização de provas cruzadas.

Todos os pacientes foram transplantados com provas-cruzadas contra linfócitos T e B negativas.

A Imunossupressão de manutenção foi baseada em esquema tríplice: todos pacientes receberam prednisona, inibidor de calcineurina (tacrolimo ou ciclosporina) e micofenolato (mofetil ou sódico) ou rapamicina. A imunossupressão utilizada foi definida de acordo com as indicações habituais do grupo da UTR, levando-se em consideração as características clinicas e imunológicas dos pacientes no pré-transplante.

O controle clínico e as condutas foram realizados conforme a rotina do serviço. A biópsia renal foi indicada quando o paciente apresentava sinais clínicos e/ou laboratoriais que sugerissem rejeição. Os fragmentos de biopsia foram submetidos à avaliação histopatológica e à pesquisa de C4d por imunofluorescência indireta e/ou imunoperoxidase e classificadas conforme os critérios de *Banff .*

3.2 Obtenção e Armazenamento de Soros

As amostras de soro foram obtidas a partir da coleta de 15ml de sangue periférico em tubo seco, ou seja, sem o uso de anticoagulantes. Após a retração do coágulo, os tubos foram centrifugados a 600 x g por 10 minutos para separar o soro de elementos celulares. Em seguida, as amostras de soro foram fracionadas em alíquotas, as quais foram guardadas a -40º C até o momento da realização dos testes. As coletas foram realizadas no momento pré-transplante, pós-transplante e nos momentos pré-rejeição de pacientes transplantados renais na UTR-HCFMUSP .

3.3. Peptídeos

3.3.1. Síntese de Peptídeos

Foram sintetizados os peptídeos 18, 19 e 19* SNP) pertencentes à megalina no Laboratório de Imunologia (InCor-FMUSP). Para tanto, foi utilizada a tecnologia de fase sólida com aminoácidos na forma Fmoc (Fluorenilmetilcarboni)l os quais foram aplicados em sintetizador APEX-396 (Advanced Chemtech, Louisville, KY, EUA). As purificações foram realizadas por cromatografia líquida de alta pressão – HPLC (LC-10 AD, Shimadzu, Japão). e caracterizadas por espectrometria de massa (Ettan Maldi, Amersham Biosciences, Oxford, Reino Unido).

Os critérios internos para a liberação de peptídeos com o grau de pureza satisfatório para o uso experimental foram:

- Presença de similaridade entre o tempo de retenção do peptídeo analisado e o tempo de retenção de referência no HPLC.
- O pico referente ao peptídeo ser uma curva Gaussiana.
- Mínimo de 80% de pureza. 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.
- Presença, no espectro de massa do pico corresponde ao peso molecular esperado.

As pequenas variações entre o peso molecular esperado e o observado são aceitáveis e, na maior parte das vezes, são devido à perda ou adição da molécula de hidrogênio ou água à cadeia peptídica, que não devem interferir no ensaio de ELISA.

Os peptídeos da miosina cardíaca S2-10 e S2-31 que foram utilizados como controles do teste foram também produzidos e testados em nosso laboratório.

As sequências dos peptídeos foram omitidas devido o pleiteamento de patente.

Os peptídeos liofilizados foram diluídos com 10µl de dimetil-sulfóxido (DMSO, Merk Darmstadt, Alemanha), sendo depois completados com o tampão PBS 1X até o volume final de 1ml. Todos os peptídeos foram utilizados na concentração de 15µg/ml.

3.3.2. Anticorpos policlonais anti-peptídeo 18 e 19

Considerando que este é um estudo novo do qual não podemos contar com dados da literatura, controles e reagentes apropriados, optamos pela produção de anticorpos comerciais específicos contra esses peptídeos. Desta forma, anticorpos policlonais do isotipo IgG anti-peptídeo 18, 19 e 19* da megalina foram produzidos pela empresa Biosystem.

3.4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.4.1. Titulação dos conjugados

Foram utilizados neste trabalho anticorpos anti-IgG humana conjugados com peroxidase produzidos em cabras (Sang Stat, lote 9839, Menlon Park, CA, EUA) e anticorpos anti-IgG de coelho conjugados com peroxidase produzidos em camundogos. Para cada titulação, foram realizadas diluições seriadas dos conjugados. As placas foram previamente sensibilizadas com 100µl do peptídeo S2-10 diluídos em tampão

bicarbonato-carbonato (concentração = 15µg/ml) e incubadas com um soro positivo e um soro negativo, diluídos em tampão de bloqueio 1/50 e 1/100. O título do conjugado de IgG ficou definido em 1/30000, por apresentar uma D.O. próxima de 2,0, que segundo o fabricante, é a ideal.

O conjugado de IgM utilizado para ensaio de ELISA foi o anticorpo anti-IgM humana conjugada à peroxidase (lote A-4290, Sigma, Steinhein, Alemanha). Para a titulação foi adotada a mesma estratégia anterior, variando apenas o conjugado adicionado ao sistema. Fixou-se, então, a diluição de 1/1000 para o título do conjugado IgM.

3.4.2. Procedimento do teste de ELISA

Foram utilizadas placas de 96 poços de com alta ligação para ELISA (Costar 3369, Corning, New York, NY, EUA). Inicialmente foi realizada a sensibilização das placas com 100µl de peptídeos sintéticos da megalina, diluídos previamente em tampão bicarbonato-carbonato 0,05 M pH 9,6 (Merk, Darmstadt, Alemanha) a uma concentração de 15µg/ml, conforme a padronização. As placas foram incubadas por uma hora a 37ºC. Após o período de incubação. Posteriormente, foram lavadas com tampão de lavagem (PBS-Tween 0,1%) na lavadora de placas (Skan Washer 300, Skatron, Maryland, EUA) e bloqueadas com gelatina 2,5% (Porcine Skin gelatin, G-2625, Sigma, Steinhein, Alemanha) por uma hora a 37ºC. Os soros previamente diluídos (1/50 e 1/100 em tampão PBS) foram

adicionados em cada poço (100 µl/poço) e incubados por 24 horas, a 4°C. Após o período de incubação as placas foram lavadas novamente (PBS-Tween 0,1%). Em seguida, foi adicionado o conjugado anti-IgG total humana (lote 9839, Sang Stat, Menlon Park, CA, EUA) a uma diluição de 1/30.000 ou o conjugado anti-IgM humana (lote A-4290, Sigma, Steinhein, Alemanha), diluído na proporção de 1/1000 de acordo com a padronização. As placas foram incubadas por 30 minutos, a 37^0C, seguindo-se de uma nova lavagem e adição de 100 µl/poço do substrato (4mg de orto-fenilenodiamina - O.P.D. em 10 ml de tampão citrato pH= 5,0 adicionado de 4 µl de H_2O_2 30%), incubadas novamente por 30 min, a 37^0C. A reação foi bloqueada com 50 µl de H_2SO_4 a 2N. As leituras das absorbâncias foram realizadas em leitora de ELISA (SpectraMax 190, Molecular Devices, Mountain View, CA, EUA), em 450nm.

3.4.3 Controles utilizados no teste de ELISA

Controle negativo:

- Soro humano não reativo contra peptídeo da miosina cardíaca, S2-(10). (IgG)
- ‘Pool” de soros de doadores-vivos renais previamente testados (IgG e IgM)
- Soro de coelho pré-imunizado com os peptídeos 18 e 19 da megalina (IgG)

Controle positivo:

- Soro humano reativo ao peptídeo da miosina cardíaca S2-10.(IgG)

- Anticorpos purificados anti-peptídeos 18 e 19 da megalina, produzidos em coelho contra os peptídeos 18 ou 19 da megalina (IgG)

- Soro de paciente lúpico (reativo aos peptídeos 18 e 19da megalina).

Branco:

- Tampão PBS contra os peptídeos em teste.

Controle Imunoglobulina: Os poços foram sensibilizados com IgG monoclonal humana (1 µg/poço), que funcionam como controles positivos e servem também para checar a qualidade de ligação do conjugado.

Controle gelatina: Para verificar a reatividade dos soros em estudo contra a gelatina de origem animal (pele de porco), que foi utilizada no sistema como solução de bloqueio. Realizamos em paralelo um ensaio com a placa sensibilizada com a solução de gelatina, e após o tempo de incubação e a lavagem da placa, foram adicionadas as amostras de soro no sistema para verificar se os soros em estudo tinham anticorpos reativos à gelatina. As densidades óticas acima de 0,1 foram descontadas do resultado bruto com os peptídeos para se obter os resultados livres de ligações inespecíficas.

3.4.4. Ponto de Corte "cut-off" para ELISA

O cut-off foi estabelecido a partir da média das reatividades dos controles negativos nos testes realizados e foram acrescentados 3 desvios-padrão.

Segue o cut-off para cada condição:

Pep-18 IgG = DO > 0,15

Pep-19 IgG = DO > 0,188

Pep 18 IgM = DO >0,194

Pep 19 IgM = DO >0,352

3.5. Análise estatística

A comparação dos dados entre grupos foi realizada através do Teste Exato de Fisher. Valor de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

3.6. Imunofluorescência Indireta

3.6.1. Coleta e armazenamento de biopsias renais

Foi obtida uma biópsias de doador vivo proveniente da Unidade de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (UTR-FMUSP), com tipagem sanguínea do grupo O, no ato cirúrgico, antes da reperfusão para evitar contanto com possíveis anticorpos presentes no sangue do receptor.

Para manter a integridade do tecido renal, o fragmento de biopsia foi fixado em Tissue Teck para ser criopreservado. Em seguida foi congelado e mantido em freezer a -80ºC.

3.6.2. Procedimento da técnica de IFI

Para o teste de detecção das estruturas renais reconhecidas por anticorpos não-HLA anti-peptídeo 18 e 19 da megalina foi utilizado o método de imunofluorescência indireta. Foram realizados cortes de 4µm de espessura do tecido de biópsia renal criopreservada, em criostato, a -20ºC e colocados sobre lâmina contendo adesivo e mantidos no freezer -80ºC . As lâminas foram lavadas três vezes durante 30 minutos em solução tampão PBS 1X gelado (pH 7,2) e bloqueadas com PBS/BSA 2,5% por 1h, para evitar ligação inespecífica dos anticorpos com componentes celulares. Os anticorpos primários (anticorpo IgG anti-peptídeo purificados 18 e 19 da megalina, produzido em coelho (Biosystem, USA) foram adicionados na lamina e incubados por 1h após 3 lavagens por 30 min. Foi utilizado como controle negativo 1 lâmina apenas bloqueando o corte com PBS/BSA 2,5% (Vector) sem a presença de anticorpo . Incubou-se por 1 hora. Em seguida as lâminas foram lavadas três vezes por 30 minutos. Todas as incubações foram realizadas em temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 50µl de anticorpos secundários (IgG anti-coelho conjugado com Alexa 546) na diluição de 1:100 (conforme recomendado pelo fabricante), por 1 hora, em câmara úmida no escuro em, temperatura ambiente. Por último as lâminas foram incubadas com DAPI (marcador de núcleo) por 15 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas e montadas fixando as lamínulas com glicerina e selando-as com esmalte.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Pacientes:

Foi pesquisada retrospectivamente em 105 pacientes transplantados renais, a presença de AAM em amostras de soro pré-transplante. Relacionamos estes achados com a evolução do enxerto.

Destes 105 pacientes, 81 foram transplantados entre junho de 2005 a julho de 2006 (casuística inicial). Entretanto, no decorrer deste estudo incluímos à nossa casuística 14 pacientes transplantados entre janeiro de 2007 e dezembro de 2008 que apresentaram episódios de rejeição mediada por anticorpo (não esclarecida) e analisamos também 10 pacientes transplantados entre 1999 a 2001, que perderam o rim por rejeição mediada por anticorpos não-HLA e não-MICA, previamente estudados para pesquisa de AECA. A ausência de anticorpos anti-HLA contra o doador foi verificada nos momentos pré-transplante, pré-rejeição, pré e pós nefrectomia, através da realização de provas cruzadas. Estes pacientes foram incluídos, afim de aumentarmos o grupo de pacientes com rejeição uma vez que, anticorpos não-HLA são encontrados em apenas 2-3% dos casos de rejeições mediadas por anticorpos.

Foram estudados 48 pacientes do gênero masculino e 57 do gênero feminino com idade média de 42 ± 12,7 anos. Cinqüenta e oito receberam rim de doador vivo, sendo 40 de doador vivo aparentado e 18 de doador vivo não-aparentado. Em 86 pacientes (82%) este foi o primeiro transplante. Quarenta e dois (40%) pacientes apresentaram pelo menos um episodio de

rejeição sendo que 31/42 (73,8%) foram classificadas como rejeições mediadas por anticorpo. (Tabela 3)

Tabela 3. Dados demográficos e clínicos dos 105 pacientes estudados

Dados demográficos e clínicos		105 pacientes	Percentagem (%)
Idade		42 ± 12,7	
Gênero:	Feminino	57	54
	Masculino	48	51
Primeiro Tx		86	82
Transfusão Prévia		86	82
Gestação		39	37
Tipo de Doador:	Vivo Aparentado	40	38
	Vivo não-aparentado	18	17
	Falecido	47	44
Doença Renal Primaria			
	Glomerulonefrite Crônica	21	20
	Nefropatia Diabética	08	7,7
	Doença Renal policística	06	5,8
	Pielonefrite Crônica	05	4,8
	Nefropatia Lúpica	07	6,7
	HAS	18	17
	Sem Informação	18	17
	Outras	22	21
Tipo de Rejeição:	RMA	31	29,5
	RMC	11	10,4

Tx: transplante; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; RMA: Rejeição Mediada por anticorpo; RMC: Rejeição Mediada por célula

4.2. Reprodutibilidade do estudo piloto

Primeiramente, foram estudados os soros controle utilizados previamente no estudo piloto. Através do teste de ELISA foi investigada a presença de anticorpos anti-peptídeo 18 e 19 da megalina para o isotipo IgG

seguindo o mesmo protocolo do estudo piloto. Foi utilizado como controle negativo um pool de soro de doadores renais vivos; como controle positivo um soro reagente no estudo piloto contra os peptídeos 18 e 19 da megalina. Foram testadas também algumas amostras de soros previamente positivas.(1* e 2*) como mostrado na figura 1. As amostras de soros foram testadas nas diluições 1/50 e 1/100 e os peptídeos na concentração de 15µg/ml.

Todas as amostras, inclusive o controle positivo, apresentaram DO semelhante à encontrada no controle negativo, não havendo assim reprodutibilidade do estudo piloto. (Figura 2)

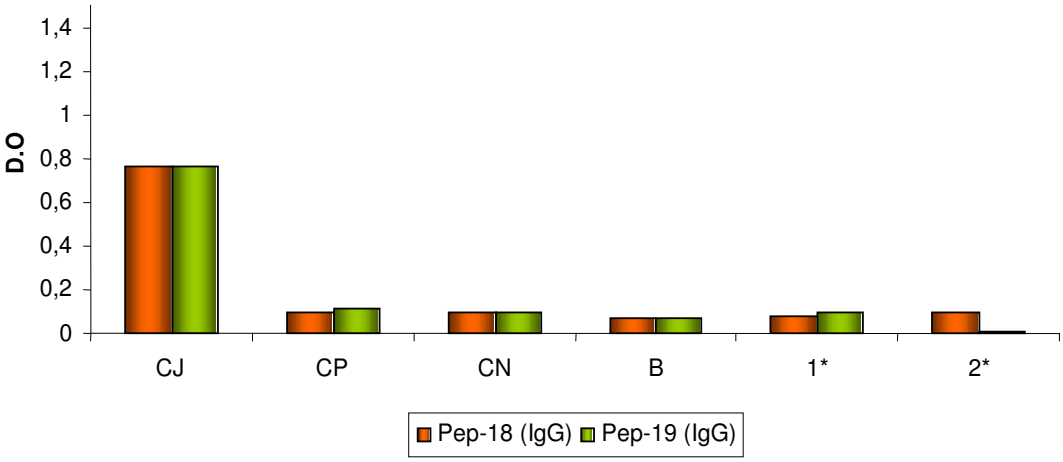

Figura 2 . Reprodutibilidade dos controles utilizados no estudo piloto: CJ : placa sensibilizada com IgG; CP : soro "reagente" no estudo piloto; CN : soro de doadores renais vivos; B: Branco; 1* e 2*: amostras positivas no estudo piloto. A diluição dos soros foi de 1/50 e a concentração do peptídeo 15µg/ml.

Uma vez que os resultados do estudo piloto não foram reproduzidos resolvemos inserir um novo controle para verificar se o teste realmente estava funcionando. Assim, inserimos como controle positivo para o teste um peptídeo da miosina cardíaca e um soro conhecidamente reativo contra esse

peptídeo, devido o teste para esta proteína ser bem padronizado em outros estudos no nosso laboratório.

Observamos reatividade do soro anti-peptídeo 10 da miosina cardíaca, com a mesma DO padrão do laboratório, mas não para as outras amostras (estudo piloto). Confirmada assim a funcionalidade do teste, decidimos modificar o tempo de incubação antígeno/anticorpo de 1hora (como no estudo piloto) para over-night conforme padronizado em nosso laboratório para a miosina cardíaca. Portanto, as amostras previamente positivas no estudo piloto continuaram apresentando DOs semelhantes ao controle negativo inclusive o soro anteriormente utilizado como controle positivo (Figura 3).

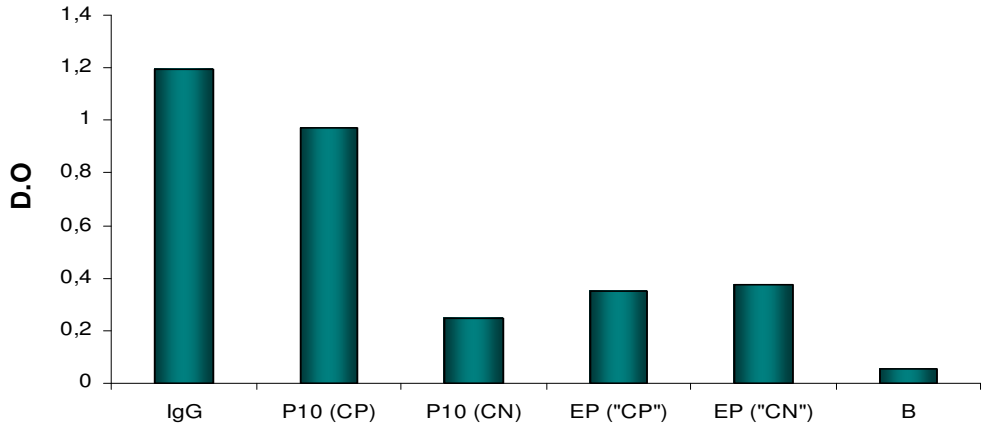

Figura 3. Teste com peptídeo 10 da miosina: IgG placa sensibilizada com IgG, P10(CP): soro reagente ao peptídeo 10 da miosina cardíaca; P10(CN): soro não reagente ao peptídeo 10 da miosina cardíaca; EP("CP"): soro "reagente" no estudo piloto; P10("CN") Soros de doadores renais vivos; B: Branco os soros foram testados nas diluições de 1/50 19 da megalina.

4.3. Síntese e controle de qualidade dos peptídeos

Considerando que o teste de ELISA estava funcionando, fomos verificar se havia algum problema com os peptídeos 18 e 19 da megalina, que poderia justificar a causa da não reprodutibilidade do estudo piloto.

Os peptídeos 18 e 19 foram então re-sintetizados em nosso laboratório com as mesmas seqüências as quais estão descritas a seguir: 18, 19 e 19*. Tanto os peptídeos re-sintetizados quanto os peptídeos utilizados no estudo piloto foram analisados por espectrometria de massa e a pureza analisada através do HPLC.

Não foi observado o pico com a massa correspondente aos peptídeos utilizados no estudo piloto (figura 3). O tempo de retenção analisado pelo HPLC que é outro parâmetro de avaliar sua qualidade foi diferente quando comparados aos peptídeos re-sintetizados não preenchendo, desta forma, os critérios de aprovação para uso. Entretanto, todos os peptídeos re-sintetizados apresentaram o pico com a massa correspondente e pureza superior a 80%, preenchendo assim os critérios internos de qualidade (figura 4 e 5).

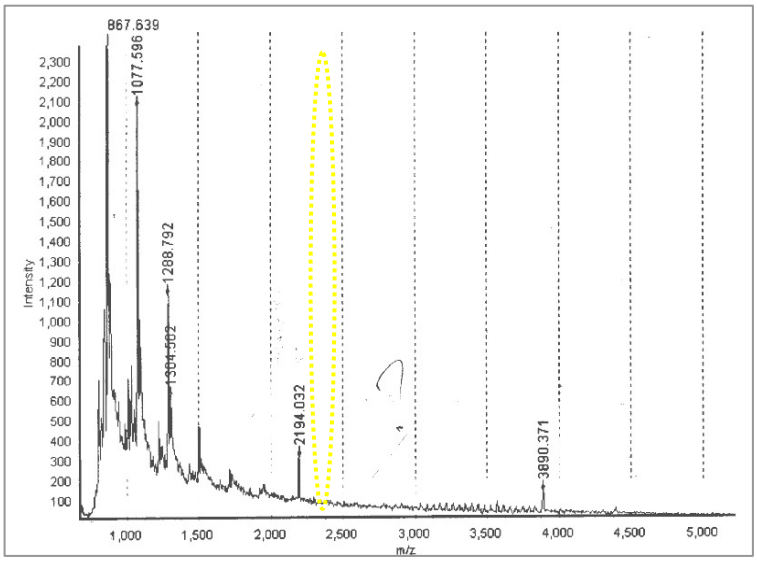

Figura 4 Controle de qualidade dos peptídeo 19 – o peptídeo utilizado no estudo piloto foi analisado por espectrometria de massa e não foi observado o pico correspondente á massa. (P19=2261)

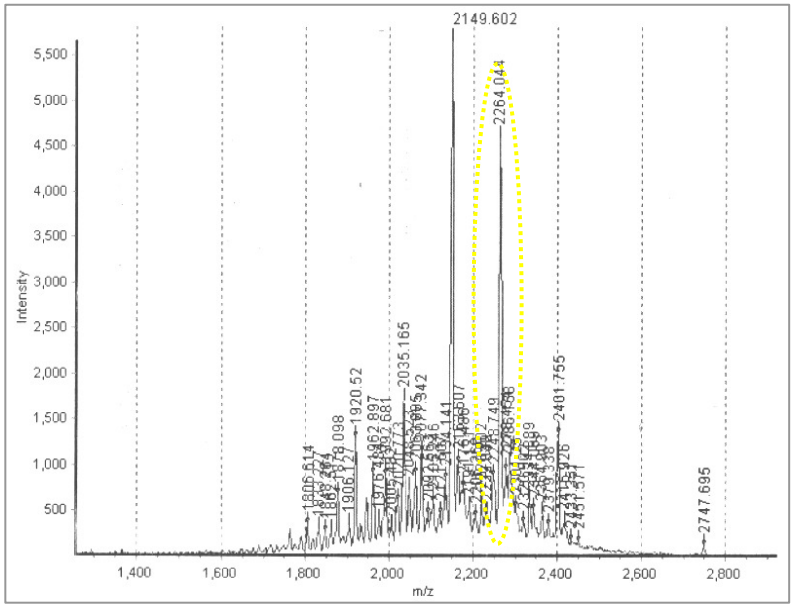

Figura 5. Controle de qualidade dos peptídeos 19 (re-sintetizados, InCor)- apresentaram os picos correspondentes quando analisados por espectrometria de massa.

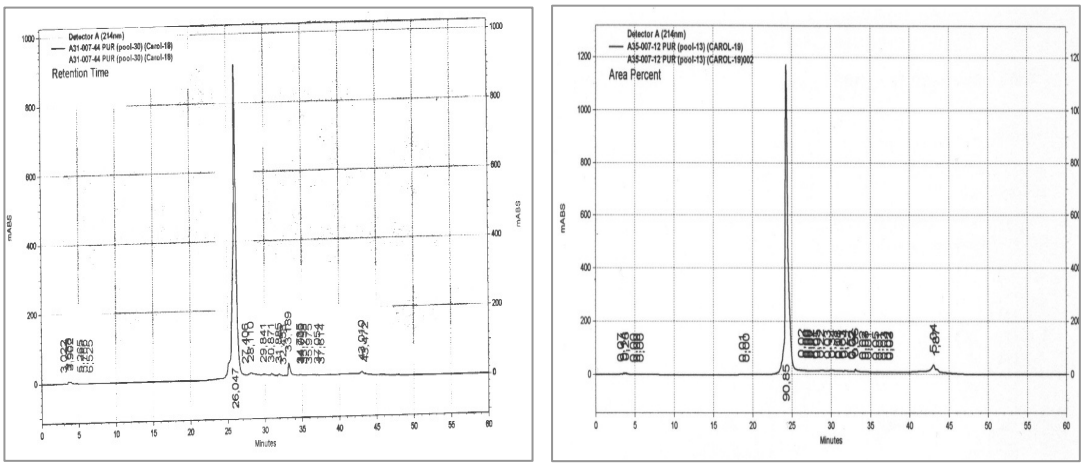

Figura 6 Análise do tempo de retenção pelo HPLC do peptídeo 19 (Incor e peptídeo 18 (estudo piloto). Quando comparados foi observado quase 1 minuto de diferença entre o tempo de retenção.

4.4. Teste utilizando peptídeos re-sintetizados

As amostras utilizadas no estudo piloto foram novamente testadas tanto com os novos peptídeos sintetizados quanto com os peptídeos do estudo piloto. Foi observada uma DO maior nos testes realizados com o peptídeo do estudo piloto incluindo o controle negativo quando comparados com os peptídeos re-sintetizados no InCor. (Figura 6).

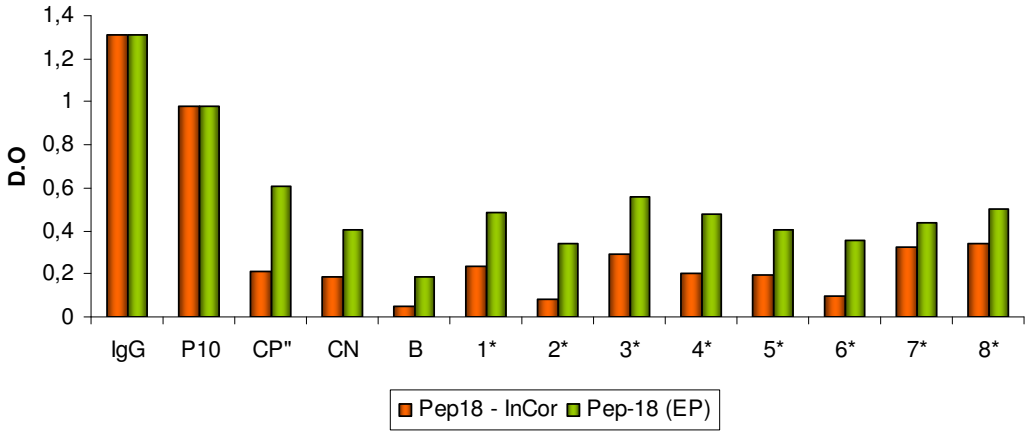

Figura 7. Teste comparativo entre pep-18 re-sintetizado (InCor) e pep-18 (estudo piloto) - IgG: placa sensibilizada com IgG, P10: soro reagente ao peptídeo 10 da miosina cardíaca; CN: soro não reagente ao peptídeo 10 da miosina cardíaca; B: branco; 1* a 8*: soros reagentes no estudo piloto , os soros foram testados na diluição de 1/50 contra o petídeo 18 da megalina.

Por fim, os testes foram realizados novamente no mesmo laboratório, sob as mesmas condições realizadas anteriormente no estudo piloto (protocolo, reagentes e operador) e ainda assim não foi encontrada nenhuma reatividade contra os peptídeos 18 e 19 da megalina. (Figura 7).

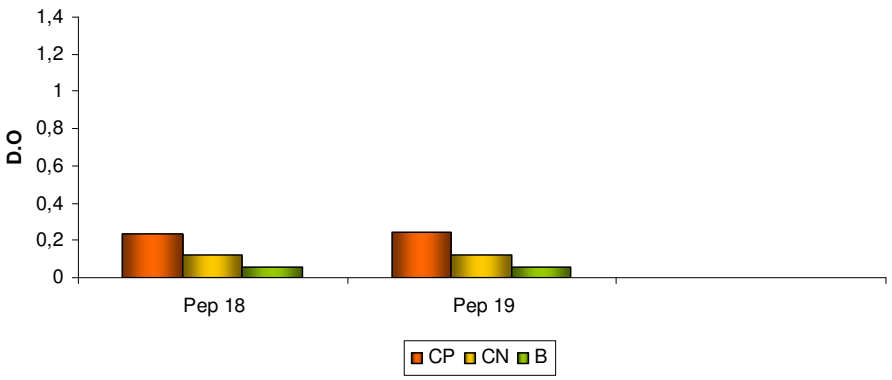

Figura 8 Repetição dos soros controle (estudo piloto); CP: soro reagente ao pep-18 e 19 da megalina; CN: pool de doadores renais e 1 B: branco; Os soros foram testados na diluição de 1/50 contra os pep-18 megalina.

4.5 Estruturas *reconhecidas pelos anticorpos anti-peptídeos 18 e 19*

Através da técnica de imunofluorescência indireta analisamos as estruturas renais reconhecidas pelos anticorpos anti-peptídeo 18 e 19. Esses anticorpos purificados, do isotipo IgG foram testados contra um corte de biopsia de doador renal vivo.

Foi observada reatividade específica nos túbulos renais quando foi testado o anticorpo anti-peptídeo 18. Já o anticorpo anti-petídeo 19 apresentou reatividade tanto contra túbulos renais, constituídos principalmente, por células epiteliais, como nos vasos, constituídos principalmente, por células endoteliais (Figura 8).

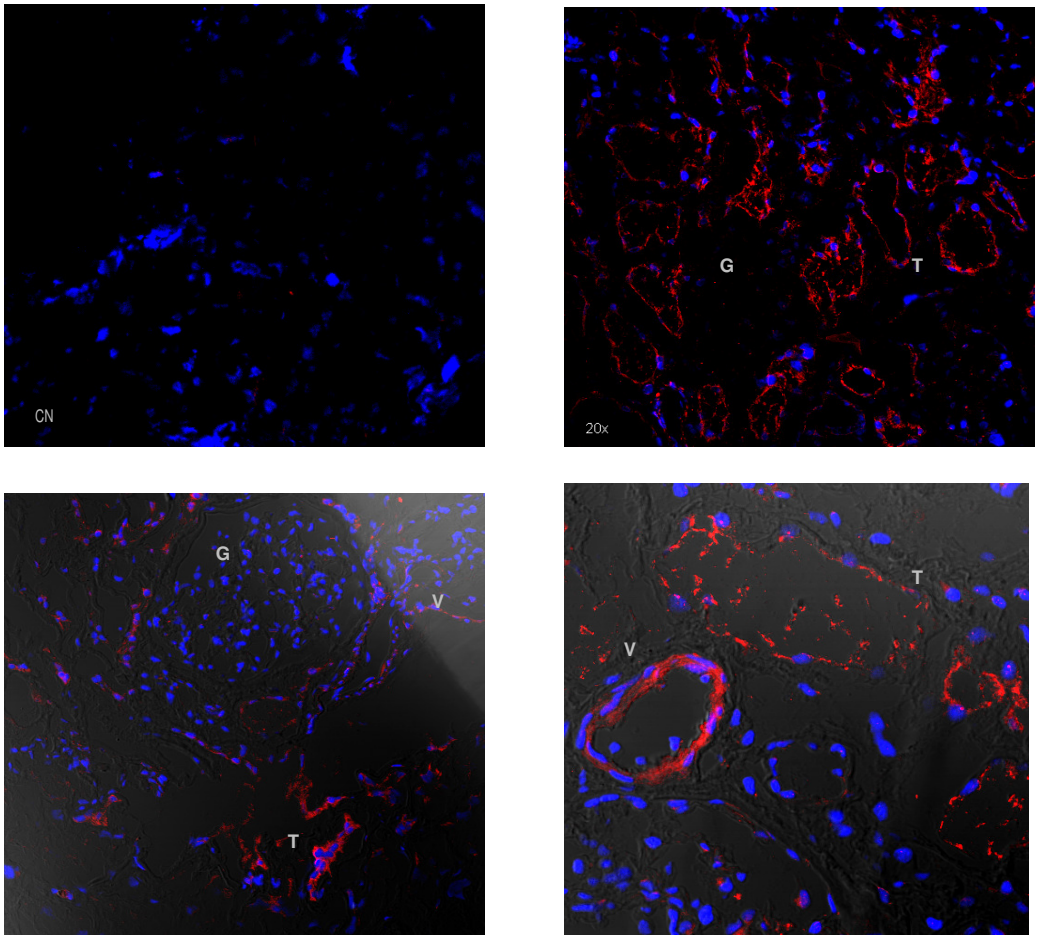

Figura 9. Teste para verificar estruturas renais reconhecidas pelos anticorpos anti-peptídeo 18 e 19 produzidos em coelho. Imunofluorescência indireta em corte histológico renal sadio utilizando conjugado IgG anti-coelho conjugado com alexa 596. (CN) Controle negativo: PBS. (G) glomérulo; (T) Marcação dos túbulos, (V) vasos. Foi utilizado DAPI para marcação nuclear. Aumento 20X.

4.6 Titulação do anticorpo anti-peptídeo 18 e do anticorpo secundário IgG conjugados com peroxidase (ELISA)

A partir dos resultados obtidos, ficou estabelecida a diluição de 1:5000 para o anticorpo anti-pep18 e 19 e 1:40.000 para o anticorpo anti-IgG-peroxidase de coelho.

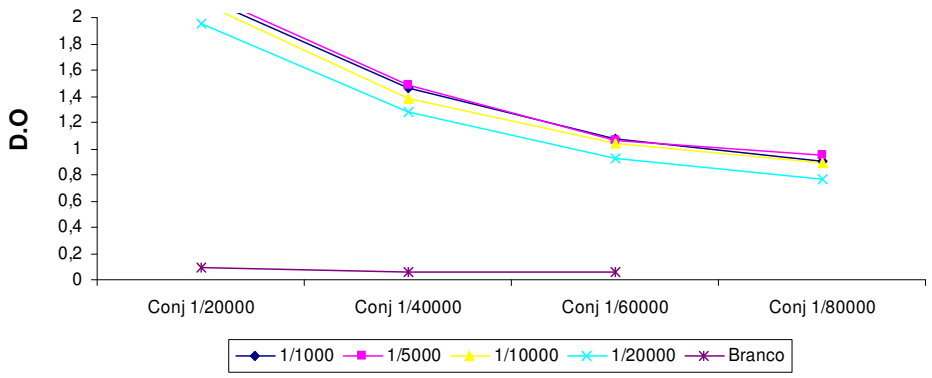

Figura 10. Titulação do anticorpo anti-peptídeo 18 e do anticorpo secundário IgG anti-coelho conjugado com peroxidase – os anticorpos anti-pep18 foram testados nas diluições: 1/1000, 1/5000, 1/10000 e 1/20000. A diluição estabelecida para uso foi de 1/5000. O conjugado IgG anti-coelho foi testado nas diluições de 1/20000, 1/40000, 1/60000 e 1/80000. Optamos por utilizar a diluição de 1/40000.

4.7 Pesquisa de reatividade inespecífica dos anticorpos anti-peptídeo da megalina contra o tampão de bloqueio (gelatina*)*

Verificarmos se os anticorpos anti-peptídeos 18 e 19 da megalina se ligavam inespecificamente ao tampão de bloqueio (gelatina), não foi observada ligação inespecífica desses anticorpos quando testados com a placa sensibilizada com gelatina.

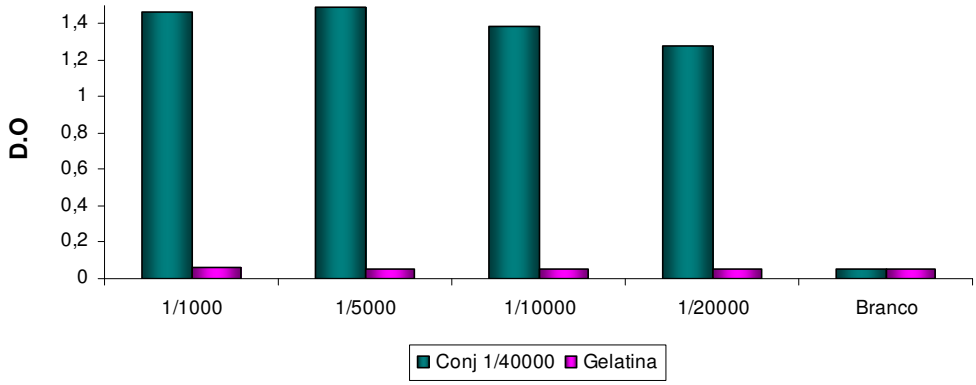

Figura 11. Pesquisa de ligação inespecífica dos anticorpos anti-peptídeo da megalina com a o tampão de bloqueio (gelatina): Os anticorpos anti-peptídeo 18 foram testados nas diluições 1/1000, 1/5000, 1/10000 e 1/20000 contra o peptídeo 18 e contra o tampão de bloqueio. Não foi observada ligação inespecífica desses anticorpos.

4.8 Pesquisa de anticorpos IgG e IGM anti-peptídeo 18 e 19 da megalina (soros pré-transplante)

Foi analisada a presença de anticorpos anti-peptídeo 18 e 19 em soros no momento pré-transplante dos 105 pacientes. Não foi detectada a presença de anticorpos do isotipo IgG nessas amostras.

Considerando que em nosso estudo utilizamos amostras de soro pré-transplante e que, em trabalhos anteriores do nosso laboratório, foi hipotetizado que a maioria dos anticorpos não-HLA eram, provavelmente, anticorpos naturais geralmente do isotipo IgM, fomos pesquisar também a presença de anticorpos anti-peptídeo 18 e 19 para esse isotipo.

Foi detectada a presença de anticorpos do isotipo IgM anti-peptídeo 18 em 33 (31,4%) amostras de soro pré transplante e anti-peptídeo 19 em 23 pacientes (21,9) Sendo que destes pacientes positivos, 8 apresentaram anticorpos tanto contra peptídeos 18 quanto 19.

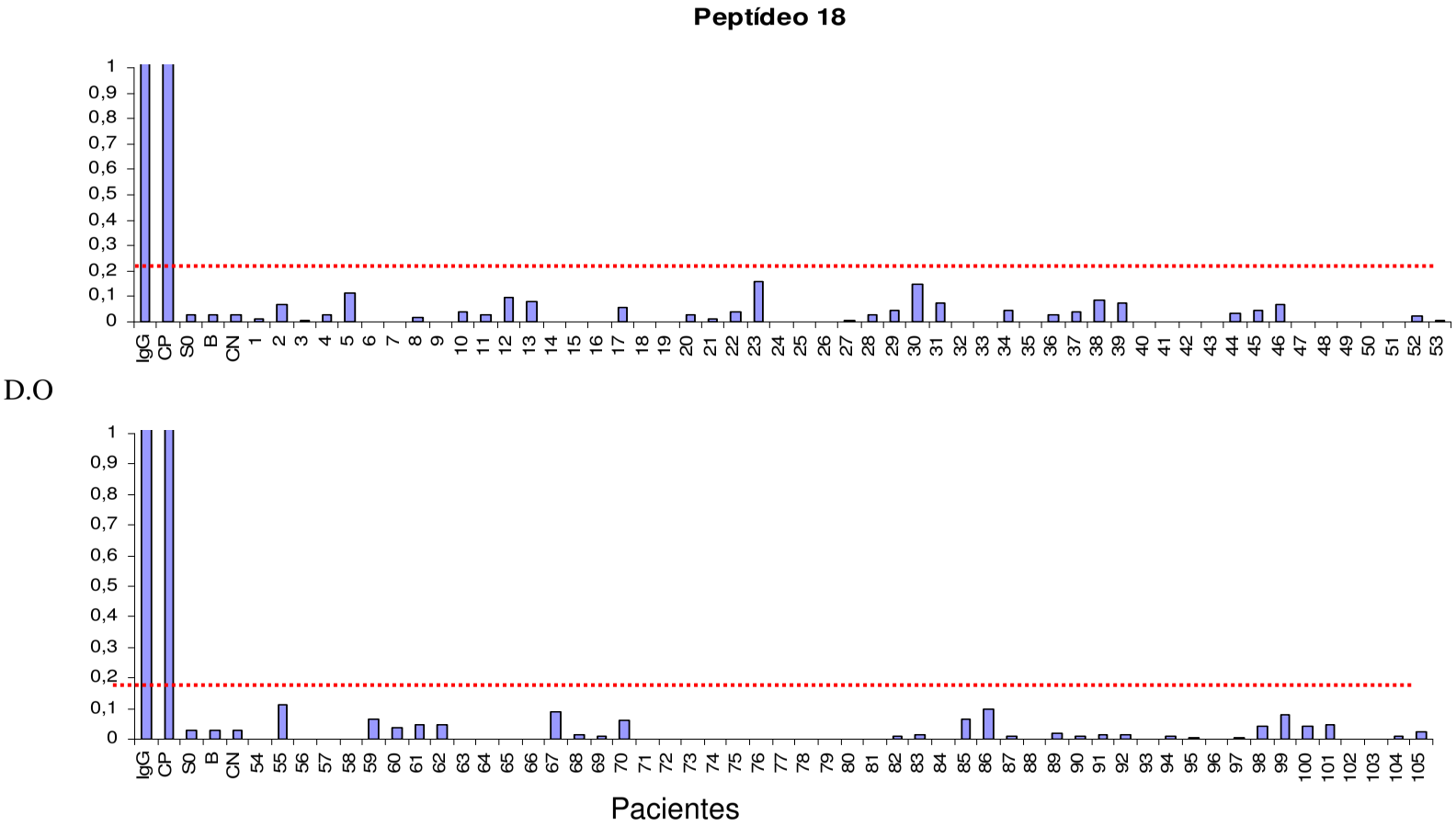

Figura 12. Pesquisa de Anticorpos anti-P18 da megalina contra soros pré-transplante de pacientes transplantados renais (IgG): IgG: placa sensibilizada com IgG; CP:anticorpo anti-P18; CN: pool de doadores renais; B: Branco; Amostras de soros pré-transplante. A diluição dos soros foi de 1/50 e a concentração do peptídeo: 15µg/ml. Cut-off = 0,150

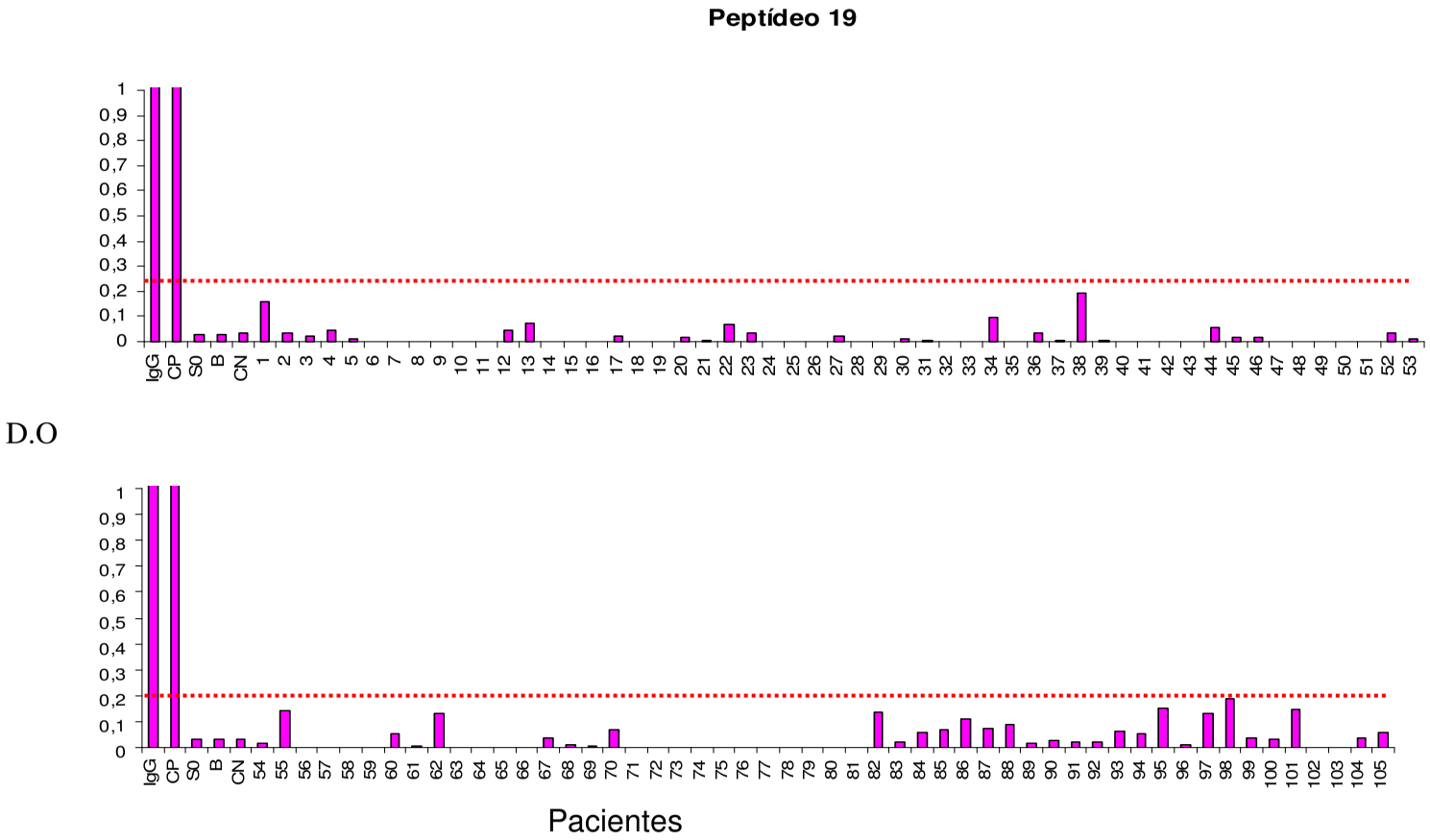

Figura 13. Pesquisa de Anticorpos anti-P19 da megalina contra soros pré-transplante de pacientes transplantados renais (IgG): IgG: placa sensibilizada com IgG; CP:anticorpo anti-P19; CN: pool de doadores renais; B: Branco; Amostras de soros pré-transplante. A diluição dos soros foi de 1/50 e a concentração do peptídeo: 15µg/ml. Cut-off = 0,188

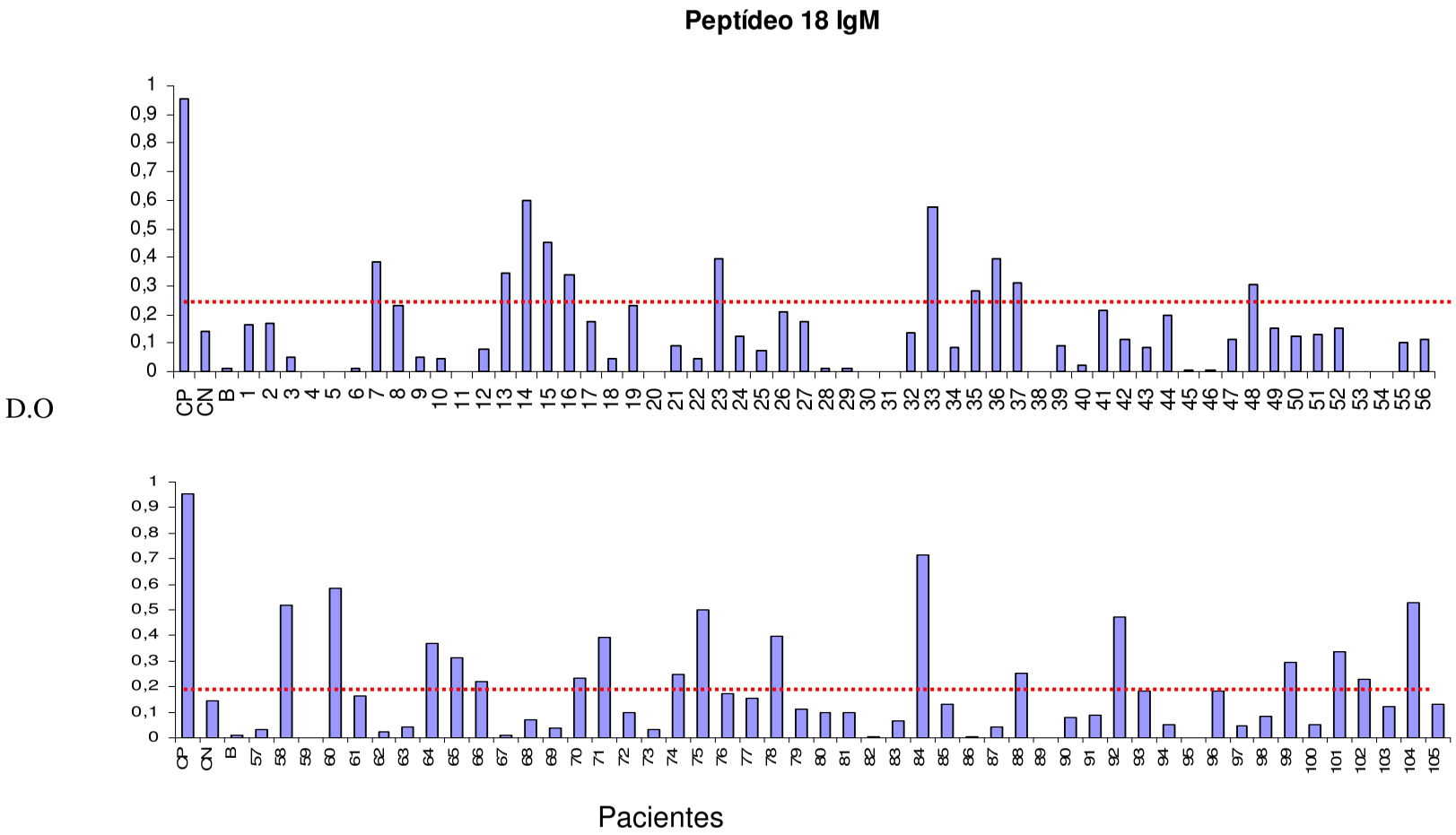

Figura 14. Pesquisa de Anticorpos anti-P18 da megalina contra soros pré-transplante de pacientes transplantados renais (IgM): Soros de pacientes lúpicos reagentes aos peptídeos 18 e 19; CN: pool de doadores renais; B: Branco; Amostras de soros pré-transplante. A diluição dos soros foi de 1/50 e a concentração do peptídeo: 15µg/ml. Cut-off = 0,194

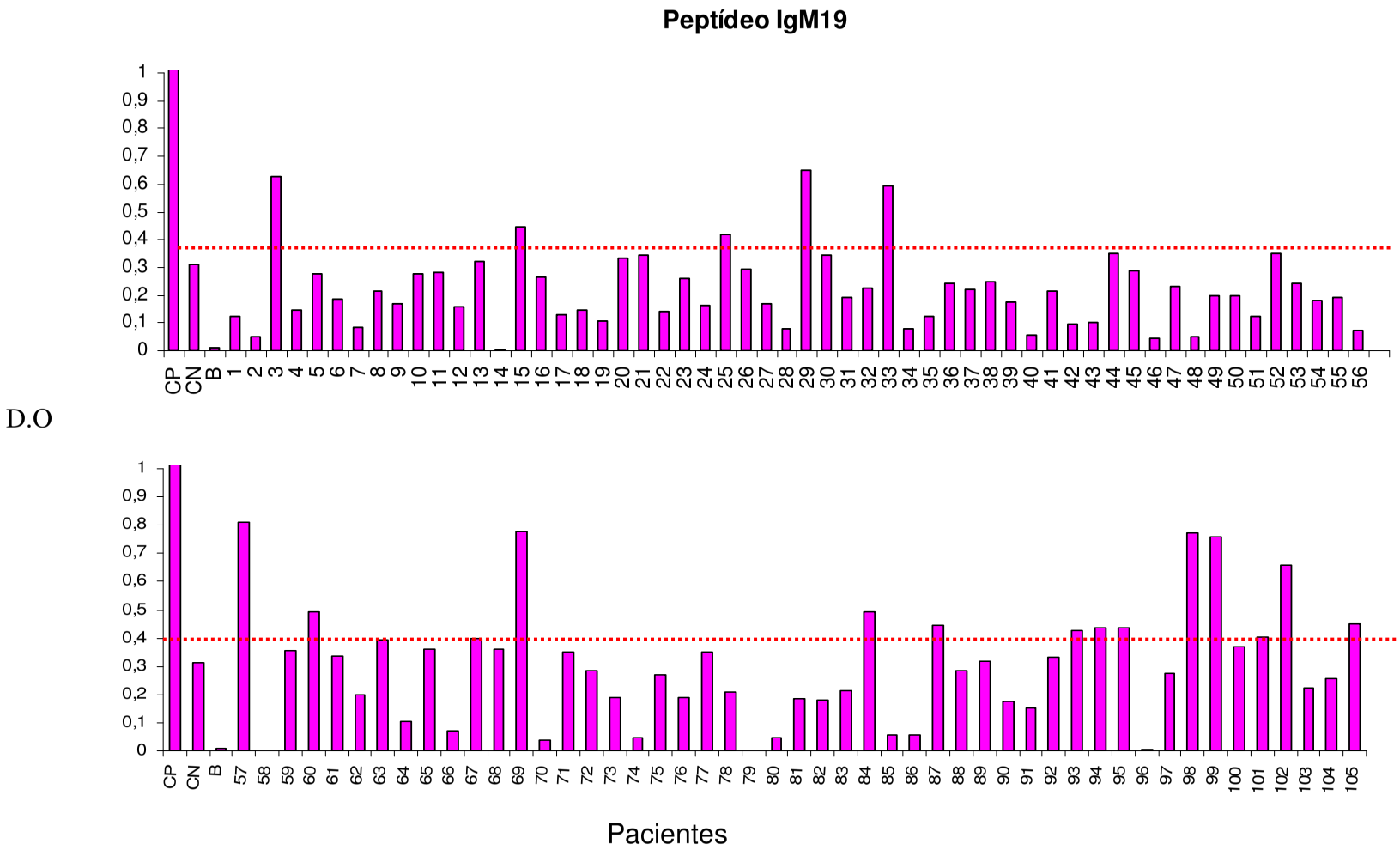

Figura15. Pesquisa de Anticorpos anti-P19 da megalina contra soros pré-transplante de pacientes transplantados renais (IgM): Soros de pacientes lúpicos reagentes aos peptídeos 18 e 19; CN: pool de doadores renais; B: Branco; Amostras de soros pré-transplante. A diluição dos soros foi de 1/50 e a concentração do peptídeo: 15µg/ml. Cut-off = 0,352

4.9 Dados demográficos e Clínicos dos pacientes positivos para o peptídeo 19

Uma vez encontrada positividade para anticorpos IgM, verificamos a possível associação desses pacientes com seus dados clínicos e demográficos. Porem, não foi observada nenhuma significância, quanto ao gênero, número de transplante, doença de base e tipo de doador para a presença de anticorpos anti-pep19.como mostrado na tabela 4.

Tabela 4. Dados demográficos e clínicos dos pacientes positivos para o peptídeo 19

Dados demográficos e clínicos		Pacientes 19pos (n=23)	Percentagem (%)	*P Value*
Gênero:	Feminio	13/57	22,8	ns
	Masculino	10/48	20,8	
Primeiro Tx		20/86	23,2	ns
Doença Renal Primaria	Glomerulonefrite Crônica	07/21	33,3	ns
	Nefropatia Diabética	02/08	25,0	ns
	Doença Renal policística	01/06	16,6	ns
	Pielonefrite Crônica	01/05	20,0	ns
	Nefropatia Lúpica	01/07	14,2	ns
	HAS	04/18	22,2	ns
	Sem Informação	04/18	22,2	ns
	Outras	03/22	13,6	ns
Tipo de Doador:	Vivo Aparentado	09/40	22,5	ns
	Vivo Não aparentado	02/18	11,1	
	Falecido	12/47	25,5	

Tx: transplante; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; ns: *p value* > 0,05

4.10 Soros reativos contra peptídeos 18 e 19 *vs* Rejeição

Para verificar a significância clínica dos AAM no transplante renal comparamos a presença destes anticorpos em um grupo de 42 pacientes com rejeição mediada por anticorpos e/ou células (Grupo I) e outro grupo de 63 pacientes que não tiveram episódios de rejeição.(Grupo II) O percentual de pacientes com anticorpos anti-peptídeo 18 foi semelhante nos dois grupos. (12/42, 28,5% Grupo I 21/63, 33,3% Grupo II; *p*=ns).

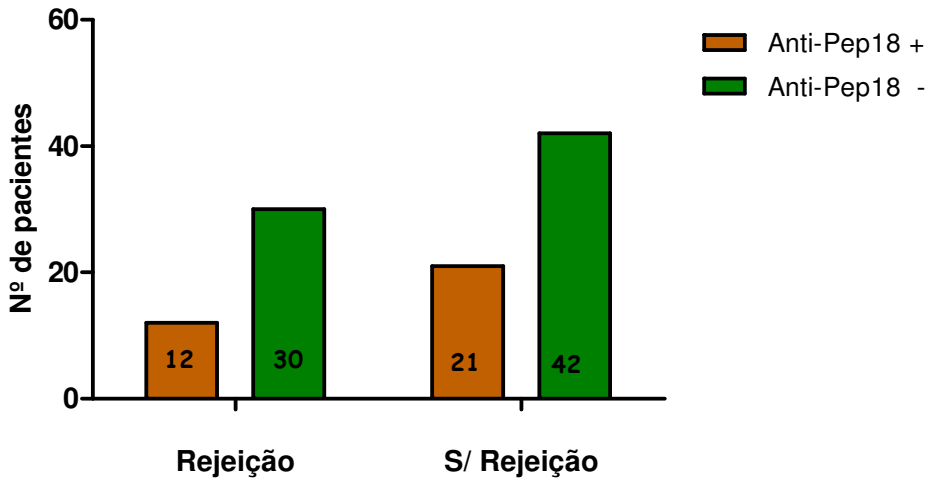

Figura 16. **Número de pacientes positivos e negativos para o peptídeo 18 nos grupos com e sem rejeição**. Dos 42 pacientes do grupo de pacientes com rejeiçã0, 12/42 (28,5%) apresentaram reatividade contra o peptídeo 18. No grupo sem rejeição, 21/63 (33,3%) apresentaram reatividade contra este peptídeo. p= ns (Teste Exato de Fisher)

Analisamos a significância clínica da presença de anticorpos anti-peptídeo 19 observamos que a maioria dos pacientes positivos para esses anticorpos pertenciam ao grupo I (17/42, 40,5%). Apenas 6 pacientes com estes anticorpos estavam no grupo II (6/63, 9,5%). Estes dados alcançaram uma elevada significância estatística (Teste exato de Fisher, p=0,0003)

evidenciando uma forte correlação entre presença de anticorpos anti-peptídeo 19 no soro pré-transplante e rejeição.

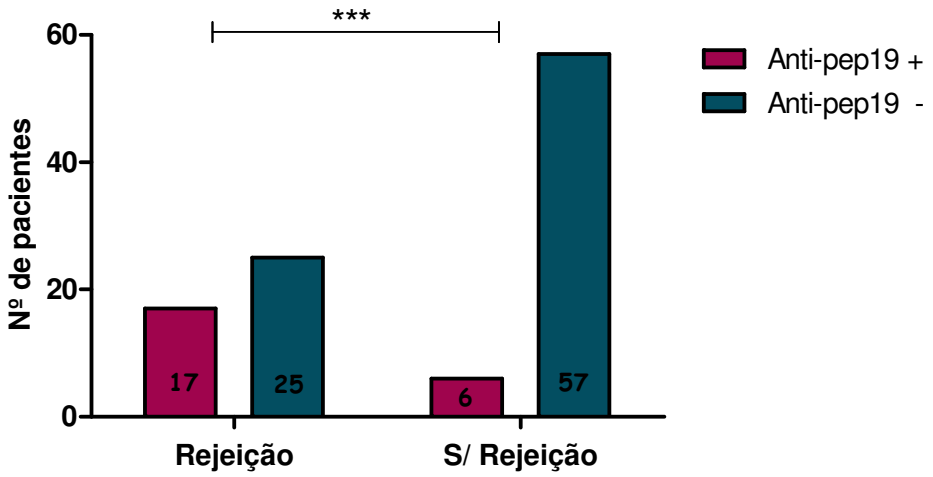

Figura 17. Número de pacientes positivos e negativos para o peptídeo 19 nos grupos com e sem rejeição. 17 dos 42 pacientes do grupo de rejeição foram positivos(40,5%) e 6 pacientes foram positivos para esse anticorpo no grupo de pacientes sem rejeição (6/63, 9,5%). p= 0,0003 (Teste exato de Fisher)

Em seguida, subdividimos o grupo de rejeições em: rejeição mediada por anticorpo (n=31) e rejeição exclusivamente celular.(n=11). O peptídeo 19 foi reconhecido por 13 pacientes do grupo RMA (13/31, 42%) e 7 no grupo sem rejeição (7/63, 11,1%). Esses resultados sugerem um valor preditivo para RMA (p=0,001).

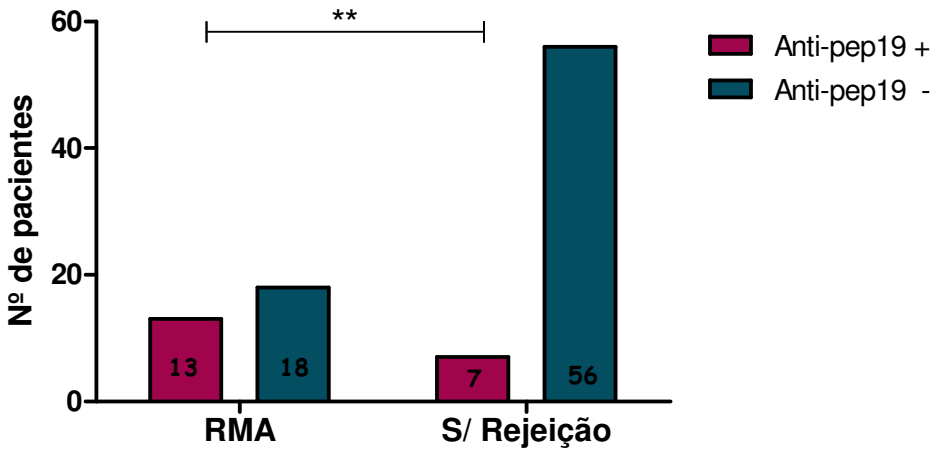

Figura 18. Número de pacientes positivos e negativos para o peptídeo 19 nos grupos com AMR e sem rejeição. O peptídeo 19, foi reconhecido por 13 pacientes do grupo AMR (42%) e 7 no grupo sem AMR (11,1%). p= 0,001 (Teste exato de Fisher).

No grupo de RMC, 4 pacientes apresentaram anticorpos anti-peptídeo 19 (4/11; 36,3%) e 6 (6/63; 9,5%) no grupo sem rejeição. Apesar desses resultados alcançarem uma significância estatística (p= 0,03), a maioria dos pacientes positivos estava no grupo II.

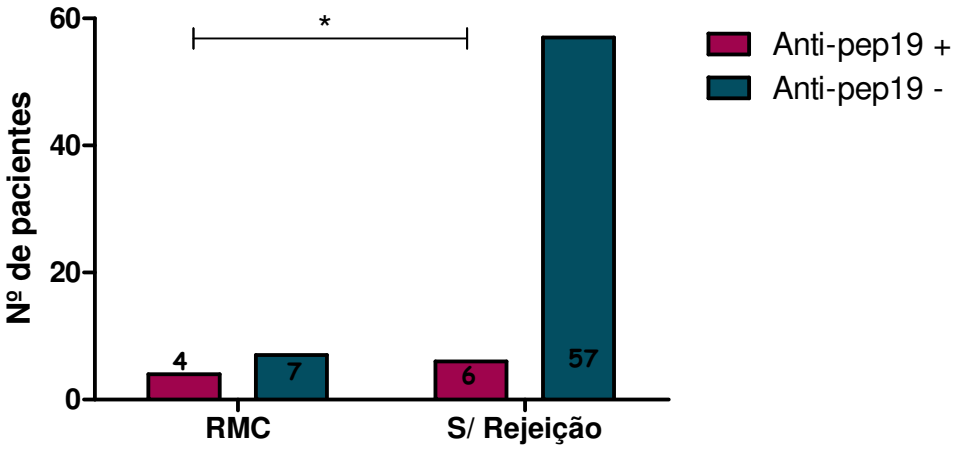

Figura 19.Número de pacientes positivos e negativos para o peptídeo 19 nos grupos com RMC e sem rejeição: (4/11, 36,3%) no grupo RMC e 6 (6/63, 9,5%) no grupo sem rejeição (p=0,03).

Analisamos separadamente o impacto na rejeição da presença exclusiva de anticorpo anti-peptídeo 18 , 19 ou quando ambos estavam presentes.

O peptídeo 18, foi reconhecido por 7 pacientes do grupo com rejeição (7/42; 16,6%) e 18 no grupo sem rejeição (18/63; 28,5%) e a presença exclusiva de anticorpo anti-peptídeo 19 foi encontrada em 12 pacientes do grupo I(12/42 28,5%) e 3 pacientes do grupo II (3/63 5%). Dos 8 pacientes que foram positivos para presença de ambos os peptídeos apresentar a maioria (5/42 12%) estava presente no grupo com rejeição e 3 (3/63 5%) no grupo sem rejeição.

As analises com presença exclusiva de anti-peptídeo 18 ou 19 apresentaram o mesmo impacto encontrado anteriormente.

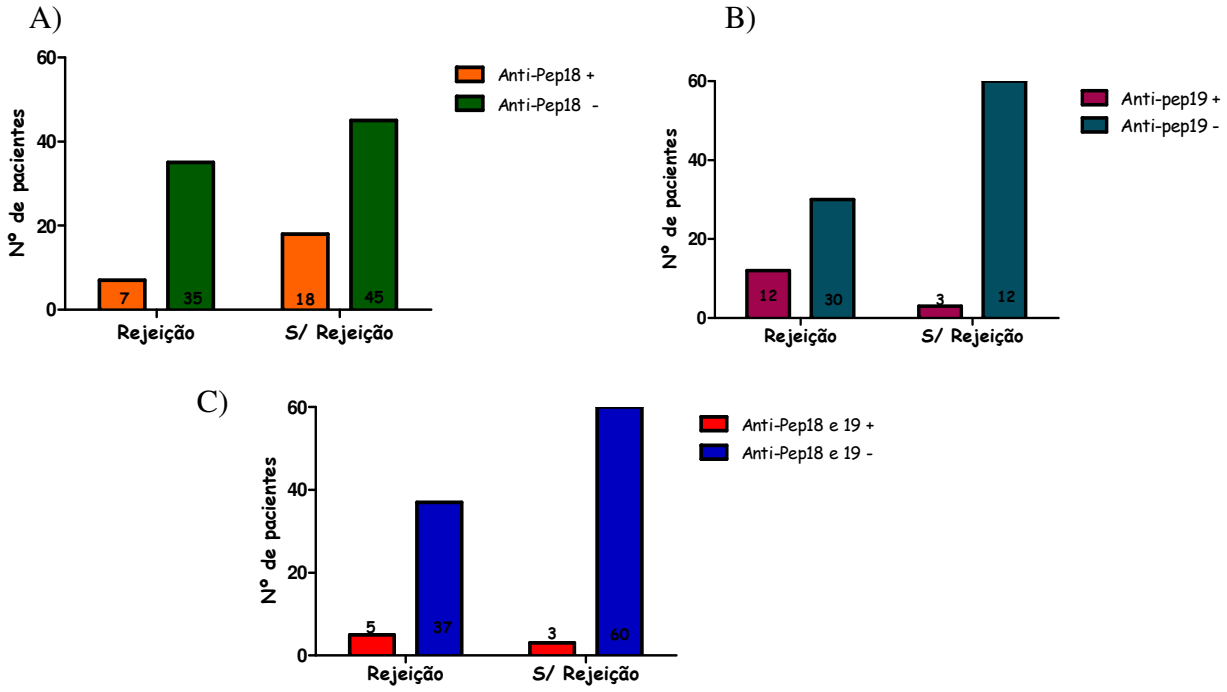

Figura 20 Pacientes com presença exclusiva de Anti-Pep18 (A); exclusiva de Anti-Pep19 (B); e presença de ambos os anticorpos (C).

Fomos verificar a presença de anticorpos anti-HLA nesse grupo de pacientes que apresentaram anticorpos anti-pep19 através do PRA. Observamos que dos 23 pacientes positivos para anticorpos anti-pep 19 16 (16/23; 69,5) apresentaram PRA=0 (14) ou PRA<5 (2).

Dos 23 pacientes com presença de anticorpos anti-peptídeo 19, 17 (74%) apresentaram episódios de rejeição. Destes 17, 11 (64,7%) pacientes foram transplantados com PRA=0 e 9 (9/11; 81,8%) continuaram com PRA=0 em amostras pré-rejeição.

Tabela 5. Características dos pacientes positivos para o P19

Pacientes	Data do Tx	Gênero	Nº de Tx	Tipo de Doador	Rejeição Aguda	C4d	Histologia	PRA pré-tx classe I	PRA pré-tx classe II	PRA pós-tx classe I	PRA pós-tx classe II
3	01/06/05	F	1	Vivo	SIM	Neg	Banff IA	00	00	00	00
15	13/07/05	F	2	Vivo	SIM	_	SI	93	92	71	25
25	24/08/05	F	1	Falecido	NÃO	Neg	SI	39	67	39	83
29	10/09/05	F	1	Falecido	SIM	Neg	Limitrofe	00	00	00	71
33	25/09/05	F	1	Vivo	NÃO	_	SI	00	00	_	_
57	28/01/06	M	2	Falecido	SIM	Pos	RMA	50	100	96	100
60	14/02/06	M	1	Vivo	NÃO	_	SI	00	00	_	_
63	21/02/06	F	1	Vivo	SIM	NC	BANFII	04	00	_	_
67	14/03/06	F	1	Vivo	NÃO	_	SI	00	00	00	00
68	15/03/06	M	1	Falecido	SIM	Neg	RMA	00	00	00	00
69	21/03/06	M	1	Vivo	NÃO	_	SI	00	00	_	_
71	22/03/06	M	1	Falecido	NÃO	_	SI	00	00	_	_
84	27/11/07	F	1	Vivo	SIM	Pos	Limitrofe	00	00	00	00
87	04/08/07	F	1	Falecido	SIM	Neg	RMA	64	83	60	31
93	06/05/08	M	1	Vivo	SIM	Pos	RMA	00	00	00	00
94	14/04/07	F	1	Falecido	SIM	Pos	Banff IA	53	41	71	100
95	24/07/07	F	1	Vivo	SIM	Pos	RMA	00	00	13	51
98	24/09/00	F	1	Falecido	SIM	_	RMA	00	00	00	00
99	11/12/01	M	1	Vivo	SIM	NC	RMA	00	00	00	00
100	20/10/00	M	2	Falecido	SIM	Neg	Banff II	20	00	_	_
101	13/03/00	F	1	Falecido	SIM	_	RMA	_	_	_	_
103	18/11/96	M	1	Falecido	SIM	Neg	Banff III	00	00	00	00
105	10/08/01	M	1	Falecido	SIM	Neg	Banff IIA	03	00	_	_

F: Feminino; M: Masculino; Tx: transplante; Pos: positivo; Neg: Negativo; SI; Sem informação; RMA: Rejeição mediada por anticorpo

Uma vez que incluímos em nossa casuística 14 pacientes que apresentaram episódios de RMA e 10 pacientes que perderam o enxerto por RMA (8 deles foram previamente estudados para presença de AECA) fizemos uma analise separadamente da casuística inicial de 81 transplantes consecutivos para evitar um viés nos resultados.

Destes 81 pacientes, 18 apresentaram algum episodio de rejeição (22,2%), sendo que nos 7 casos foram diagnosticadas como RMA (8,6%). O peptídeo 19, foi reconhecido por 6 pacientes do grupo de rejeição (6/18, 33,3%) e 6 de 66 (9,1%) no grupo sem rejeição. Esses resultados também apresentaram significância clínica (p= 0,02).

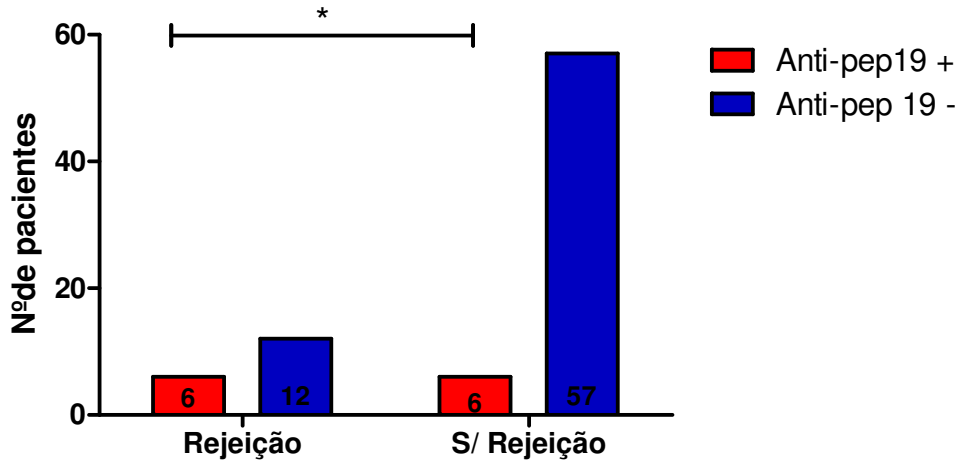

Figura 21. Pacientes com anticorpos anti- P19 na casuística de 81 transplantes consecutivos: O peptídeo 19, foi reconhecido por 6 pacientes do grupo AMR (6/18; 33,3%) e 6 no grupo sem AMR (6/66; 9,1%). p= 0,02 (Teste exato de Fisher)

4.11 Soros reativos contra peptídeo 19 vs C4d

Dos 31 pacientes com RMA, 25 tinham resultado de C4d. Nove (9/31, 36%) apresentavam C4d negativo e 16 dos 25 (64%) foram positivos. Quando comparamos a presença de anticorpo anti-peptídeo 19 observamos que 5/9 (55%) estavam presentes no grupo de pacientes com C4d negativo e 4/16 (25%) no grupo de C4d positivo, implicando em uma possível participação de anticorpos não HLA.

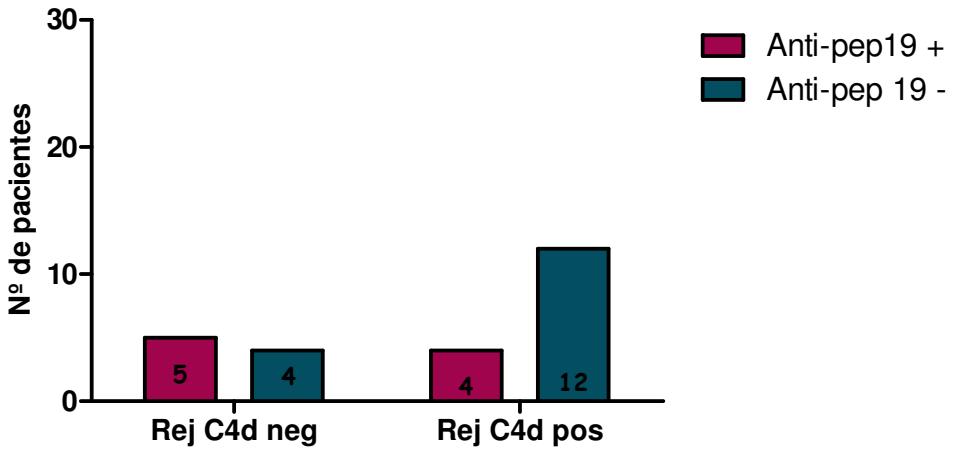

Figura 22. Número de pacientes positivos e negativos anti-P19 nos grupos com C4d pos e C4d neg - Em 25 dos 31 pacientes com AMR foi realizada pesquisa de C4d. Destes, 9 pacientes apresentavam anticorpos anti-peptídeo 19 da megalina sendo que 4 deles foram positivos para o grupo de C4d pos e 5 para o grupo de C4d neg. (p=ns)

4.12 Soros reativos contra peptídeo 19 vs perda da função renal

Dos 105 pacientes 19 (18%) apresentaram perda de função renal. Destes 19, 9 (47,3) foram positivos para a presença de anticorpos anti-pep 19. (p=0,005). Interessante notar que a maioria desses pacientes perdeu o enxerto devido RMA. A tabela 6 representa a duração do enxerto e a presença ou não de peptídeos 18 e 19 nos pacientes que perderam o enxerto por RMA

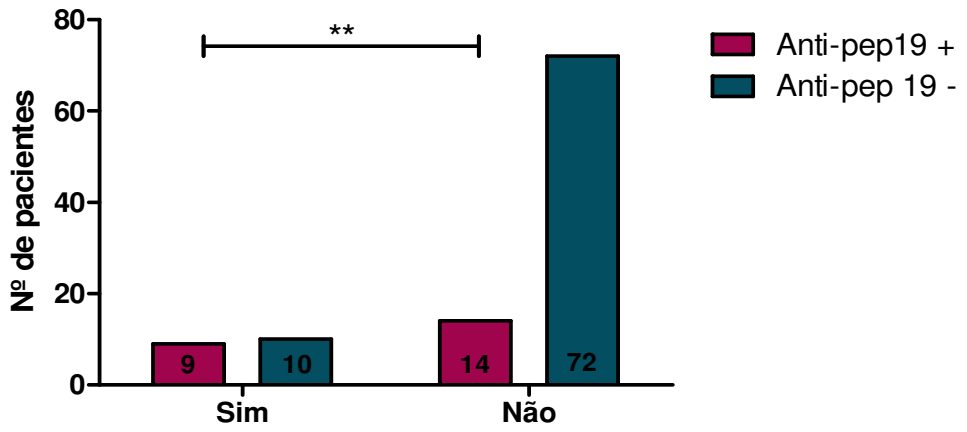

Figura 23. Número de pacientes positivos e negativos anti-P19 nos grupos com perda do enxerto por RMA.; Sim: perda; Dos 19 pacientes que apresentaram perda de função renal, 9/19 (47,3%) foram positivos para a presença de anticorpos anti-pep 19.e 14/86 (16,2) foram positivos no grupo sem perda (p=0,005).

Tabela 6. Característica dos pacientes que perderam o rim

Pacientes	Anti-pep18	Anti-pep19	Duração do enxerto (d)	Causa da perda
9	NEG	NEG	18 d	RMA
49	NEG	NEG	107d	SI
57	NEG	POS	60d	RMA
83	NEG	NEG	140	RDB
86	NEG	NEG	83	SI
88	POS	NEG	360	RDB
92	POS	NEG	300	SI
93	NEG	POS	23	RMA
94	NEG	POS	38	RMA
96	NEG	NEG	15	RMA
97	NEG	NEG	9	RMA
98	NEG	POS	10	RMA
99	POS	POS	2	RMA
100	NEG	POS	65	RDB
101	POS	POS	16	RMA
102	POS	POS	4	SI
103	NEG	NEG	65	RMA
104	POS	NEG	4	RMA
105	NEG	POS	58	RMA

Pos: positivo; Neg: Negativo; d: dias; SI; Sem informação;
RMA: Rejeição mediada por anticorpo

4.13 Comparações entre reatividade no pré-transplante vs pós-transplante (anti-pep19 IgM)

Fomos analisar também, além de soro pré-transplante, soro pós - transplante até 5 dias antes da rejeição de 10 pacientes que tiveram rejeição mediada por anticorpo e observamos que 3 pacientes foram positivos para o peptídeo 19 no pré-transplante. Destes 2 tornaram-se negativos no pós-transplante e um ficou na região limítrofe. Um paciente foi negativo no pré-transplante e tornou se positivo no pós-transplante 2 dias antes da rejeição.. Esse paciente evoluiu com perda do enxerto e foi a óbito 1 mês depois do diagnóstico de AMR e a ausência de C4d nos capilares peritubulares na biopsia sugere a presença de anticorpos-não HLA que na sua maioria não fixa complemento.

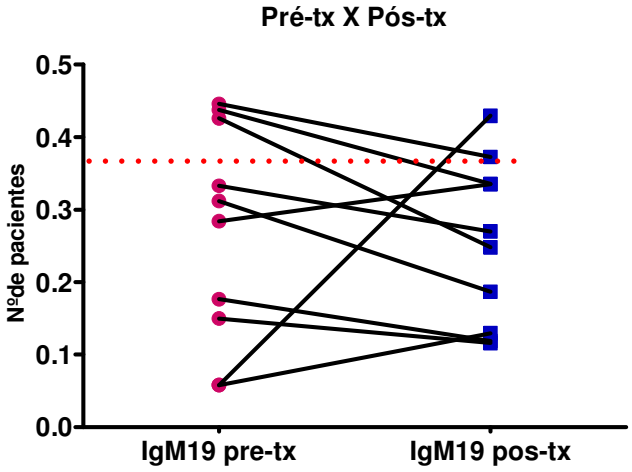

Figura 24. Comparação entre reatividade no pré-transplante vs pós-transplante Pep19 (IgM). Foram testados 10 soros de pacientes com AMR nos momentos pré e pós-transplante. Destes 10 pacientes, 3 foram positivos no soro pré-transplante. Dos 3 positivos, 2 tornaram-se negativos no momento pós-transplante e 1 foi boderline. O soro de um paciente tornou-se positivo no pós 2 dias antes da rejeição

Discussão

5. DISCUSSÃO

Uma das linhas de pesquisa de nosso laboratório é direcionada ao estudo de resposta humoral contra antígenos não-HLA que pudessem interferir no enxerto, principalmente antígenos da VEC. KALIL *et al.,*(1989), demonstraram que pode ocorrer rejeição vascular irreversível em pacientes que receberam enxertos provenientes de irmãos gêmeos HLA idênticos com prova cruzada negativa. Em trabalho de tese desenvolvido por Macaúbas em 1991, foi evidenciada a presença de anticorpos citotóxicos (IgG e IgM), contra antígenos da célula endotelial, nos soros dos pacientes transplantados renais e que haviam perdido o enxerto devido à rejeição humoral. Em outro estudo, Lucchiari *et al.,*(2000), detectaram anticorpos do isotipo IgM em 8/9 dos eluatos provenientes dos enxertos dos pacientes com rejeição vascular aguda. Analise por citometria de fluxo comprovada por RT-PCR, demonstrou que os AECA ativaram as células endoteliais através do aumento da expressão das moléculas de adesão VCAM-1, ELAM-1 e ICAM-1 (Lucchiari e*t al.,* 2000). Em outro trabalho do nosso grupo foram detectados anticorpos anti-célula endotelial em 9 de 11 eluatos obtidos de rins nefrectomizados após perda da funcionalidade devido a rejeição mediada por anticorpo. A ausência de anticorpos anti-HLA e anti-MICA foi comprovada através de testes de fase sólida. Em 7 dos 11 casos, foi possível realizar retrospectivamente a pesquisa de C4d. Todos apresentaram resultados negativos implicando o envolvimento de anticorpos não-HLA que não fixam o complemento. Os eluatos foram testados contra

cortes histológicos de 6 rins sadios, utilizando o método da imunofluorescência indireta. Em 9 casos foi detectada intensa fluorescência nos glomérulos e endotélio arterial, mas não foi verificada reação contra a cápsula de Bowman e apenas 1 caso foi positivo para o epitélio tubular.

Este estudo por sua vez, originou-se de um estudo anterior realizado em nosso grupo que teve como objetivo a caracterização dos determinantes antigênicos reconhecidos por estes anticorpos não-HLA. Eluatos positivos para AECA, foram testados contra uma biblioteca de peptídeos (CX_7C) pela técnica de Phage display. A analise das sequências geradas mostrou uma forte reação dos eluatos testados contra 27 peptídeos com forte homologia à megalina. Esses 27 peptídeos foram sintetizados e em seguida utilizados para testar através da técnica de ELISA novos eluatos renais positivos para AECA. Foi observada uma forte reatividade destes eluatos contra 2 dos 27 peptídeos. Esses dois peptídeos, convencionalmente denominados peptídeo 18 e peptídeo 19 da megalina, foram selecionados para ulteriores estudos.

Neste estudo, foi pesquisada retrospectivamente em 105 pacientes transplantados renais, a presença de anticorpos anti-peptídeos 18 e 19 pertencentes a megalina em amostras de soro pré-transplante. Entretanto, diferentemente do que foi encontrado no estudo piloto, não foi observada nenhuma reatividade nesses soros testados para o isotipo IgG. Vários testes foram realizados afim de reproduzirmos resultados do estudo piloto. Acreditamos que os peptídeos utilizados no estudo anterior possam ter sido degradados ao logo do tempo, uma vez que não observamos o pico correspondente à megalina através da técnica de HPLC.

Considerando que não existem estudos envolvendo a megalina no transplante clínico, não sendo possível assim contar com dados da literatura e controles apropriados, nós providenciamos a produção de anticorpos específicos para o peptídeo 18 e 19.

Com a obtenção dos anticorpos fomos verificar através da técnica de imunofluorescência indireta as estruturas reconhecidas pelos anticorpos anti-peptídeo 18 e 19 do isotipo IgG em biopsia de doador renal. Foi detectada reatividade específica nos túbulos renais quando testado o anticorpo anti-peptídeo 18. É importante ressaltar que no tecido renal a megalina esta fortemente expressa nas células epiteliais dos túbulos proximais reforçando a probabilidade que esse peptídeo pertença à megalina. Entretanto, quando fomos analisar os anticorpos anti-peptídeo 19 observamos reatividade tanto nos túbulos, quanto nos vasos. Esses dados sugerem uma provável reatividade cruzada que ocorre quando dois antígenos compartilham o mesmo epitopo reconhecido pelo anticorpo. Neste caso, o epitopo correspondente ao peptídeo 19 da megalina presente nas células epiteliais dos túbulos pode ser compartilhado com um outro antígeno presente em uma célula, provavelmente endotelial. São necessários estudos de co-localização para confirmar esta hipótese.

Nenhuma reatividade foi encontrada no glomérulo para ambos os anticorpos. Vale salientar que em humanos a megalina não está expressa nos glomérulos. (Saito *et a*l.,2010)

Após esses resultados decidimos nos distanciarmos do estudo piloto,

o qual foi baseado principalmente em amostras biológicas pós-transplante (eluatos). Em trabalhos anteriores em nosso laboratório foi hipotetizado que os anticorpos não-HLA detectados eram provavelmente anticorpos naturais geralmente IgM. Considerando que em nosso estudo utilizamos soros pré-transplante decidimos pesquisar também anticorpos do isotipo IgM. Foi detectada a presença de anticorpos do isotipo IgM anti-peptídeo 18 em 33 (31,4%) amostras de soro pré transplante e anti-peptídeo 19 em 23 (21,9%), sendo que 8 destes positivos reconheciam tanto o peptídeo 18 quanto o 19.

Para verificar a significância clínica destes anticorpos no transplante renal comparamos a presença de anticorpos anti-peptídeo 18 e 19 em um grupo de 42 pacientes com rejeição (Grupo I) e outro grupo de 63 pacientes que não tiveram episódios de rejeição.(Grupo II). O percentual de pacientes com anticorpos anti-peptídeo 18 foi semelhante nos dois grupos. (14/42 28,5% GrupoI; 21/63 33,3% GrupoII; p=ns). Não foi encontrada uma correlação entre a presença de anticorpo 18 e rejeição.

A maioria dos pacientes com anticorpos anti-peptídeo 19 pertenciam ao grupo I (17/42, 40,5%). Apenas 6 pacientes com estes anticorpos estavam no grupo II (6/63, 9,5%). Estes dados, alcançaram uma elevada significância estatística (Teste exato de Fisher, p=0,0003) evidenciando uma forte correlação entre presença de anticorpos anti-peptídeo 19 no soro pré-transplante e rejeição. Nós acreditamos que esta correlação seja devida ao fato que o anticopo anti-peptídeo 19 reconhece alem das células epiteliais dos túbulos, células provavelmente endoteliais dos vasos. Estas, sendo notoriamente os alvos principais de RMA.

Dados semelhantes foram encontrados quando subdividimos o Grupo I em rejeição mediada por anticorpo e rejeição exclusivamente celular. A análise com presença exclusiva de anticorpo anti-peptídeo 19 apresentou o mesmo impacto encontrado anteriormente. Quando analisamos a reatividade exclusivamente contra o peptídeo 18 verificamos um notável aumento do número de pacientes positivos para este peptídeo no grupo sem rejeição (7/42 16,6%; 18/63 28,5% GrupoII). Apesar deste dado não ter alcançado significância estatística merece uma especial atenção em estudos futuros.

A detecção de depósitos de C4d na superfície de capilares peritubulares é geralmente usada como marcador para RMA e é associada com uma menor sobrevida do enxerto. Entretanto, 40-50 % de rejeições graves com danos vasculares são C4d negativas implicando no envolvimento de anticorpos não-HLA e não-fixadores de complemento. (ref)

Uma vez que parte dos anticorpos não-HLA não ativam complemento nós fomos verificar a presença desses anticorpos em relação a presença ou não de depósitos de C4d nas biopsias de pacientes com RMA. Observamos que 55% (5/9) dos pacientes com anti-peptídeo 19 estavam presentes no grupo com C4d negativo (5/9 grupo I 55,5% e 4/16 25% grupo II). Alem disso, todos os pacientes positivos para o peptídeo 19 apresentaram PRA pré e pós-transplante negativo nesse grupo, implicando na possível participação de anticopos não-HLA. Esses dados são semelhantes aos obtidos por Dragun et al, (2005) na pesquisa de anticorpos anti-receptor da angiotensina II Tipo I (AT1R). Eles reportaram a presença destes anticorpos em 16 pacientes transplantados renais com RMA grave

associada com hipertensão maligna nos quais não foram detectados anticorpos HLA. Dos 16 pacientes, apenas 5 apresentaram deposito de C4d em biopsia. Vale a pena ressaltar que os alvos antigênicos de ambos os anticorpos (AAM e AT1R) estão principalmente situados em células epiteliais. (Hosojima *et a*l., 2009)

Esses trabalhos evidenciam a dificuldade de caracterizar, segundo os critérios de Banff, a RMA não-HLA não detectáveis com as PC convencionais e nem através do C4d sendo que, parte deles não ativa o complemento. Por essa razão é muito importante identificar os anticorpos não-HLA, determinar a especifidade antigênica, tentar esclarecer os mecanismos patogênicos através dos quais eles contribuem na rejeição.

Neste estudo nós também pesquisamos a presença de AAM em 10 amostras de soro pós-transplante até 5 dias antes da RMA. Observamos que 3 pacientes foram positivos no pré-transplante. Destes, 1 permaneceu positivo no pós-transplante, 1 tornou-se negativo e um ficou na região limítrofe. Hipotetizamos que nos últimos 2 casos os anticorpos tenham sido absorvidos pelo enxerto. Interessantemente, um paciente foi negativo no pré-transplante e tornou se positivo no pós-transplante 2 dias antes da rejeição. Esse paciente evoluiu com perda do enxerto e foi a óbito 1 mês depois do diagnóstico de RMA, e a ausência de C4d nos capilares peritubulares na biopsia sugere o envolvimento de anticorpos-não HLA. Para explicar esse caso, vale a pena salientar que o peptídeo 19 apresenta um polimorfismo. Apenas 10% da população é 19 e 90% é 19*. Nós suspeitamos que pode ter ocorrido uma alo-sensibilização. Para confirmar

essa hipótese será necessário fazer a genotipagem entre o par doador/receptor para os peptídeos 19 e 19*.

Como já mencionando, não existem na literatura estudos envolvendo a megalina no transplante clínico.

Recentemente Fang *et al.*, (2009) em modelo experimental de tranplante renal, observaram que a injeção de extrato de rim autologo, mas não alogenico, poderia induzir uma resposta imune preferencial à megalina. Na fase aguda foi observada uma resposta celular especifica à linfócito T enquanto que em ratos tratados com CD28 para prolongar a sobrevida do enxerto houve resposta humoral contra a megalina. Apesar das diferenças substanciais nos trabalhos, ambos mostram um provável envolvimento da megalina na imunobiologia do transplante renal.

No campo da autoimunidade, a presença de AAM foi descrita em algumas doenças tais como doenças autoimunes sistêmicas e tireoidite autoimune. (Ooka *et al.*, 2003; Marniò *et al.*,1999) Nós não encontramos diferenças significativas quando comparamos a presença de AAM e doenças de base incluindo algumas doenças autoimunes.

Em conclusão, AAM exclusivamente do isotipo IgM podem ser detectados em soros pré-transplante. Acreditamos que a maioria deles são autoanticorpos não podendo excluir a presença também de aloanticorpos em pacientes candidatos a re-transplante considerando o polimorfismo do peptídeo 19. Somente anticorpos contra este peptídeo apresentaram correlação com a rejeição. Esses dados produzidos pela primeira de um lado abrem um novo capitulo na pesquisa de anticorpos envolvidos na RMA e do

outro precisam de ulterior confirmação e um maior aprofundamento . É cada vez mais evidente a necessidade de pesquisar os anticorpos não-HLA cujo envolvimento na evolução do enxerto renal assume, com o progredir dos estudos, proporções inesperadas. Terasaki reportou que 38% da perda do enxerto renal durante os primeiros 10 anos é devida a anticorpos não-HLA e somente 18% por anticorpos anti-HLA. (Terasaki,2003)

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- Apenas anticorpos do isotipo IgM foram detectados nos soros pré-transplante
- Apenas anticorpos anti-P19 apresentaram correlação com Rejeiçã0 Aguda
- Ac anti-P 18 reconheceram apenas túbulos e ac anti-peptídeo 19 reconheceram túbulos e vasos

7. PERSPECTIVAS

- Aumentar a casuística (pré e pós-transplante nos momentos de rejeição)
- Verificar a presença desses anticorpos no momento da rejeição
- Testar os soros contra o peptídeo 19*
- Fazer tipificação do par receptor/doador para o p19 e 19*
- Avaliar presença do P18 e P19 na rejeição crônicas
- Testar os soros com a proteína recombinante
- Estudar o tipo de lesão vascular ou outras formas de rejeição do enxerto
- Estudar o papel da IVIg nesses anticorpos

Referências

8. REFERÊNCIAS

Afzali B, Lechler RI, Hernandez-Fuentes MP. Allorecognition and the alloresponse : clinical implications. *Tissue Antigens* 2007; 69(6): 545-56.

Azzazy HM, Highsmith WE Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem*. 2002 Sep;35(6):425-45

Birn H, Willnow TE, Nielsen R, Norden AG, Bonsch C, Moestrup SK, Nexo E, Christensen EI. Megalin is essential for renal proximal tubule reabsorption and accumulation of transcobalamin-B(12).*Am J Physiol Renal Physiol*; 2001; 282(3):F408-16.

Castro MCR, Panajotopoulos N, Araújo LM, Rodrigues H, Maciel R, Ronda C, Viggiani CS, Nahas WC, David-Neto E, Ianhez LE, Kalil JE, Glotz D. Renal transplantation using living donors with a positive crossmatch: can we predict efficacy of desensitization with IVIG by an “in vitro” test? *Transplantation* 2004; 78 (2): S1: 258.

Cecka JM. The UNOS renal transplant registry. *Clin Transpl* 2002: 1-20.

Cerilli GL, Clarke J, Abrams A, Brasile L. Overview; significance of vascular endothelial cell antigen. *Transplantation proceedings* 1987;19: 4469-4471,

Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. Am J *Physiol Renal Physiol.* 2001 Apr;280(4):F562-73. Review

Colvin RB, Cohen AH, Saiontz C *et al*. Evaluation of pathologic criteria for acute renal allograft rejection: reproducibility, sensitivity and clinical correlation. *J Am Soc Nephrol*; 1997; 8:1930-41.

Colvin RB. The pathogenesis of vascular rejection. *Transplantation Proceedings* 1991; 23(4): 2052-2055,

Crespo M, Federico O, Jean PV, Manuel P. Treatment of humoral rejection in kidney transplantation *Transplantation* 2006; 20: 95-103 Reviews

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

Denton MD, Davis SF, Baum MA, Melter M, Reinders MEJ, Exeni A, Samsonov DV, Fang J, Ganz P, Briscoe DM. The role of the graft endothelium in transplant rejection: evidence that ,endothelial activation may serve as a clinical marker for the development of chronic rejection. *Pediatric Transplantation* 2000, 4:252-260

Doukas J, Pober SJ. IFN-δ enhances endothelial activation induced by tumor necrosis factor but not IL-1. Journal immunology, 145:1727-1733, 1990

Dragun D, Müller DN, Bräsen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelha M, Dechend R, Kintscher U, Rudolph B, Hoebeke J, Eckert D, Mazak I, Plehm R, Schönemann C, Unger T, Budde K, Neumayer HH, Luft FC, Wallukat G. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med*. 2005; 6:558-69.

Fang C, Ballet C, Dugast AS, *et al*. Autoimmune responses against renal tissue proteins in long-term surviving allograft recipients. *Transpl Int*. 2009 11:1091-9.

Feucht HE, Schneeperger H, Hillbrand G. Capillary deposition C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney In*t 1993; 43: 1333-38.

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

Hernandez-Fuentes MP, Warrens AN, Lechler RI. *Immunologic monitoring*. Immunol Rev.2003;196:247-64

Herzenberg AM, Gill JS, Djurdjev O, Magil AB. C4d deposition in acute rejection: an independent long-term prognostic factor. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:234-41.

Hosojima M, Sato H, Yamamoto K, Kaseda R, et al. Regulation of megalin expression in cultured proximal tubule cells by angiotensin II type 1A receptor- and insulin-mediated signaling cross talk. *Endocrinology* 2009; 2:871-8.

Jiang S, Herrera O, Lechler RI. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol*. 2004 Oct;16(5):550-7. Review.

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

Jordan SC, Vo AA, Peng A, Toyoda M, Tyan D.Intravenous gammaglobulin (IVIG): a novel approach to improve transplant rates and outcomes in highly HLA-sensitized patients. *Am J Transplan*t. 2006 Mar;6(3):459-66. Review.

Kalil J, Guilherme L, Neumann J, Rosales C, Marin M, Saldanha L, Chocair PR, Ianhez LE, Sabbaga E. Humoral rejection in two HLA-identical living related donor kidney transplants. *Transplantation proceedings* 1989; 21: 711-713,

Kamoun M. Cellular and molecular parameters in human renal allograft rejection. *Clinical Biochemistry* 2001; , 34: 29-34,

Kazatchkine MD, Kaveri SV. Immunomodulation of autoimmune and inflammatorydiseases with intravenous immuneglobulin.*N Engl J Med*. 2001 Sep 6;345(10):747-55. Review.

Kerjaschki D, Farquhar MG: The pathogenic antigen of Heymman nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border*. Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982; 18:5557-61

Lanir. N, Zilberman. M, Yron. I, Tennenbaum. G, Shechter. Y, Brenner. Reactivity patterns of antiphospholipid antibodies and endothelial cell of antiendothelial antibodies on cell B migration. *J. Lab Clin Med* 1998, 131(6):548-56,

Lee. KH, Cho HJ, Kim HS, Lee WJ, Lee. S, Bang D. Activation of extracellular signal regulated kinase 1/2 in human dermal microvascular

endothelial cells stimated by anti-endothelial cell antibodies sera of patients with Behcet`S disease. *J. Dermatol Sci* 2002; 30(1):63-72,

Lucchiari N, Panajotopoulos N, Xu C, Rodrigues H, Ianhez LE, Kalil J. Antibodies eluted from acutely rejected renal allografts bind to and activate human endothelial cells. *Human Immunology* 2000; 61: 518-527,

Macaúbas CIP. Anticorpos antiendotélio e rejeição humoral de transplantes renais. São Paulo, 1991.95p. (Dissertação de mestrado-Instituto de ciências Biomédicas da Univ de São Paulo).

Marinò M, Chiovato L, Friedlander JA, Latrofa F, Pinchera A, McCluskey RT. Serum antibodies against megalin (GP330) in patients with autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab*.1999; 84(7):2468-74.

Mauiyyedi S, Crespo M, Collins AB et al.,. Acute humoral rejection in kidney transplant: II. Morfology immunopathology and pathologic classification. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 779-87.

Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant*. 2004; 4(8):1289-95.

Meroni P, Ronda N, Raschi E, Borghi MO Humoral autoimmunity against endothelium: theory or reality? *Trends Immunol*. 2005 May; 26(5):275-81. Review.

Moraes JR, Stastny P. Allo-antibodies to endothelial cell antigens. In: Histocompatibility Testing. *Copenhagen Munksgaard* 2000; 391-397

Morell A. Various immunoglobulin preparations for intravenous use.*Vox Sang.* 1986;51 Suppl 2:44-9.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986;136(7):2348-57.

Nankivell BJ, Chapman JR.Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions.*Transplantation.* 2006 Mar 15;81(5):643-54. Review.

Nickeleit V, Mihatsh MJ. Kidney transplants, antibodies and rejection: is C4d a magic marker*? Nehrol Dial Transp* 2003; 18: 2232-39.

Ooka S, Matsui T, Nishioka K, Kato T. Autoantibodies to low-density-lipoprotein-receptor-related protein 2 (LRP2) in systemic autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(3):R174-80.

Page C, Rose M, Yacoub M, and Pigott R. Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. American Journal of Pathology 1992; 141: 673-683,

Panajotopoulos N, Silva RA, Rodrigues H, Oliveira ZN, Fukumori LM, Ianhez LE, Nahas W, Kalil J. Clinical significance of skin crossmatch in kidney transplantation. *Tranplantation Proceedings*1999; 31(7): 2982-2983,

Paul LC, Baldwin WM, Van LA. Vascular endothelial alloantigens in renal transplantation. *Transplantation*, 1985:40:117-123

Perrey C, Brenchley PEC, Johnson RWG and Martin S. An association between antibodies specific for endothelial cells and renal transplant failure. *Transplant Immunology* 1998;6:101-106

Pober, Jordan S, Orosz, Charles G, Rose, Marlene L, Savage, Caroline O.S. Can graft endothelial cells initiate a host anti-graft immune response? *Transplantation* 1996; 61(3):343-349,

Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloram PF, Campbell PM, Fogo A, Glotz D, Magil AJ, Montgomery R, Nickeleit V, Trpkov et al.,. Antibody Mediated Rejection Criteria - an Addition to the Banff 97 Classification of Renal Allograft Rejection. *Am J Transplantation* 2003; 3: 708-14.

Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, and Dammacco F. Endothelial cell heterogeneity and organ specificity. *Journal Of Hematotherapy & Stem Cell Research* 2002;11: 81-90,

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

Ronda C; Glotz, D; Ianhez, LE; Rodrigues, H; Ferreira, SCP; Souza P; Viggiani C; David NE; Castro MCR; Kalil J; Panajotopoulos N. N. Early loss of renal allografts caused by non-hla antibodies reactive with endothelial cells. *Transplantation*. 82(1) Suppl 3 WTC Abstracts:362, July 15, 2006.

Rose ML Endothelial cells as antigen-presenting cells: role in human transplant rejection. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1998; 54:965-978,

Rose ML, Yacoub MH. Heart transplantation: cellular and humoral immunity. *Spring Semin Immunopathol*.1989;11(4):423-38

Saito A, Pietromonaco S, Loo AKC, Farquhar MG. Complete cloning and sequencing of rat gp330/megalin, a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Nat Acad. Sci* 1994; 91:9725-9729

Saito A, Sato H, Iino N, Takeda T. Molecular mechanisms of receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubular epithelium. *J Biomed Biotechnol*. 2010: 403272

Secretaria Estadual de Saúde do Estado de São Paulo. Sistema Estadual de Transplantes. Sobrevida atuarial dos enxertos renais, Estado de São Paulo, no período de julho 1998 a dezembro de 2009. http://www.saude.sp.gov.br/

Sheresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their tatgets? *Current opnion in immunology* 1998; 10(5):581-7

Smith GP, Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985, 228 (4705): 1315-1317.

Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE. 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.

Song. J, Park. YB, Lee. WK, Lee. KH, Lee. SK. Clinical associations of anti-endothelial cell antibodies in patients systemic lupus erythematosus. *Rheumatol int* 2000; 20(1):1-7,

Souza PS. *Relevância da monitorização dos anticorpos anti-HLA após o transplante renal: estudo clínico e anatomopatológico*. São Paulo, 2008. 99p (tese de doutorado- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Sumitran-Karuppan S, Tyden G, Reinholt F, Berg U, Moller E. Hyperacute rejections of two consecutive renal allografts and early loss of the third transplant caused by non-HLA antibodies specific for endothelial cells. *Transplant immunology* 1997 4:321-7.

Terasaki PI, Ozawa M, Castro R. Four-year follow-up a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am J Transplant*. 2007; 7(2):408-15.

Terasaki PI. Deduction of the fraction of immunologic and non-immunologic failure in cadaver donor transplants. *Clin Transpl.* 2003:4: 49-52.

Tillou X, Poirier N, Le Bas-Bernardet S, Hervouet J, Minault D, Renaudin K, Vistoli F, Karam G, Daha M, Soulillou JP, Blancho G. Recombinant human C1-inhibitor prevents acute antibody-mediated rejection in alloimmunized baboons. *Kidney Int*. 2010 Mar 24

Victor WM. The endothelium: vascular control of haemostasis. European *Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2001; 95: 198-201

Wang CR, Liu MF, Tsai RT, Chang CY, Chen CY. Circulating intercelular adhesion molecules-I and autoantibodies incluing anti-endothelial cell anti-cardiolipin, and anti-neutrophil cytoplasma antibodies in patients with vasculitis. *Clini Rheumatol* 1993;12:375-380

Wecker H, Auchincloss H Jr. Cellular mechanisms of rejection. *Curr Opin Immunol.* 1992 Oct;4(5):561-6

Yammani RR, Sharma M, Seetharam S, Moulder JE, Dahms NM, Seetharam B. Loss of albumin and megalin binding to renal cubilin in rats results in albuminuria after total body irradiation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 Aug;283(2):R339-46.

Zou Y, Stastny P, Susal C, Dohler B, Opelz G. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection *N Engl J Méd* 2007 27;357(13):1293-300.

Zwirner NW, Dole K, Stastny P. Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. *Hum Immunol*. 1999 Apr;60(4):323-30