

RAFAEL TRINDADE BURTET

**ANÁLISE DO PERFIL DE REATIVIDADE DO REPERTÓRIO
DE ANTICORPOS DE INDIVÍDUOS TRANSPLANTADOS**

**Brasília/DF
Dezembro de 2012**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular

RAFAEL TRINDADE BURTET

ANÁLISE DO PERFIL DE REATIVIDADE DO REPERTÓRIO
DE ANTICORPOS DE INDIVÍDUOS TRANSPLANTADOS

Brasília/DF
Dezembro de 2012

RAFAEL T. BURTET

**ANÁLISE DO PERFIL DE REATIVIDADE DO REPERTÓRIO
DE ANTICORPOS DE INDIVÍDUOS TRANSPLANTADOS**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor pelo curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular do departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília/UnB.

Área de concentração:
Imunologia Molecular

Orientador:
Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Co-orientadora:
Prof^a. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

**Brasília/DF
Dezembro de 2012**

RAFAEL T. BURTET

**ANÁLISE DO PERFIL DE REATIVIDADE DO REPERTÓRIO
DE ANTICORPOS DE INDIVÍDUOS TRANSPLANTADOS**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor pelo curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular do departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília/UnB.

Data da apresentação: 19 de dezembro de 2012

BANCA EXAMINADORA

- Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido
Universidade de Brasília - Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)
Laboratório de Biologia Molecular
Orientador - Presidente da Banca
- Prof. Dr. Antônio Francisco Pereira de Araújo
Universidade de Brasília - Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)
Laboratório de Biofísica
Membro interno do programa de pós-graduação
- Profa. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca
Universidade de Brasília – Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)
Laboratório de Imunologia
- Dr. Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira
Beth Israel Deaconess Medical Center
Harvard Medical School
Membro externo
- Profa. Dra. Rosangela Vieira de Andrade
Universidade Católica de Brasília
Pós-graduação em ciências genômicas e biotecnologia
Membro externo
- Profa. Dra. Tainá Raiol
Universidade de Brasília - Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)
Laboratório de Bioinformática (Lab. de Biologia Molecular)
Suplente

Este trabalho é dedicado em memória dos meus queridos avós Honézio e Olga Burtet, que deixaram este plano enquanto meu doutorado ainda estava em andamento, não tenho palavras pra descrever o tamanho da saudade que sinto e como foram importantes na minha criação, infância e juventude. Muito do que sou hoje devo a vocês, pelos valores, integridade de caráter e conduta como homem e como pessoa.

AGRADECIMENTOS

Começar por onde quando tenho tanto pra agradecer? Nesse caminho sofrido de pós-graduação, compreendido por poucos, onde muitos são os tropeços e dificuldades, e as vitórias são comemoradas aos poucos, quase em doses homeopáticas. Mas também não é esta desgraça toda, é um preço pequeno a ser pago quando estamos correndo atrás de um sonho. Por isso começo agradecendo a tia Marisa, que de alguma forma subconscientemente, lá em 1998, colocou na minha cabeça de recém graduando que a pós-graduação era o caminho a ser traçado. Obrigado pelos conselhos, pelas conversas e pelas caronas.

Agradeço imensamente aos meus orientadores, Dr. Marcelo de Macedo Brígido e Dra. Andréa Queiroz Maranhão, por tudo que vocês tem feito por mim nesses quase dez anos de convivência, em uma relação que além de profissional tem muita amizade e confiança. Por terem acreditado no meu potencial e me deixado absorver um pouco de tudo que vocês têm pra ensinar. Espero ter sido merecedor de sua confiança e de alguma forma ter superado suas expectativas.

Aos colegas de Lab 01, Kelly Simi você é dez, tens uma alma fantástica sempre disposta a ouvir e ajudar, sem você essa bagaça não funciona direito, não nos abandone nunca. Maryani Bezerra esta pessoa que não se decide se é implicante ou desagradável (rs), este laboratório não teria a mesma graça sem você (sim, escrevi a mesma coisa no agradecimento do mestrado). Bárbara, grande amiga, fizemos a seleção juntos, prorrogamos a defesa juntos, e vamos defender na mesma semana, ta bom já né?!? Fernanda Siqueira, esposa do Lindo, sua presença é diversão garantida. Isabel Sousa, uma das pessoas mais tranquilas que conheci, é bom demais trabalhar com você Bel, tu transmites uma paz de espírito só de estar no mesmo ambiente. A nossa pós doc Bielorrussa Galina Gulis, vulga G2, que figura incrível, sempre com um comentário bem colocado, nem que seja em uma língua que a gente não entende. As estagiárias seguidoras da G2, as G-girls, Andressa, Priscila e Renata, força meninas, vocês chegam lá. Herdson, o bombeiro mais alucinado que já conheci. Tarcila a doidinha de Votuporanga. Carol Rezende, a boa filha a casa torna, foi como mestre voltou como pós doc. Obrigado pessoal! Todos vocês contribuíram de alguma forma para este trabalho.

A minha estagiária Fernandinha Bento, por aguentar as minhas loucuras e ainda conseguir me acompanhar nesse final de doutorado, mesmo brigando comigo o tempo todo te adoro Fê, relaxa que dá tudo certo no final.

Maria Paula minha maninha postiça, Deus te colocou no meu caminho por algum motivo muito especial, já passamos por tanta coisa juntos e muito mais ainda está por vir, cuida bem do nosso projeto, agora é contigo, sei que ele está em boas mãos. Espero que nossos caminhos nunca se afastem, mas se por acaso isso acontecer, desejo que tua vida seja tão maravilhosa como foi na mente de Deus

quando ele te criou. Tu és iluminada, tua energia contagia as pessoas, nunca deixe esta chama se apagar e teu sorriso esmorecer.

A todos os colegas que foram desbravar novos horizontes. Flávia Caixeta nossa ruiva patrimoniada que perdeu sua placa de patrimônio e foi atrás da felicidade. Wanessa Carvalho, sempre abalando com o seu projeto panicat, Yuri Oliveira parceiro de X-Box360, não sobrou ninguém pra conversar sobre os lançamentos de games. Janaína De Paula, parceria do SBI - Foz do Iguaçu defendeu e sumiu né peça rara, dios pire pra você. A todos os colegas do laboratório de imunologia molecular, que saíram e que chegaram o meu muito obrigado.

Aos colegas dos outros laboratórios. Marcus Teixeira, teu casório foi massa. Brunão, Fabiana Brandão, Fabiana Oliveira, Ana Karina, Amanda Lira, Viviane Yllena, Viviane Reis, Carol Brêttas, Osmar Oliveira (consultor ético), Bárbara Paes, Layane Crisóstomo, Ju amorin (e o maridão Isnard, grande amigo), Maritza Ocampo, Alyson Gomes. Valeu por tudo galera

Ao pessoal do laboratório de bioinformática, que sempre me ajudou quando precisei, principalmente ao Halian Vilela e ao Paulo Antônio Alvarez, que escreveram o sricpt utilizado neste trabalho, muito obrigado.

Aos meus amigos mais loucos, Robson Matos, meu brother maluco e alucinado, cantador dos mais tops tecnobregas possíveis e impossíveis de se encontrar, em contra partida frequentador assíduo do clube do choro, isso só pode ser um caso incorrigível de transtorno bipolar, mas Robson, nunca mude esse teu jeito cara. Marciano Rubini, falar que tu é meu irmão é redundância meu velho, tive que sair do sul pra achar outro gaúcho tão maluco quanto eu. Marcis, obrigado pelos teus conselhos sempre pé no chão, me trazendo pra realidade, nunca me deixando afundar nem flutuar demais, sempre com muita amizade e o chimarrão a tira-colo. Tu estiveste ao meu lado quando eu mais precisei e isso não tem preço. Daniel Paiva, te chamar de maluco é até elogio, mas com quem mais eu posso falar de partoba, mundo canibal e redublagens toscas. O nosso humor é muito “refinado” para o resto da população. Túlio César, mais um patrimoniado, e dos loucos o mais calmo, mas não era pra menos que o mineiro fosse o mais contido. Gil, antes parceiro de mestrado, agora de corrida. E até hoje ele não contou o que diabos quer disser a sibla MSU. Camilo Del Cistia, gordinho-mor, pesquisador e samurai, salvaste minha morada vindo pra Brasília durante meu doutorado-sanduche. Sempre nesta calma de dar inveja e um ataque cardíaco aos mais alucinados que nem eu. Thiago Sousa, cara sou teu fã, tu és exemplo de profissional e de pessoa, sempre disposto, tanto pra correr quanto pra beber. Zé Carlos, parceria de farra, mas na volta ta sempre dormindo. Alexandro Galdino, casou e vazou pra Divinópolis. Dedé, meu irmão de karatê, muito obrigado por ter me apresentado esta arte marcial fantástica, um dia eu alcanço a faixa preta. Kenninho, meu irmão de colina e parceria das festas e conselheiro. Galera, prefiro andar com os loucos do que com os falsos, até porque com os loucos eu me identifico mais.

Aos nossos queridos técnicos, sem vocês nosso trabalho seria bem mais complicado. Thompson Tomatieli, grande figura e chave mestra do laboratório de biologia molecular. Dona Fátima, a minha fôfis, e a Dona Ivanildes, ou Dona Violência, gosto de vocês demais da conta.

Aos demais professores do laboratório de Biologia molecular. Dra. Ildinete Silva-Pereira, Dr. Fernando Araripe, Dra. Janice De Marco, Dra. Lidia Pepe, Dra. Elida Campos, Dra. Maria Sueli, Dr. Márcio Poças. De alguma forma vocês contribuíram para minha formação, muito obrigado

As minhas gurias da católica, Lau Pavanelli, pessoa que dorme só de escorar a cabeça na cadeira e Nina Gasparini, professora particular de zouk, me aguarde que ainda vou aprender, meninas vocês são ótimas, adorei conhecê-las

Karlinha Santiago grande amiga e conterrânea do Sul e a sua turma de Sampa, Fran Knebel, Simone Sartoretto, Maria Menezes, Renée Oliveira, Luziane Belle, qualquer congresso depois do SBI/2012 não será do mesmo jeito sem vocês.

Lorena, nesses quatro anos de convívio aprendemos muita coisa juntos, você me ensinou a ver a vida de uma forma mais doce, mais leve e mesmo assim com intensidade, me mostrou que mesmo com esse mundo cheio de maldade ainda pode existir amor incondicional, pureza, sinceridade e respeito. Te levarei sempre em meu coração.

Aos amigos e colaboradores da Alemanha. A Dra Michal Orguil, que abriu as portas de seu laboratório em Berlim, pelo seu tempo disponibilizado no nosso trabalho em conjunto, e a todo o pessoal de sua equipe, Dr. Victor Greiff, Dra. Nicole Wittenbrink e Juliane Lück, todos ajudaram imensamente na realização do nosso estudo. Aos colaboradores de Potsdam, Katja Köhler e Dr. Harald Seitz.

Aos meus pais Búlgaros adotivos, a família Mustafa, foi bom demais ter encontrado esse teto pra ficar em Berlin, muito mais que um quarto pra dormir, ganhei uma família, espero que vocês estejam bem, melhor ainda seria poder reencontrá-los.

Aos amigos e irmãos da Uechi Ryu dojo de Berlin, Sensei Holger Massek, Sensei Kay Förster, Martin Wernecke, Antônio e os demais praticantes, se não tivesse treinado com vocês teria despirocado de vez, obrigado pela oportunidade, foi uma grande felicidade e um grande aprendizado.

Aos amigos, colegas e irmãos do Dojo do Sensei Kleber Bueno, muito mais que um mestre, você é um amigo pra todas as horas. Contigo aprendi o verdadeiro significado das palavras, força, honra, concentração, respeito, respiração e equilíbrio. O verdadeiro guerreiro não é aquele que nunca cai, mas aquele que sempre se levanta e continua. Obrigado por tudo.

Aos colaboradores de São Paulo, Dra. Verônica Coelho e ao Dr. Hernandez, pela ajuda despendida, pelas conversas, reuniões sempre acrescentando algo para o nosso trabalho.

E finalmente a minha família amada, aos meus pais que estão a 3.000 Km de Brasília, mas mesmo assim sempre perto, meu coração grita de saudades. Minha Mãe, Mari Lucia, minha bússola, minha âncora e minha rede de proteção. Você me

ensinou a viver e a amar, e nos encheu com tanto amor que agora a gente transborda por onde passa. Meu Pai, João Batista, meu exemplo, minha inspiração e meu herói, me ensinou sobre esta batalha diária que é a vida, com teu exemplo de garra e força, um incansável sempre “correndo atrás da máquina”. Caindo e levantado me mostrou como ser forte e ser correto, usando tuas palavras, “vai te embora que é barbada meu velho” te amo. Manno, meu pai postiço, que sempre me deu força e me criou como se fosse seu próprio filho, que foi a imagem de caráter a me espelhar, muito obrigado.

A todos meus irmãos, de mãe e de pai, esses guris e gurias me enchem de alegria, ontem eram uns baixinhos enjoados que viviam correndo atrás de mim, hoje me enchem de orgulho, crescendo, vivendo e cada um traçando seu caminho, vocês nem imaginam o quanto os admiro, meus manos, meus irmãos, meus parceiros, Juliano, Thais, Rafaela, Fernanda, Luiza, Gabriel e Mariana. A todos vocês, estamos longe, mas estamos juntos, para sempre.

As minhas tias aqui de Brasília, Malba e Martha Helena, extensões dos braços de minha mãe, sempre prontas para um carinho, conselho, aconchego e uma bronca quando necessário. Aprendi a amá-las e hoje vocês são indispensáveis na minha vida. E seus respectivos maridos. Tio Luciano, meu eterno incentivador, e tio Paulo, eterno brincalhão, assistir as videocassetadas sem vocês não tem a mesma graça.

Meus queridos primos Giovani e Rodrigo, pessoas que posso sempre contar, me ajudando nas questões jurídicas e não jurídicas, se já é bom ter um advogado na família, com vocês dois tudo fica ainda mais fácil.

E a minha amada Natália, minha princesa, que surgiu na minha vida após essa correria de final de tese, mas que pegou um pouco do stress da finalização. Te amo bebê, que esse seja o começo de uma linda nova história juntos.

A Capes e ao CNPq pelo auxílio financeiro, sem o qual este gaúcho aqui não teria se sustentado.

A Ambev e as demais cervejarias, principalmente as Alemãs, além das outras bebidas, fermentadas e destiladas, às vezes vocês ajudaram e às vezes atrapalharam, mas nossa relação de amor e ódio ainda perdura. E é claro, chimarrão do outro dia, que ajudava a acordar e a curar a ressaca, além de regar absolutamente toda a escrita desse trabalho. E aos criadores do Google, Pubmed, Skype e Sony Vaio, vocês me ajudaram muito.

Se teu nome está nesse agradecimento, saiba que de alguma forma você me ajudou a construir alguma coisa, como pessoa, como colega, como amigo ou como profissional. Sua participação na minha vida foi importante e espero que em algum momento nos reencontremos e que você esteja bem e só tenhamos coisas boas para contar um ao outro. Se por acaso esqueci de alguém, desculpe pela falha.

Obrigado Deus por ter colocado todas estas pessoas no meu caminho, por ter olhado por mim, e por aqueles que eu mais amo, continue cuidando da gente aqui na terra e manda um abraço e um beijo para aqueles que já estão contigo.

"Nunca é tarde demais, ou cedo demais, pra ser quem você quiser ser. Não há limite de tempo, comece quando você quiser. Você pode mudar, ou ficar como está. Não há regras pra esse tipo de coisa. Podemos encarar a vida de forma positiva ou negativa. Espero que encare de forma positiva. Espero que veja coisas que surpreendam você. Espero que sinta coisas que nunca sentiu antes. Espero que conheça pessoas com pontos de vista diferentes. Espero que tenha uma vida da qual se orgulhe. E se você descobrir que não tem, espero que tenha forças pra conseguir começar novamente..."

...E aí! Pra onde a gente vai agora?..."

(texto adaptado da internet, autor desconhecido)

RESUMO

O transplante de órgãos é uma terapia amplamente utilizada no tratamento de doenças que levam a falência completa de um órgão, mas a rejeição ao aloenxerto devido à resposta do recipiente ainda é um fator limitante para esse tipo de intervenção. Sabe-se ainda que uma parcela dos indivíduos transplantados desenvolve espontaneamente um estado dito tolerância operacional (OT), que garante a sobrevivência do enxerto, esse quadro clínico é caracterizado pela função estável do enxerto mesmo sem a utilização de drogas imunossupressoras, diferente dos outros grupos clínicos onde os indivíduos ainda fazem o uso de imunossupressão, os pacientes com doença crônica do enxerto (rejeição crônica - CR) onde existe um quadro inflamatório instaurado no órgão transplantado e pacientes estáveis (ST) onde o quadro inflamatório ainda não se manifestou. Estes diferentes estados de tolerância podem estar associados com determinantes humorais específicos e o seu padrão de reatividade talvez nos permita “ver” o mundo antigênico reconhecido por esses diferentes grupos, além disso, o conjunto de antígenos responsivos a eles podem ser utilizados como um classificador para o seu estado imunitário visando identificar padrões globais de reconhecimento e imunorregulação e contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos nesses estados de tolerância. Nosso objetivo então é avaliar a reatividade de imunoglobulinas (IgM e IgG) em pacientes renais transplantados a fim de encontrar um padrão na resposta imune humoral destes pacientes que nos levam a um possível marcador imunoregulatório para a progressão ou não para o estado de tolerância dos indivíduos. Nesse sentido foram utilizadas as técnicas de *phage display* e *peptide microarray*, ambas apresentando uma matriz aleatória de peptídeos ao repertório de anticorpos dos grupos clínicos estudados na tentativa de encontrar aqueles que caracterizem um determinado grupo pelo seu grau de interação com esses painéis peptídicos. Os peptídeos reativos selecionados por *phage display* foram obtidos a partir de sua capacidade de se ligar a IgG e IgM adsorvidas na placa de microtitulação. Um protocolo subtrativo foi padronizado para assegurar a seleção diferencial dos peptídeos. Após um único ciclo de seleção entre cada grupo de pacientes, 196 clones de fagos foram isolados e sequenciados: 150 peptídeos foram selecionados a partir de indivíduos saudáveis (74 eluídos e 76 subtraídos), 34 peptídeos foram selecionados a partir de indivíduos tolerantes operacionais (13 eluídos e 21 subtraídos) e 12 peptídeos foram selecionados a partir de indivíduos rejeição crônica (6 eluídos e 6 subtraídos). Os peptídeos reativos selecionados por *peptide microarray* foram obtidos a partir dos *microchips* fornecidos pelo grupo da Dra. Michal Orguil, onde cada *microarray* era dividido em três submatrizes (*subarrays*) exibindo a mesma biblioteca de 1.000 peptídeos aleatórios (942 15-mers). A média da intensidade de sinal (SI) de cada *spot* (microambiente ou ponto de incubação do microchip onde ocorre a interação do

peptídeo com os anticorpos do plasma ou com os controles) foi lida em R e a médias das SIs das repetições intrachip (n=3) foram calculadas para cada peptídeo (n=942). Para explorar o potencial classificatório das sequências peptídicas presentes nos microchips, foram utilizadas técnicas computacionais de predição baseadas em classificação supervisionada por *Potencial Support Vector Machine* (P-SVM) e Análise de Componente Principal (PCA). A comparação entre a intensidade de sinal dos peptídeos dos grupos selecionados revelou que a SI das amostras OT tende a ser maior que as amostras CR e ST, mas um pouco menor quando comparada com as amostras HE. A variação da SI é tendencialmente mais baixa nos grupos de estudo sob imunossupressão (ST e CR). A taxa de variação estimada dentro dos grupos ST e CR é em torno de três vezes mais baixa em comparação com OT e HE. As análises de PCA indicam uma variação biológica reduzida nos grupos sob imunossupressão. Embora, os dois primeiros componentes principais encontrados expliquem 77,2% da variação do conjunto de dados, o PCA falhou em separar os grupos de estudo quando todos os grupos eram analisados em conjunto. No entanto, as amostras de pacientes sob imunossupressão (ST e CR) formam um conjunto muito próximo, enquanto as amostras OT e HE estão muito difundidas no *biplot*. Isso está de acordo com a variação reduzida na SI dos peptídeos observada nos grupos CR e ST. Na validação cruzada *leave-one-out*, o classificador discriminou três pares de grupos de estudo (OT vs. CR, ST + CR vs. HE+OT, CR vs. HE) com BACC maior ou igual a 66.0%. Quando as análises foram feitas aos pares (*biplot*) o algoritmo de P-SVM extraiu 16 características únicas (peptídeos) para o subproblema OT vs. CR (BACC=73.8) respondendo por 91.7% da variância nos dados desses grupos (utilizando o PCA) e 22 características únicas (peptídeos) para o subproblema CR vs. HE (BACC=66%), respondendo por 68.3% da variância nos dados desses grupos (utilizando o PCA). Com isso conseguimos um conjunto de peptídeos randômicos selecionados por P-SVM que discriminaram OT-CR (n=16) ou CR-HE (n=22).

Descritores: tolerância operacional, transplante de rim, tolerância imunológica, rejeição ao aloenxerto, linfócitos B, autoanticorpos, aloanticorpos, phage display, microarranjo peptídico.

ABSTRACT

Organ transplantation is a widely used therapy in the treatment of diseases that lead with complete organ failure but the allograft rejection because of the host response is still a limited factor to this type of intervention. Knows that a host transplant portion spontaneously develop a state called operation tolerance, that guarantee the survival of the graft. This clinical is characterized by the stable function of the graft even without the use of immunosuppressive drugs, different from the others clinical groups where the host still do the use of immunosuppression. The patients with chronicle graft disease - a inflammatory picture established into the transplanted organ exist and stable patient - inflammatory picture not yet manifested. These different states of tolerance may be associated with specific humoral determinants, where the reactivity allows us to "observe" the antigens world, and the set of responsive antigens could be used as a "sorter" to the immune status in order to identify global patterns of recognition and immunoregulation and to contribute for the understanding of mechanisms of these states. Our aim is to evaluate the reactivity of antibodies (IgG and IgM) in kidney transplant patients in order to find a humoral immune response patterns of these patients that leads to a possible immunoregulatory marker for progression or not to the tolerance status of the individuals. For this purpose we used a phage display and peptide microarray techniques, both presenting a random panel of peptides to the clinical groups repertoire of antibodies in an attempt to find those that characterize a particular group by their level of interaction with these peptide panels. The reactive peptides selected by phage display were obtained by their capacity of binding to patients adsorbed plasma IgM or IgG. A subtractive protocol was used to ensure the differential selection of binding peptides. After a single selection cycle between each group of patients, 196 isolated phage clones were sequenced: 150 peptides were selected for healthy patients (76 subtracted and 74 eluted), 34 peptides were selected for operational tolerance patients (21 subtracted and 13 eluted) and 12 peptides were selected for chronic rejection patients (6 subtracted and 6 eluted). No major sequence bias was found among the peptides of each group, but sequences substrings differences were found using odds-ratio. The reactive peptides selected by peptide microarray were obtained from the microchips provided by Dr. Michal Orguil group. Each microarray was split into three subarrays displaying the same library of 1,000 random peptides (942 15-mers). Median spot signal intensity (SI) were read into R using the function readData and the mean SI across subarrays (n=3) was calculated for each peptide (n=942). To explore the potential classification of the peptide sequences present in microchips that was carried out using an R implementation a computational prediction techniques based in supervised data classification algorithm, Potential Support Vector Machine (P-SVM) and Principal Component Analysis (PCA). Comparison of sorted group mean peptide SI revealed

that OT samples SI tend to be higher than those in CR and ST but lower than those in HE samples. The variance of peptide SI is tendentially lower in the study groups under immunosuppression (ST and CR). The estimated average variance within the ST and CR groups is about three times lower compared to the OT or HE group. Principal Component Analysis (PCA) indicates reduced biological variability within study groups under immunosuppression. Although the first two principal components were found to explain 77.2% of the data set's variance, PCA failed to separate individual study groups. However, samples from patients under immunosuppression (ST, CR) form a very tight cluster while OT and HE samples are widespread in the biplot, and agree with the reduced peptide SI variance observed in the CR and ST group. In leave-one-out cross-validation, the classifier was been discriminated three pairs of study groups (OT vs. CR, ST+CR vs. HE+OT, CR vs. HE) with a balanced accuracy (BACC) of more or equal to 66.0%. When the analyses was done in pairs (biplot), the P-SVM algorism extracted 16 unique characteristics (peptides) for the subproblem OT vs. CR (BACC=73.8) answering for 91.7% of the dates variance in those groups (using PCA analysis) and 22 unique characteristics (peptides) for the subproblem CR vs. HE (BACC=66%), answering for 68.3% of the dates variance in those groups (using PCA analysis). Which that we got a set of random peptides selected for P-SVM and PCA that discriminate OT/CR (n=16) and CR/HE (n=20).

Keywords: operational tolerance, kidney transplantation, immunologic tolerance, allograft rejection, B-lymphocytes, autoantibodies, alloantibodies, phage display, peptide microarray.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01.** Dados demográficos e clínicos sobre os grupos de estudo.....Pág.54
- Tabela 02.** Anticorpos utilizados para o teste de captura.....Pág.56
- Tabela 03.** Dados obtidos a partir das análises computacionais das sequências peptídicas obtidas a partir dos fagos eluídos selecionadas com o pool de anticorpos IgG dos indivíduos saudáveis.....Pág.70
- Tabela 04.** Dados obtidos a partir das análises computacionais das sequências peptídicas obtidas a partir dos fagos eluídos selecionadas com o pool de anticorpos IgM dos indivíduos saudáveis.....Pág.71
- Tabela 05.** Dados obtidos a partir das análises computacionais das sequências peptídicas obtidas a partir dos fagos subtraídos selecionadas com o pool de anticorpos IgG dos indivíduos saudáveis.....Pág.72
- Tabela 06.** Dados obtidos a partir das análises computacionais das sequências peptídicas obtidas a partir dos fagos subtraídos selecionadas com o pool de anticorpos IgM dos indivíduos saudáveis.....Pág.73
- Tabela 07.** Dados obtidos a partir das análises computacionais das sequências peptídicas obtidas a partir dos fagos eluídos e subtraídos selecionadas com o pool de anticorpos IgG e IgM dos indivíduos tolerantes operacionais.....Pág.74
- Tabela 08.** Dados obtidos a partir das análises computacionais das sequências peptídicas obtidas a partir dos fagos eluídos e subtraídos selecionadas com o pool de anticorpos IgG e IgM dos indivíduos rejeição crônica.....Pág.75
- Tabela 09.** Concentrações de IgM, IgG e proteína total do plasma das amostras sanguíneas dos indivíduos transplantados renais com diferentes níveis de tolerância (n=23) e dos indivíduos saudáveis (n=9).....Pág.81
- Tabela 10.** Classificação supervisionada dos grupos de estudo por P-SVM.....Pág.96
- Tabela 11.** Conjunto de peptídeos randômicos selecionados por P-SVM.....Pág.97

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Representação esquemática dos passos metodológicos utilizados.....Pág.57
- Figura 02.** Esquema de seleção dos fagos reativos.....Pág.59
- Figura 03.** Imunoensaio enzimático de ligação direta (ELISA) a IgG humana comparando a atividade ligante dos diferentes anticorpos.....Pág.68
- Figura 04.** Imunoensaio enzimático de ligação direta (ELISA) a IgM humana comparando a atividade ligante dos diferentes anticorpos.....Pág.68
- Figura 05.** Gráfico com a predição do ponto isoelétrico das sequências obtidas a partir dos fagos subtraídos e eluídos selecionados com o pool dos anticorpos IgM e IgG dos grupos de estudo.....Pág.75
- Figura 06.** Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs subtraídas dos indivíduos saudáveis (SGS).....Pág.76
- Figura 07.** Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgMs subtraídas dos indivíduos saudáveis (SMS).....Pág.76
- Figura 08.** Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs eluídas dos indivíduos saudáveis (EGS)Pág.76
- Figura 09.** Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgMs eluídas dos indivíduos saudáveis (EMS).....Pág.77
- Figura 10.** Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgMs subtraídas dos indivíduos tolerantes operacionais (SMT).....Pág.77
- Figura 11.** Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs eluídos dos indivíduos tolerantes operacionais (EGT).....Pág.77
- Figura 12.** Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs e IgMs eluídas dos indivíduos tolerantes operacionais (EGT e EMT).....Pág.78
- Figura 13.** Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs e IgMs eluídas dos indivíduos rejeição crônica (EGR e EMR).....Pág.78
- Figura 14.** Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs e IgMs subtraídas dos indivíduos rejeição crônica (SGR e SMR).....Pág.78
- Figura 15.** Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs e IgMs subtraídas e eluídas de todos os indivíduos dos grupos de estudo (OT, CR e HE).....Pág.79
- Figura 16.** Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs e IgMs subtraídas e eluídas de todos os indivíduos saudáveis (EGS, EMS, SGS e SMS).....Pág.79
- Figura 17.** Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs e IgMs subtraídas e eluídas de todos os indivíduos tolerantes operacionais (EGT, EMT, SGT e SMT).....Pág.79

- Figura 18.** Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs e IgMs subtraídas e eluídas de todos os indivíduos rejeição crônica (EMR, EGR, SMR e SGR).....Pág.80
- Figura 19.** Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs e IgMs eluídas dos indivíduos tolerantes operacionais e rejeição crônica (eluídas de OT e CR).....Pág.80
- Figura 20.** Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs e IgMs subtraídas dos indivíduos tolerantes operacionais e rejeição crônica (subtraídas de OT, CR e HE).....Pág.80
- Figura 21.** Níveis de IgM, IgG e proteína total no plasma sanguíneos das amostras dos grupos de estudo.....Pág.83
- Figura 22.** Correlação entre os níveis plasmáticos de IgM, IgG e proteína total das amostras sanguíneas dos grupos de estudo.....Pág.83
- Figura 23.** Análise de correlação entre a concentração sérica de IgG, proteína total e IgM e a média de intensidade de sinal (SI) das IgMs.....Pág.83
- Figura 24.** Intensidade de sinal (SI) do perfil de ligação das amostras de plasma dos grupos de estudo utilizando os microarranjos peptídicos randômicos.....Pág.86
- Figura 25.** Histograma da distribuição logarítmica (log) das intensidades de sinal (SI) indicando uma distribuição normal na população analisada.....Pág.87
- Figura 26.** Snake plot dos grupos imunossuprimidos contra os não-imunossuprimidos.....Pág.88
- Figura 27.** Snake plot dos grupos tolerantes operacionais contra os indivíduos rejeição crônica.....Pág.88
- Figura 28.** Snake plot dos grupos tolerantes operacionais contra os indivíduos saudáveis.....Pág.89
- Figura 29.** Snake plot dos grupos tolerantes operacionais contra os indivíduos estáveis.....Pág.89
- Figura 30.** Sobreposição da intensidade de sinal (SI) de todos os grupos da pesquisa.....Pág.90
- Figura 31.** Comparação dos snake plots dos indivíduos rejeição crônica contra os demais grupos.....Pág.90
- Figura 32.** Comparação da SI de cada sujeito da pesquisa utilizando a média da intensidade de sinal de cada microchip.....Pág.91
- Figura 33.** Análises de correlação entre as cinco repetições utilizadas como controle interchip e o branco.....Pág.91
- Figura 34.** Análise de correlação entre a concentração da IgM plasmática e da média de intensidade de sinal (SI).....Pág.92
- Figura 35.** Baixa correlação entre o branco e as demais amostras.....Pág.93
- Figura 36.** Intensidade de sinal das IgMs não depende do dia da incubação nem do estado de imunossupressão.....Pág.94
- Figura 37.** Análise de componente principal (PCA - *principal component analysis*) dos dados da intensidade de sinal das amostras.....Pág.95

LISTA DE ABREVIATURAS

Ab: anticorpo (antibody)
 BACC: balanced accuracy precisão equilibrada
 BCA: ensaio de quantificação protéica utilizado com ácido bicincônico
 BSA: Albumina sérica bovina
 °C: grau Celsius
 cols.: colaboradores
 CR: indivíduos com rejeição crônica
 EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
 EGR: fagos eluídos selecionados a partir do *pool* de IgG de indivíduos rejeição
 EGS: fagos eluídos selecionados a partir do *pool* de IgG de indivíduos saudáveis
 EGT: fagos eluídos selecionados a partir do *pool* de IgG de indivíduos tolerantes
 ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
 EMR: fagos eluídos selecionados a partir do *pool* de IgM de indivíduos rejeição
 EMS: fagos eluídos selecionados a partir do *pool* de IgM de indivíduos saudáveis
 EMT: fagos eluídos selecionados a partir do *pool* de IgM de indivíduos tolerantes
 Fc: fragmento cristalizável do anticorpo
 HE: voluntários saudáveis
 Ig: Imunoglobulina
 IL: interleucina
 IS: grupos imunossuprimidos
 Kb: kilobase
 Ltx: indivíduo utilizado no estudo de longo tempo de transplante
 M: molar
 ml: mililitro
 NA: não se aplica
 ND: não disponível
 ng: nanograma
 NIS: grupos não-imunossuprimidos
 OT: indivíduos tolerantes operacionais
 pb: pares de base
 PBS: *Phosphate Buffered Saline*, solução salina tamponada com fosfato
 PCA: análise de componente principal, *principal component analysis*
 PCR: reação em cadeia da polimerase
 PI: ponto isoelétrico
 P-SVM: *Potential Support Vector Machine*
 r: coeficiente de correlação de Pearson
 RNA: Ácido ribonucléico
 SGR: fagos subtraídos selecionados a partir do *pool* de IgG de indivíduos rejeição
 SGS: fagos subtraídos selecionados a partir do *pool* de IgG de indivíduos saudáveis
 SGT: fagos subtraídos selecionados a partir do *pool* de IgG de indivíduos tolerantes
 SI: Intensidade de sinal
 SMR: fagos subtraídos selecionados a partir do *pool* de IgM de indivíduos rejeição
 SMS: fagos subtraídos selecionados a partir do *pool* de IgM de indivíduos saudáveis
 SMT: fagos subtraídos selecionados a partir do *pool* de IgM de indivíduos tolerantes
 ST: indivíduos com função estável do enxerto
 Tx: transplante
 µg: micrograma
 µl: microlitro

SUMÁRIO

RESUMO.....	Pág.11
ABSTRACT.....	Pág.13
Lista de tabelas.....	Pág.15
Lista de figuras.....	Pág.16
Lista de abreviaturas.....	Pág.18
1. INTRODUÇÃO.....	Pág.22
1.1. O Transplante Renal.....	Pág.22
1.2. Vias de reconhecimento do Aloenxerto.....	Pág.24
1.3. Tipos de rejeição ao aloenxerto.....	Pág.26
1.4. A Tolerância imunológica, central e periférica.....	Pág.30
1.5. Mecanismos de Imunoregulação.....	Pág.32
1.6. A Tolerância Operacional.....	Pág.35
1.7. Imunossupressão e as células reguladoras.....	Pág.42
1.8. O repertório de imunoglobulinas circulantes como um marcador fisiológico.....	Pág.45
2. JUSTIFICATIVA.....	Pág.49
3. OBJETIVOS.....	Pág.51
3.1. Objetivo Geral.....	Pág.51
3.2. Objetivos específicos.....	Pág.51
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	Pág.53
4.1. MATERIAIS.....	Pág.53
4.1.1. Sujeitos da pesquisa.....	Pág.53
4.1.2. Anticorpos para captura.....	Pág.56
4.1.3. Biblioteca de peptídeos apresentados em fagos.....	Pág.57
4.2. MÉTODOS.....	Pág.57
4.2.1. Desenho experimental.....	Pág.57
4.2.2. Preparação das IgGs e IgMs para o phage display.....	Pág.58
4.2.3. Seleção dos fagos reativos.....	Pág.58
4.2.4. Titulação dos fagos selecionados.....	Pág.59
4.2.5. Sequenciamento automático do DNA dos fagos selecionados e análise das sequências obtidas.....	Pág.59
4.2.6. Tecnologia de microarranjo peptídico.....	Pág.61

4.2.7. Quantificação das imunoglobulina IgG e IgM dos sujeitos da pesquisa por ensaio imunoenzimático (ELISA).....	Pág.61
4.2.8. Quantificação da proteína total (BCA).....	Pág.62
4.2.9. Ensaio de microarranjo peptídico - <i>Peptide Microarray Probing</i>	Pág.62
4.2.10. Aquisição e processamento de dados.....	Pág.63
4.2.11. Análise de dados e estatística.....	Pág.63
4.2.12. PCA e P-SVM.....	Pág.64
5. RESULTADOS	Pág.67
5.1. ELISA de ligação direta.....	Pág.67
5.2. Seleção dos fagos reativos.....	Pág.69
5.3. Sequências peptídicas obtidas a partir do pool de indivíduos saudáveis.....	Pág.69
5.4. Análise comparativa das sequências peptídicas.....	Pág.70
5.5. Avaliação da concentração sérica de IgG, IgM e proteína total e a sua correlação com a intensidade de sinal (SI) encontrada nos microarranjos.....	Pág.81
5.6. Análises de correlação e variação da intensidade de sinal nos microarranjos peptídicos.....	Pág.84
5.7. Correlação entre a intensidade de sinal e o título das IGMs.....	Pág.92
5.8. Validação da correlação do branco contra as demais amostras.....	Pág.93
5.9. Análises de componente principal (PCA).....	Pág.95
5.10. Análise por P-SVM (<i>support vector machine analysis</i>) e BACC (<i>balanced accuracy</i>).....	Pág.96
6. DISCUSSÃO.....	Pág.99
6.1. Resultados obtidos a partir do phage display.....	Pág.99
6.2. Resultados obtidos a partir do microarranjo peptídico.....	Pág.102
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	Pág.108
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	Pág.111
ANEXOS.....	Pág.125
Anexo I: Termo de consentimento livre esclarecido.....	Pág.126
Anexo II: Aprovação do projeto pelo comitê de ética.....	Pág.131
Anexo III: Tabelas com os dados clínicos individuais dos sujeitos da pesquisa.....	Pág.133
Anexo IV: Script Pearl usado para o processamento das sequências.....	Pág.141
Anexo V: Artigo científico.....	Pág.146

Introdução

“Maravilhar-se é o primeiro passo para o conhecimento”

Louis Pasteur

Químico e Biólogo Francês

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Transplante Renal

No momento em que terapias medicamentosas ou cirúrgicas convencionais já não são mais eficientes no tratamento de doenças que levam a falência parcial de um órgão ou de um tecido têm-se o transplante como alternativa. O transplante é um componente cirúrgico importante da prática médica que consiste em retirar células, tecidos ou órgãos sadios de um doador (designados como enxertos) e substituir por seus equivalentes irremediavelmente doentes. A principal limitação no sucesso desta técnica é a resposta imune do receptor ao tecido do doador, que caso ocorra em altos níveis pode gerar um dano, celular ou tecidual, culminando na rejeição do enxerto. Portanto, o doador e o receptor devem ter algumas características biológicas em comum, a fim de diminuir ou neutralizar este obstáculo. (revisado por Nishio-Lucar e cols, 2013).

Quanto a sua classificação o transplante pode ser: autólogo, singênico, alogênico e xenogênico. O transplante autólogo ou auto-enxerto é realizado do indivíduo para ele mesmo, já o transplante entre duas pessoas geneticamente idênticas é chamado singênico, enquanto que xenogênico (ou xenoenxerto) é o transplante entre indivíduos de espécies diferentes. Quando se trata de um enxerto transplantado entre dois indivíduos geneticamente diferentes, mas da mesma espécie, ele classificado como alogênico ou aloenxerto (Afzali e cols., 2007), sendo este o tipo de transplante abordado neste trabalho.

Dentre os transplantes de órgãos sólidos, o mais prevalente é o transplante renal. Esse tipo de transplante é indicado para os casos em que há acometimento irreversível da função renal. No Brasil, no ano de 2012 (dados de janeiro a dezembro) foram realizados 5.358 transplantes renais, que equivalem a 72,5% de todos os transplantes de órgãos sólidos realizados no país (ABTO, 2012). Esses dados epidemiológicos mostram a relevância do transplante de rim na saúde pública do país e a importância de estudos para melhorar a sobrevida do enxerto renal.

Mas sem o uso adequado de drogas imunossupressoras, o transplante de órgãos induz uma resposta imunológica efetora direcionadas às células e/ou aos

tecidos transplantados, mediada principalmente por células T, resultando na rejeição do órgão transplantado. Além disso, mesmo com o permanente desenvolvimento de novos fármacos imunossupressores e com os avanços nos exames laboratoriais pré-transplante, a maior limitação para o sucesso do transplante de órgãos alogênicos é a rejeição crônica (revisado por Nankivell e cols, 2003).

Por definição, a rejeição é um processo de deterioração funcional e estrutural do enxerto, mediada principalmente por fatores imunológicos, porém fatores não imunológicos como a hipertensão e a toxicidade pelos inibidores de calcineurina, também podem contribuir para a degradação do rim transplantado. Conseqüentemente a resposta imunológica à rejeição é atualmente uma das principais barreiras reais ao transplante alogênico, já que a resposta imune às moléculas alogênicas é muito forte. Dentre os fatores imunológicos envolvidos no processo de rejeição, destaca-se o alorreconhecimento de moléculas extremamente polimórficas, principalmente as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, *major histocompatibility complex*). Em humanos, as moléculas MHC são chamadas de antígenos leucocitários humanos (HLA, *human leukocyte antigens*). O sistema HLA foi, primeiramente, descrito por Jean Dausset, Jan van Rood e colaboradores sendo responsável pela indução de rejeição de aloenxertos, em humanos (Rapaport e cols., 1965). Contudo, a função fisiológica do sistema de apresentação de antígenos protéicos para os linfócitos T só foi desvendada posteriormente (revisado por Delves e Roitt, 2000 e Cai e Terasaki, 2005a).

Em humanos, os genes que fazem parte do sistema HLA localizam-se no braço curto do cromossomo 6. Sabe-se ainda, que o sistema HLA é poligênico e altamente polimórfico, contendo mais de 1000 diferentes alelos e mais de 200 genes (Erich e cols., 2001). Destacamos nessa região as sequências codificadoras das cadeias das moléculas HLA de classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e de classe II (HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ). Essas duas classes de moléculas são responsáveis pela apresentação de peptídeos próprios e não próprios aos linfócitos T, que as reconhecem, em conjunto com os peptídeos, através do receptor de células T (TCR, *T cell receptor*), informando o estado do tecido, por exemplo quanto a presença de infecção ou malignidade. As moléculas de classe I apresentam peptídeos, principalmente para células T CD8+, enquanto que as de classe II, para linfócitos T

CD4+. Sendo que as moléculas de classe I são expressas em todas as células nucleadas do corpo, enquanto que as de classe II são expressas nas células apresentadoras de antígenos (APC, *antigen presenting cells*) e em algumas células quando ativadas, como células endoteliais e linfócitos T, em humanos (revisado por Delves e Roitt, 2000 e Kindt e cols., 2002). Nessa mesma região gênica do sistema HLA existem outros genes que também contribuem com a resposta imune, são eles: HSP (*heat shock protein*); tapsina e TAP (transportador associado ao processamento de antígenos) que codificam proteínas que participam do processamento de antígenos via HLA classe I; proteínas do sistema complemento, entre outras (revisado por Delves e Roitt, 2000).

As moléculas HLA do doador expressas na superfície das células do aloenxerto são os principais alvos de reconhecimento dos linfócitos T do receptor. Entretanto, já foi mostrado por diversos grupos de pesquisa (Magro e cols., 2003; Sun e cols., 2005), inclusive por nossos colaboradores, que outros sistemas não HLA como o sistema endotelial (Neumann e cols., 1992), assim como determinadas proteínas próprias como a HSP podem participar da resposta imune ao alotransplante (Caldas e cols., 2006).

1.2 Vias de reconhecimento do Aloenxerto

A resposta imune na rejeição é iniciada principalmente pelos linfócitos T do receptor que reconhecem as moléculas HLA do doador expressas nas células e/ ou tecidos do órgão transplantado. O reconhecimento desses antígenos pode acontecer por três vias distintas: direta, indireta e semidireta. Ao longo da sobrevivência do enxerto essas três vias de reconhecimento dos linfócitos T do receptor podem ocorrer concomitantemente. (Cornell e cols., 2008). Na via direta os linfócitos T do receptor reconhecem diretamente o complexo peptídeo/MHC intacto expresso na superfície das células do doador, sem necessidade do processamento de aloantígenos pelas células dendríticas do receptor (Warrens e cols., 1994).

A via indireta, é a via fisiológica de apresentação de antígenos, nas quais as APCs do receptor processariam e apresentariam via HLA de classe II os antígenos derivados das moléculas HLA do doador para as células T CD4+ do receptor (Lechler e Batchelor, 1982; Shoskes e Wood, 1994) A apresentação de

aloantígenos de forma indireta (nesse contexto de moléculas HLA de classe II próprias) resultaria em uma resposta que é predominantemente de células T CD4+, podendo desencadear também uma resposta via células T CD8+. Uma possível implicação dessa resposta é a indução da produção de aloanticorpos. Devido ao fato das células T CD4+ ativadas por APCs, que apresentavam aloantígenos, podem interagir com células B naive alorreativas de forma a sinalizar para essas células B a indução de mudança de classe de Ig e a sua diferenciação em plasmócitos secretores de aloanticorpos. Dessa maneira, a presença de aloanticorpos é um indicativo de que houve ajuda por parte de células T envolvidas na via indireta de alorreconhecimento (Steele e cols., 1996; Taylor e cols., 2007).

A via semidireta ocorre devido à capacidade das células do sistema imune de transferir moléculas de sua superfície celular para outra célula (Smyth e cols., 2007), fenômeno esse chamado de trogocitose no qual, uma célula adquire o conteúdo citoplasmático ou fragmentos da membrana celular de outra célula com a qual interage (revisado por Ahmed e Xiang, 2010). Sabe-se que as células dendríticas são capazes de adquirir complexos HLA-peptídeo intactos de outras células dendríticas e células endoteliais e, assim, apresenta-los às células T alorreativas (Bedford e cols., 1999; Herrera e cols., 2004). Dessa maneira, as APCs do receptor podem adquirir complexos HLA-peptídeos alogênicos intactos de células do doador, por meio da transferência de moléculas HLA, e estimular células T CD8+ ou CD4+ pela via direta (Bedford e cols., 1999; Herrera e cols., 2004). Além disso, essa mesma APC pode apresentar peptídeos de antígenos de histocompatibilidade alogeneicos que foram fagocitados e processados a partir de células necróticas. Esses peptídeos são apresentados via moléculas HLA de classe II próprias pela via indireta às células T CD4+. Nesse sentido, tanto células T CD4+ e CD8+ aloespecíficas são ativadas pela mesma APC. O modo de aquisição do complexo HLA intacto pode ser por contato celular direto (Harshyne e cols., 2001; Herrera e cols., 2004; Game e cols., 2005) ou pela liberação e internalização de pequenas vesículas (“exosomes”) (Denzer e cols., 2000; Morelli e cols., 2004).

1.3 Tipos de rejeição ao aloenxerto

A resposta imune ao alotransplante pode ser dividida em quatro fases: inflamação cirúrgica e ativação da resposta imune inata, reconhecimento de aloantígenos, ativação de linfócitos antígeno-específicos, e a fase efetora da rejeição do enxerto. Durante esse processo a rejeição pode ser entendida como a deterioração funcional e estrutural do enxerto e, no transplante renal, atualmente classificada de acordo com as alterações histopatológicas observadas e os fatores imunológicos nela envolvidos, seguindo os critérios da classificação de Banff 2005 que foram posteriormente modificados (Racusen e cols., 1999; Solez e cols., 2007; Sis e cols., 2010). Assim, os tipos de rejeição foram reclassificados em rejeição mediada por anticorpos e rejeição mediada por células T; ambas podendo ser aguda ou crônica (Solez e cols., 2007). Ambas as formas crônicas de rejeição são menos compreendidas quando comparadas com as formas agudas, sendo que compartilham várias características como constrição vascular levando à perda funcional do órgão e infiltração de células mononucleares, além de se caracterizarem por um processo lento que acomete tardiamente o órgão transplantado. Outro dado interessante é que os casos de rejeição crônica revelam certa resistência ao uso de drogas imunossupressoras. (Colvin e Smith, 2005).

Durante um levantamento, realizado no período de 2007 a 2009 no Hospital das Clínicas da FMUSP, observou-se uma prevalência de rejeição aguda na população de 457 transplantados renais em torno de 18,6%, sendo 12% rejeições mediadas por células e 6% mediadas por anticorpos (dados não publicados). Esta predominância se assemelha a encontrada em outros centros de pesquisa (Cornell e cols., 2008). Quanto a taxa de sobrevivência do aloenxerto renal, 99% é para rins de doadores vivos e 92% para doadores cadavéricos, no primeiro ano pós-transplante. Para 5 anos após o transplante a sobrevivência do enxerto é de 91 e 72%, respectivamente, e de 77% e 47% , após 10 anos de transplante (Axelrod e cols., 2010). Mesmo com o uso de fármacos imunossupressores a perda funcional do enxerto, em longos períodos, devido ao processo de rejeição tem sido a maior dificuldade para o total sucesso do transplante de órgãos.

A rejeição aguda mediada por células T é caracterizada pela presença de células mononucleares infiltrantes no aloenxerto, como macrófagos, linfócitos B e,

especialmente, linfócitos T CD4+ e CD8+, seguida por inflamação dos túbulos e muitas vezes das artérias renais, e a ausência da fração C4d do complemento (Colvin e Nickleit, 2006). Dentre os mecanismos efetores de agressão ao enxerto, os mais atuantes nesse tipo de rejeição são a hipersensibilidade tardia, mediada por citocinas e quimiocinas inflamatórias, sendo as principais IFN- γ , TNF- α e β e as quimioquinas CCL5, também chamada de RANTES (*regulated upon activation, normal t cell expressed and secreted*), e CCL3, também chamada de Proteína inflamatória de macrófago (MIP-1 α , *macrophage inflammatory protein*), e citotoxicidade mediada por perforina e granzimas e/ou por FasL (Hoffmann e cols., 2005). Também é detectada a presença de TGF- β (*transforming growth factor*) que nos processos de rejeição, além de sua atividade anti-inflamatória, pode também estar envolvido com o desenvolvimento de fibrose (Eikmans e cols., 2002). Inclusive, esse processo inflamatório pode gerar a ruptura da membrana basal tubular, o que induz a liberação de proteínas tubulares no interstício, influenciando diretamente na perda da função renal e na perda tubular progressiva (Bonsib e cols., 2000). Os casos de rejeição aguda geralmente ocorrem, entre as primeiras semanas pós-transplante (revisado por Monaco, 2004) e são facilmente revertidos com tratamento imunossupressores convencionais (revisado por Helderman e cols., 2001).

Já quando se trata do processo de rejeição aguda mediada por anticorpos, a principal característica são os anticorpos direcionados contra as moléculas HLA e ABO expressas pelas células endoteliais do doador (Rocha e cols., 2003), esses anticorpos são capazes de ativar a cascata do sistema complemento, resultando na lise celular, trombose e necrose do órgão transplantado. Além desses aloanticorpos, são observados autoanticorpos direcionados aos receptores do tipo I da angiotensina II que podem também participar desse tipo de rejeição (Dragun e cols., 2005). Ao que tudo indica, tanto moléculas do doador quanto moléculas próprias, podem ser alvos de reconhecimento e ativação da resposta imune ao aloenxerto no processo de rejeição. Contudo, a presença de polimorfismo nesses receptores, assim como a existência desses autoanticorpos no soro dos receptores antes do transplante devem ser avaliados. Os principais fatores de risco para rejeição mediada por anticorpos são a pré-sensibilização do receptor através da gravidez, transfusão

sanguínea ou por transplantes prévios, diminuição da imunossupressão, muitas vezes, devido ao surgimento de tumores, infecções e à toxicidade causada pelas drogas imunossupressoras, ou ainda pela não aderência ao tratamento. Dentre os principais achados histopatológicos encontrados nesse tipo de rejeição destacam-se, o mínimo processo inflamatório, a presença de neutrófilos e monócitos nos capilares peritubulares e glomerulares, e a detecção da fração C4d nos capilares peritubulares do aloenxerto, indicando ativação da cascata do sistema complemento (revisado por Moll e Pascual, 2005; Solez e cols., 2007). Nesse tipo de rejeição, 88 a 95% dos indivíduos com deposição de C4d têm anticorpos anti-HLA (doador) na circulação (Colvin, 2007). No entanto, a rejeição mediada por anticorpos pode acontecer na ausência de aloanticorpos circulantes, provavelmente devido à absorção dos mesmos pelo enxerto (Martin L e cols., 2005). Outro mecanismo que pode ocorrer na rejeição mediada por anticorpos sendo independente do sistema complemento, é através da citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), onde os anticorpos ligam-se as células alvo e, ao mesmo tempo, induzem a ativação de células efetoras através do reconhecimento da sua porção Fc, através dos receptores FcγRIIA (CD16). Esses receptores estão presentes nas células NK e macrófagos, que quando ativadas, liberam citocinas e grânulos, contendo perforinas e granzimas, que promovem a apoptose da célula alvo (revisado por Cornell e cols., 2008).

Atualmente a principal causa de perda do enxerto renal é a rejeição crônica, tanto mediada por anticorpos quanto por células T, podendo ocorrer por mecanismos celulares, humorais ou ambos. Entretanto, o uso de drogas imunossupressoras, nesse tipo de rejeição tem se mostrado refratário (Ashton-Chess e cols., 2006; Ashton-Chess e cols., 2009). Geralmente, é um processo mais latente e ocorre frequentemente, em um período tardio após o transplante. Segundo Colvin e Nickleit (2006) as principais alterações histopatológicas da rejeição crônica são a duplicação ou multilaminação da membrana basal glomerular (glomerulopatia do transplante) e dos capilares peritubulares; a arteriopatia do transplante, caracterizada pelo espessamento da camada íntima e proliferação de células musculares lisas em artérias do enxerto, e menos especificamente; a fibrose intersticial; e a atrofia tubular. As principais manifestações clínicas observadas em indivíduos transplantados renais com rejeição crônica são a hipertensão arterial e

proteinúria. Mesmo assim a patogênese da rejeição crônica é ainda pouco conhecida, porém há vários dados experimentais e epidemiológicos que indicam ser um processo multifatorial, com a participação tanto de fatores imunológicos como de fatores não imunológicos. Os principais fatores imunológicos que estão relacionados à progressão da rejeição crônica em indivíduos transplantados renais são a disparidades de antígenos HLA entre o doador e o receptor, sensibilização pré-transplante do receptor dirigido a antígenos HLA, episódios anteriores de rejeição aguda, injúria do órgão transplantado causada pelo tempo de isquemia e reperfusão pré e/ou durante a cirurgia, e imunossupressão inadequada. A lesão do aloenxerto causada por isquemia e reperfusão resulta em dano tecidual e uma consequente resposta inflamatória e o aumento da expressão de moléculas como as proteínas de choque térmico (HSP, *heat shock protein*), moléculas de adesão, citocinas e quimiocinas, que sinalizam uma resposta imune inflamatória.

Atualmente são utilizados diversos protocolos com diferentes tipos de drogas imunossupressoras, direcionados tanto para inibir a resposta celular quanto a humoral. Esses fármacos aumentam a sobrevida do aloenxerto, mas pelo fato de não atuarem somente na resposta imune direcionada ao aloenxerto levam a um estado de imunossupressão, aumentando também o risco do indivíduo contrair infecções ou desenvolver processos neoplásicos. Além disso, essas drogas imunossupressoras causam diversos efeitos colaterais (mielossupressão, nefrotoxicidade, distúrbios metabólicos) (revisado por Lisik e cols., 2005) e são pouco eficientes no tratamento da rejeição crônica, que é a principal causa da perda tardia do aloenxerto. Deste modo, a busca por novos protocolos terapêuticos mais eficazes e com menores efeitos colaterais continua sendo uma necessidade.

Vale ressaltar que a última classificação de Banff (Racusen e cols., 1999; Solez e cols., 2007; Sis e cols., 2010) é uma tentativa de se apontar os mecanismos predominantes envolvidos no processo da rejeição, diferenciando a rejeição crônica mediada por células da mediada por anticorpos. No entanto, é importante lembrar que ambos os mecanismos celulares e humorais possivelmente coexistem no processo de agressão ao enxerto.

Análises do repertório de aloanticorpos anti-HLA presentes no soro de pacientes transplantados têm contribuído para uma maior valorização do papel dos anticorpos na rejeição crônica. Nesses estudos foi observado que a detecção de

aloanticorpos anti-HLA (tanto doador específicos como não específicos) podem prever a evolução para a rejeição crônica (Terasaki e Ozawa, 2005). Nesse trabalho os 2231 pacientes com transplante renal, mostraram uma prevalência de casos de rejeição crônica expressivamente superior no grupo de pacientes com aloanticorpos anti-HLA quando comparados aos que não possuíam tais anticorpos (Terasaki e Ozawa, 2005). Além disso, análises diferenciais de pacientes com aloanticorpos anti-HLA doador específicos e não específicos demonstraram que, apesar dos pacientes com aloanticorpos anti-HLA doador específicos apresentarem uma maior prevalência de comprometimento da função do enxerto, ambos os grupos apresentaram um maior risco de perda do enxerto e uma diminuição da função do enxerto quando comparados aos pacientes que não possuíam esses anticorpos (Hourmant e cols., 2005). Ainda que não se conheçam os mecanismos exatos de dano ao enxerto no que diz respeito aos aloanticorpos não específicos ao doador, esses dados dão a entender que a presença de aloanticorpos anti-HLA seja um forte marcador para o surgimento da rejeição crônica, e o seu monitoramento pode ser uma importante ferramenta para essa avaliação.

Também é possível observar que anticorpos não HLA e autoanticorpos, fixadores ou não do sistema complemento, sejam também responsáveis por uma série de danos ao enxerto (Dragun, 2008). Além disso, os alvos descritos no transplante renal incluem vários antígenos secundários de histocompatibilidade (Sumitran-Holgersson e cols., 2002; Mizutani e cols., 2006), receptores vasculares, como os receptores de angiotensina (Ansari e cols., 2005; Dragun e cols., 2005), moléculas de adesão (Raats e cols., 1998; Costell e cols., 1999; Lawson e cols., 2005) e filamentos intermediários (Dragun, 2008). Embora esses mecanismos sejam pouco conhecidos, esses tipos de anticorpos talvez possuam um papel importante no processo de rejeição crônica.

1.4A Tolerância imunológica, central e periférica

Tolerância imunológica é tida como o estado de não agressão aos tecidos próprios. Podendo ser classificada em dois tipos, a central e a periférica. A tolerância central ocorre nos órgãos linfóides centrais - medula óssea para os linfócitos B e timo para os linfócitos T, e a periférica nos órgãos linfóides periféricos

(baço e linfonodos) e nos tecidos periféricos (Kyewski e Klein, 2006). Durante a tolerância central, os linfócitos que reconhecem antígenos próprios com alta avides, geralmente, entram em um processo chamado seleção negativa e são eliminados por apoptose. Já aqueles linfócitos que possuem uma avides intermediária pelos antígenos próprios passam pelo processo chamado de seleção positiva, e em sua maioria, essas células são estimuladas a migrar para os tecidos linfóides periféricos (Liu, 2006). Além disso, existem estudos que mostram uma terceira situação, eles mostram a existência de uma população de células T selecionadas positivamente com uma capacidade de se ligar com média a alta avides a antígenos próprios. Essa população celular desempenha um papel regulador sobre a resposta imune na periferia e são chamadas células T reguladoras (Tregs) (Schwartz, 2005).

Diferentemente do que ocorre com os linfócitos T, no processo de seleção negativa dos linfócitos B as células com BCR (*B cell receptor*) com alta avides por antígenos próprios podem, ao invés de serem eliminadas, seguir em um processo de edição do receptor altamente autorreativo (Cancro e Kearney, 2004). Ao encontrar um autoantígeno com alta avides, a célula B, imediatamente, internaliza o BCR e entra em um período latente. Nesse momento, o BCR será editado para uma nova especificidade e, somente então, será reexpresso. Se, novamente, o linfócito B falhar nesse processo, ele entrará em morte celular e será eliminado por apoptose (Ferry e cols., 2006).

Já tolerância periférica é possivelmente regulada por um processo contínuo de reconhecimento de antígenos próprios. A mediação da atividade efetora de linfócitos na periferia ocorre de diversas maneiras, como por exemplo, deleção e/ou supressão. A deleção consiste, na maioria das vezes, na eliminação de células efetoras autorreativas por apoptose (Wells e cols., 2001). Outra forma de tolerância periférica é a estimulação de linfócitos T na ausência de coestimulação, podendo induzir uma modificação da atividade de uma célula efetora, levando-a a um estado não proliferativo, chamado por muitos de anergia, ou seja, a ausência de proliferação e produção de IL-2 pelos linfócitos (Knoechel e cols., 2006).

Atualmente, muitos esforços são direcionados para a compreensão dos mecanismos usados pelas células reguladoras no processo de indução da tolerância. O conhecimento desses mecanismos pode ajudar a determinar novos

protocolos para a indução da tolerância, seja no contexto do transplante, seja para doenças autoimunes.

1.5 Mecanismos de Imunorregulação

Através do reconhecimento de moléculas próprias e não próprias, o sistema imune contribui para manter a homeostase do organismo. No processo de tolerância imunológica o organismo mantém o estado de não agressão aos tecidos próprios em indivíduos imunocompetentes, mantendo esta homeostase fisiológica graças aos mecanismos da tolerância central e da tolerância periférica. Também é importante ressaltar que o nosso organismo mantém através dos mecanismos de tolerância periférica, um estado de tolerância a organismo alogênico, como na gestação, onde o organismo da mãe não rejeita o feto, e a microorganismos, como na simbiose entre a microbiota e a mucosa gastrointestinal. Como foi tratado anteriormente, o processo de tolerância central garante que a maioria dos linfócitos T e B adquiram tolerância a antígenos próprios durante sua maturação no timo e medula óssea, dessa forma os linfócitos T imaturos são selecionados através da interação de seus receptores (TCR) com os complexos MHC-peptídeos próprios apresentados pelas células epiteliais tímicas. Quando esse reconhecimento acontecesse com afinidade intermediária essas células recebem um sinal para sua maturação (seleção positiva), entretanto, quando esse reconhecimento se dá com forte avidez ou não há nenhuma interação essas células morrem por apoptose (seleção negativa) (revisado por Delves e Roitt, 2000). Mesmo assim, algumas células que sobrevivem ao processo de seleção negativa se diferenciam em uma subpopulação de linfócitos T CD4 que expressam na sua superfície a cadeia α (alfa) do receptor de IL-2 (CD25) e o fator de transcrição Foxp3 (*forkhead box protein P3*). Essas células são denominadas como células Treg naturais, porque são geradas naturalmente no timo (revisado por Kyewski e cols., 2006). Acredita-se que esse processo de seleção que ocorre no timo desempenha um importante papel na autotolerância dos linfócitos T, diminuindo a possibilidade de maturação e ativação de linfócitos T autorreativos com potencial de serem agressivos na periferia (Cohen, 2002). Mesmo assim, fisiologicamente um grande número de células T autorreativas faz parte do repertório de células T maduras na periferia (Cohen, 2004 e 2007).

Estas células T autorreativas, normalmente não são ativadas e não induzem autoimunidade, mostrando que existem outros mecanismos de regulação que são capazes de manter o estado de tolerância ao próprio.

Diferentes mecanismos são utilizados para evitar o desenvolvimento de uma resposta imune efetora durante o processo de tolerância periférica que, diferentemente da tolerância central, se baseia tanto em moléculas próprias quanto não próprias através da indução de um estado não-proliferativo (anergia) provocado pela ausência de sinais coestimuladores nas APCs; inibição da produção de IL-2 e proliferação das células T, assim como a deleção das células T por apoptose; modificação do tipo de resposta imunológica através da mudança na produção de citocinas inflamatórias para citocinas imunorreguladoras como, IL-4 e IL-10; apresentação de antígenos por células dendríticas imaturas ou tolerogênicas e supressão por células Treg naturais e induzidas via IL-10 e TGF- β (revisado por Wood e Sakaguchi, 2003; Dieckmann e cols., 2002; Hayday e Tigelaar, 2003; Levings e cols., 2005; Mueller, 2010).

Outro mecanismo que controla a resposta imune periférica é a apoptose de células autorreativas e de células T ativadas, essa deleção é ativada via Fas/FasL, que têm sua expressão aumentada em células T durante os processos inflamatórios e também pela ativação de moléculas pró-apoptóticas intracelulares (Watanabe-Fukunaga e cols., 1992; Davey e cols., 2002). Além disso, a expressão de moléculas inibitórias, associadas com a supressão de células T ativadas também está relacionado com a regulação da resposta imune. Dessas moléculas inibitórias, uma das mais estudadas é a molécula CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), constitutivamente expressa em células Treg, e tem sua expressão aumentada em células T que foram ativadas (Chikuma e Bluestone, 2003). Da mesma forma que a molécula CD28, o CTLA-4 liga-se as moléculas CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2), ambas expressas na superfície de APCs, mas diferente do CD28 que estimula o segundo sinal na ativação de células T naive, a ligação do CTLA-4 com a molécula B7 induz um sinal inibitório para as células T efectoras, regulando negativamente a resposta imune. Outra molécula com função inibidora é a PD-1 (*programmed cell death-1*), membra da superfamília B7-CD28, e expressa principalmente por células T CD4+ e CD8+ ativadas (Fife e Bluestone, 2008). Sua interação pode ocorrer com dois ligantes, o PD-L1 (B7-H1) e o PD-L2 (B7-DC), expressos por APCs e diversas

células parenquimais, levando a inibição da proliferação e da produção de IL-2 (Fife e Bluestone, 2008).

Outro mecanismo que afeta a tolerância periférica é a supressão da resposta imune pelas células T regulatórias, tanto Tregs naturais (Sakaguchi e cols., 1995) quanto Tregs induzidas (Chen e cols., 1994), que diferem das Tregs naturais por serem geradas a partir de estímulos antigênicos na presença de TGF- β . Ambas com a capacidade de inibir a resposta imune em excesso e possivelmente danosa ao organismo.

Apesar dos mecanismos de funcionamento das células Treg ainda não estar bem claro, sabe-se que sua atividade de dá a partir de interações célula-a-célula e suprime a resposta imune através da produção de citocinas, incluindo IL-10 e TGF- β (Dieckmann e cols., 2002; revisado por Levings e cols., 2005) .

Além disso, existem diversos dados relacionando estímulos realizados por auto-antígenos com a regulação do sistema imune. Isso explicaria porque o sistema imune responde a estímulos desses antígenos próprios (Cohen, 2007). Uma possível hipótese para a existência dessa auto-reatividade na periferia pode ser observada na teoria do “homúnculo imunológico” (Quintana e cols., 2006). A proposta desta teoria é que o repertório de células B e T auto-imunes e os receptores que reconhecem epítomos próprios criam uma imagem imune funcional das moléculas-chave corporais. Com essa imagem, o sistema imune é capaz de “monitorar” a homeostase das células pelo seu padrão de expressão de moléculas e responder a distúrbios presentes no organismo. Dessa forma, existiria um determinado grau fisiológico de auto-imunidade podendo ser importante para a manutenção da homeostase (Cohen, 2007). Mesmo assim o papel dos auto-anticorpos na regulação da resposta imune ainda é um tema ainda pouco entendido; outra hipótese é a possibilidade de que auto-anticorpos sejam capazes de desencadear uma apresentação mais eficiente de auto-antígenos às APCs. Isso possibilitaria o recrutamento de células T reguladoras para os antígenos reconhecidos pelos auto-anticorpos induzindo tolerância (Nobrega e cols., 2002).

Outra perspectiva para a auto-reatividade é a teoria da rede idiotípica que Niels Jerne elaborou em 1974. Dentro dos parâmetros desta teoria o sistema imune pode ser regulado por meio dos determinantes antigênicos presentes na região variável de imunoglobulinas. Estas regiões variáveis contêm, além dos sítios

combinatórios (paratopos), que se combinam aos determinantes antigênicos (epitopos), estruturas chamadas idiotipos (epitopos associados aos paratopos) complementares a paratopos de outros anticorpos formados pelo mesmo organismo. Dessa forma, um antígeno pode estimular a geração de um anticorpo com um sítio de ligação único (paratopo), que por sua vez, poderá ativar o sistema imune a elaborar anticorpos que reconheçam o seu sítio de ligação (anti-idiotipo). Esse anticorpo vai, então, possuir um idiotipo com uma similaridade estrutural ao antígeno. Essa cascata de reações pode se prolongar formando anticorpos anti-anti-idiotípicos. O resultado final seria a produção de uma rede de auto-anticorpos que se reconhecem e podem regular ativando ou suprimindo o sistema imune (Shoenfeld, 2004).

Ainda no campo da regulação por auto-anticorpos, outro possível mecanismo é a resposta anti-ergotípica. Ela ocorre através do reconhecimento de ergotopos pelo sistema imune (epitopos presentes em moléculas que determinam o estado de ativação de linfócitos T como, por exemplo, CD25 e Hsp60). Esse reconhecimento estaria relacionado a uma resposta na regulação pela produção de citocinas por células ativadas influenciando no processo inflamatório (Cohen, 2007). Portanto, a presença de auto-anticorpos ligantes a ergotopos de células T ativadas induziria uma inibição da ativação das células T efetoras que expressam esses ergotopos induzindo a tolerância (Zhang e cols. 2003).

1.6A Tolerância operacional

Mesmo com a presença dos casos de perda do enxerto entre os indivíduos transplantados, existe um raro grupo, chamado de “tolerante operacional”, esses sujeitos mantêm a função estável do enxerto a longo prazo, mesmo após a retirada total das drogas imunossupressoras. Esse grupo de indivíduos, que se encontra em estado chamado de “tolerância operacional”, evoluíram diferentemente dos indivíduos com rejeição crônica que tiveram perda da função do enxerto. Este fenômeno foi observado em indivíduos transplantados hepáticos (Thomson e cols., 2001; Mazariegos e cols., 2005) e também em indivíduos transplantados renais (Strober e cols., 2000; Brouard e cols., 2005). Para que possamos esclarecer os mecanismos básicos que participam da regulação da resposta inflamatória ao

enxerto, deve-se compreender melhor as diferenças imunológicas observadas entre esses grupos de indivíduos, além disso, pode-se fornecer novas bases para intervenções terapêuticas de indução de respostas imunorreguladoras, assim como para o estabelecimento de critérios de diagnóstico sobre este estado de não agressão ao órgão transplantado.

Um indivíduo é definido como tolerante operacional quando se encontrar em um estado estável de sobrevida do aloenxerto, por um período de aproximadamente 1 ano com características funcionais normais e sem a presença de drogas imunossupressoras (Roussey-Kesler et al., 2006). Outro estado considerado importante é o do “quase” tolerante, no qual indivíduos transplantados estáveis com longo tempo de transplante requerem o uso de baixas doses de imunossupressores, esses indivíduos também são chamados “estáveis” (Ashton-Chess e cols., 2006).

Como não se conhecem parâmetros clínicos preditivos confiáveis de tolerância, a retirada de imunossupressão e a observação do estado de tolerância operacional ocorrem principalmente em dois contextos. A retirada da imunossupressão devido aos efeitos colaterais causados por esses medicamentos, como por exemplo, a nefrotoxicidade e o surgimento de neoplasias. Mas na maioria dos casos, os indivíduos suspenderam o uso da imunossupressão por iniciativa própria. Após a retirada da imunossupressão, muitos indivíduos transplantados renais foram capazes de manter, por um período transitório, um funcionamento estável do aloenxerto, mas posteriormente perderam a função renal (revisado por Ashton-Chess e cols., 2006). Entretanto, outros indivíduos transplantados renais mantiveram a função estável do aloenxerto por um maior período de tempo mesmo após a retirada da imunossupressão, mostrando que o estado de “tolerância operacional” pode ser mantido (revisado por Ashton-Chess e cols., 2006).

Com o intuito de caracterizar os mecanismos imunológicos envolvidos no estado de tolerância operacional, foram observadas em trabalhos realizados nesse grupo de transplantados, uma hiporresponsividade específica ao doador através de reações leucocitárias mistas, em conjunto com a redução de citocinas da resposta Th1 e a presença de microquimerismo (Cai e cols., 2004) e a existência de anticorpos antidiotípicos capazes de inibir a resposta alogênica em cultura linfocitária mista (Miyajima e cols., 1989). Além do mais, foi mostrada uma diminuição da resposta DTH (*delayed type hypersensitivity*) contra antígenos do

doador, mediada por TGF- β e IL-10 (VanBuskirk e cols., 2000). Entretanto, também foi observada a permanência de precursores citolíticos dirigidos a antígenos HLA do doador, indicando que a tolerância no transplante humano pode ocorrer sem a perda da memória imunológica para antígenos do doador (Vandekerckhove e cols., 1990).

Sabendo que as células T reguladoras têm um papel considerável no processo de tolerância periférica, alguns grupos de pesquisa analisaram a frequência desta população celular nos sujeitos tolerantes operacionais. Não foram observadas diferenças no número absoluto de células T CD4⁺ CD25⁺ entre os transplantados hepáticos em estado de tolerância operacional e indivíduos saudáveis (Li e cols., 2004). Também foi observada uma semelhança entre o fenótipo das células do sangue periférico em indivíduos transplantados renais em estado de tolerância operacional e indivíduos sadios. Contudo, quando comparados com os indivíduos clinicamente tolerantes os sujeitos com rejeição crônica tinham uma redução de células T CD4⁺ CD25^{hi} e níveis menores de transcritos para Foxp3. Esses indivíduos com rejeição crônica também apresentaram células T CD4⁺ CD25⁻ expressando marcadores de citotoxicidade como: NKG2D⁺CD94⁺, CD57⁺CD27⁻CD28⁻ (Louis e cols., 2006), sugerindo haver um desequilíbrio entre populações reguladoras e pró-inflamatórias. Foi mostrado também que a frequência de células T CD4⁺ CD25^{hi} Foxp3⁺ (Treg) circulantes de indivíduos tolerantes operacionais era expressivamente maior quando comparados com o grupo de indivíduos com uso habitual de imunossupressores (Tokita e cols., 2008). Em um estudo realizado por nossos colaboradores, foi mostrado que os sujeitos transplantados renais tolerantes operacionais, não demonstraram diferença significativa tanto na porcentagem quanto no número absoluto de células T CD4⁺ CD25^{hi} Foxp3⁺ e CD4⁺ CD25^{Low} Foxp3⁺ em relação aos indivíduos com função estável do enxerto com baixa imunossupressão e aos indivíduos saudáveis. Entretanto, foi encontrado uma redução na população celular com fenótipo regulador nos indivíduos transplantados com rejeição crônica e nos indivíduos estáveis com doses habituais de drogas imunossupressoras (Moraes-Vieira e cols., 2010). Esses resultados sugerem que a preservação desta população celular com perfil regulador seja importante na manutenção da tolerância ao aloenxerto nos transplantes renais e hepático, corroborando com os achados da literatura. Além do

mais, em um estudo prospectivo, onde foi feita a retirada das drogas imunossupressoras em indivíduos transplantados hepáticos com função estável do enxerto, houve uma maior frequência de células T CD4+ CD25hi Foxp3+ nos indivíduos que evoluíram para um estado de tolerância operacional, em comparação aqueles indivíduos que tiveram episódios de rejeição durante o protocolo de retirada do tratamento com os imunossupressores (Pons e cols., 2008), indicando o papel importante que essa população de células T tem na indução de tolerância no transplante humano. Portanto, acredita-se que a análise das células T CD4+ CD25hi Foxp3+ possa servir como um parâmetro para identificação da evolução de indivíduos transplantados para um estado de tolerância operacional.

Ainda existem outros mecanismos de regulação da resposta imune periférica, a apresentação de antígenos por células dendríticas com perfil tolerogênico e a inibição da coestimulação através de moléculas reguladoras. Nessa mesma direção, um grande número de precursores de células dendríticas plasmocitóides 2 (pDC2) foram observados no sangue periférico de indivíduos transplantados hepáticos em estado de tolerância operacional em relação aos indivíduos que faziam uso de baixas doses de drogas imunossupressoras (Mazariegos e cols., 2003). Posteriormente, este mesmo grupo mostrou que o uso de drogas imunossupressoras como, corticosteróides, tacrolimus ou ambas, não afetou de forma significativa, a presença de subtipos das células dendríticas no sangue periférico de indivíduos tolerantes operacionais comparados com os indivíduos estáveis (Mazariegos e cols., 2005). Esses resultados sugerem que a imunossupressão, neste contexto, não interfere na expressão diferencial de subtipos de células dendríticas entre os grupos de indivíduos transplantados estudados. Outro estudo indicou que indivíduos transplantados hepáticos tolerantes operacionais e indivíduos transplantados com uso de baixas doses de imunossupressores apresentam uma maior porcentagem de pDCs em relação às células dendríticas mielóides (mDCs) no sangue periférico em relação aos indivíduos transplantados com uso habituais de imunossupressores e aos indivíduos saudáveis (Tokita e cols., 2008). Além do mais, demonstrou-se que as pDCs dos indivíduos tolerantes expressavam uma maior quantidade de moléculas inibidoras PD-1L em relação às moléculas coestimuladoras CD86 quando comparadas com aqueles do grupo de indivíduos com uso habitual de imunossupressores. Uma

significativa correlação direta foi notada entre pDC1 e células Treg apenas no grupo de indivíduos tolerantes operacionais (Tokita e cols., 2008). A partir disso, sugere-se que pDCs e células Treg participam do processo de tolerância nos indivíduos tolerantes operacionais. Uma hipótese é que as células pDCs participem da geração de células Treg na periferia, contribuindo para a manutenção do aloenxerto. Além disso, foi realizado um estudo do repertório de linfócitos T, através da análise por immunoscope da região CDR3 do receptor de célula T, em indivíduos com tolerância operacional (Brouard e cols., 2005). Comparando diferentes grupos clínicos (rejeição crônica, tolerância operacional e indivíduos com baixas doses de imunossupressores) e indivíduos saudáveis foi demonstrado que os indivíduos tolerantes operacionais, ou aqueles que usam baixas doses de imunossupressores, apresentaram um repertório com perfil de oligoclonalidade para diversas famílias V β (beta). É sugerida a ocorrência de deleção clonal, exaustão de células T alorreativas, ou ainda a expansão de células Treg neste grupo de indivíduos (Brouard e cols., 2005). Ainda quanto aos tolerantes operacionais em transplante renal, foram identificados no sangue periférico por microarray, 49 genes associados a este estado clínico, quando comparados com indivíduos com rejeição crônica e indivíduos saudáveis (Brouard e cols., 2007). A partir disso, foi sugerido um painel de expressão gênica com potencial para identificar indivíduos transplantados renais que possam desenvolver tolerância, assim como identificar indivíduos em tolerância operacional que podem evoluir para rejeição e, conseqüentemente, levando a perda do enxerto. Desses 49 genes identificados, 27 são regulados pelo TGF- β , indicando que esta citocina demonstra um papel importante na indução e/ou manutenção do estado de tolerância operacional. Entretanto, não foram observadas diferenças nos níveis séricos de TGF- β entre os indivíduos transplantados renais com tolerância operacional e os indivíduos com rejeição crônica (Brouard e cols., 2007).

Também foram analisados os padrões de expressão gênica utilizando microarray nas células do sangue periférico de indivíduos transplantados hepáticos, tolerantes operacionais e aqueles em tratamento com drogas imunossupressoras. Neste trabalho, foram identificados e validados genes capazes de discriminar indivíduos transplantados em tolerantes operacionais ou não tolerantes. Foi observada, nos indivíduos hepáticos, que assinatura específica para tolerantes é caracterizada, sobretudo pela maior expressão de genes que codificam receptores

de superfície expressos por células NK, CD8+ e células T $\gamma\delta$ (Martinez-Llordella e cols., 2008).

Em um trabalho realizado por nossos colaboradores, tendo como base a importância da diferenciação dos linfócitos T em diferentes subtipos funcionais de células T CD4+ efectoras e das vias de sinalização que participam desse processo, foram analisadas a fosforilação das vias IL-6/STAT3 e IL-4/STAT6 nas populações de células mononucleares do sangue periférico dos indivíduos transplantados renais em estado de tolerância operacional comparados com outros grupos clínicos de transplantados renais e indivíduos saudáveis. Foi mostrado que os tolerantes operacionais apresentam uma redução na ativação da via IL-4/STAT6 na região de monócitos em relação aos demais grupos estudados, sugerindo que a alteração da via de sinalização STAT6 pode ser importante no estado de tolerância operacional (Moraes-Vieira e cols., 2010).

Em outro estudo, também relacionado aos receptores celulares, foram analisadas as diferenças de transcritos de DNA para o gene TLR4 (TLR, *toll like receptors*) entre os indivíduos tolerantes operacionais, indivíduos com diagnóstico de rejeição crônica e indivíduos saudáveis (Braudeau e cols., 2008). Vale lembrar os receptores do tipo Toll (TLR) são moléculas relacionadas com a resposta imune inata (Palm e Medzhitov, 2009). No trabalho de Braudeau e colaboradores (2008) foi observado que indivíduos tolerantes operacionais e indivíduos saudáveis não apresentaram diferenças significativas, enquanto que os indivíduos com rejeição crônica apresentaram uma maior quantidade de mRNA para TLR4 em relação aos demais grupos da pesquisa. Sugerindo a participação do TLR4 no processo de rejeição crônica.

Quanto a estudos histológicos de biópsias entre indivíduos transplantados hepáticos, foram realizadas análises entre os indivíduos tolerantes operacionais, indivíduos transplantados com uso habitual de imunossuppressores e indivíduos saudáveis. Yoshitomi e colaboradores (2009) não observaram qualquer característica histológica de rejeição aguda ou crônica no grupo de tolerantes operacionais. Contudo, os indivíduos tolerantes operacionais apresentaram um grau elevado de fibrose quando comparados ao grupo de transplantados com uso de imunossuppressores, e também uma frequência maior de células T CD4+ Foxp3+ in situ. Vale observar que nenhuma correlação foi observada quando o grau de fibrose

foi comparado com o número de células T CD4+ Foxp3+, idade do receptor no momento do transplante hepático e intervalo entre o transplante de fígado e a biópsia. Também é importante ressaltar que, ao ser reiniciado o tratamento com as drogas imunossupressoras nos indivíduos tolerantes operacionais obteve-se uma melhora do grau de fibrose na maioria dos indivíduos, sugerindo que a fibrose nesse grupo possa ser devido um processo imunológico que dependente do antígeno ou mediado por TGF- β , citocina produzida pelas Treg associada ao reparo tecidual (Yoshitomi e cols., 2009).

Existem muitas informações sobre o perfil imunológico tolerante operacional em indivíduos com longo tempo de transplante de órgãos sólidos, esses estudos mostram que esses indivíduos têm um repertório imunorregulador diferenciado, mesmo assim, por se tratar de um quadro clínico raro, o número de indivíduos analisados ainda é bastante limitado. Além do mais, são encontrados resultados controversos entre diversos trabalhos, nos levando a questionar em relação à estabilidade do enxerto, quais parâmetros são confiáveis (Steinman e cols., 1994; revisado por Mathews e cols., 2003; Fehr e Sykes, 2004).

Por isso, existem propostas para o estabelecimento de parâmetros imunológicos que possam ser utilizados na retirada da imunossupressão dos indivíduos transplantados. Propostas essas que envolvem a análise em conjunto de diversos parâmetros: titulação de aloanticorpos; análise dos subtipos de células dendríticas circulantes (pDC2 e pDC1); quantificação por ELISPOT da frequência células de memória e de células T ativadas frente a antígenos do doador pela produção de determinadas citocinas; caracterização do fenótipo de células T reguladoras; entre outros (revisado por Thomson e cols., 2001; revisado por Newell e Larsen , 2006). Ressaltamos também que no contexto do transplante renal, a análise dos anticorpos presentes no plasma desses indivíduos transplantados podem também trazer informações relevantes sobre o estado de tolerância operacional.

1.7 Imunossupressão e as células reguladoras

O tratamento da rejeição pode ser feito por imunossupressão do hospedeiro, diminuição da imunogenicidade do enxerto ou pela indução de tolerância. (Cai e Terasaki, 2005b). A maioria dos imunossupressores é dirigida para as respostas das células T e consiste no uso de drogas citotóxicas, de agentes específicos ou de anticorpos anti-células T. Um dos principais imunossupressores específicos é a ciclosporina, que age bloqueando a síntese de citocinas pelas células T. A imunossupressão é comumente combinada à terapia anti-inflamatória, com agentes como os corticosteróides, que impedem a síntese de citocinas pelos macrófagos. Estudos indicam que a tolerância pode ser induzida aos antígenos do enxerto por meio de reagentes que bloqueiam a co-estimulação das células T no reconhecimento do aloantígeno (Cai e Terasaki, 2005b). Um dos principais fatores relatados na indução da tolerância imunológica dentro do contexto do transplante são as células T reguladoras (Tregs). Isto devido a sua capacidade de suprimir as respostas imunes tanto *in vitro* quanto *in vivo*. (Cohen e cols., 2004). Dentre os diversos tipos de Tregs, as células T CD4+ CD25+ conhecidas como células T reguladoras naturais são as mais estudadas, constituindo cerca de 5 a 10% do total de células T auxiliares em camundongos (Sakaguchi e cols., 1995). Essas células Tregs CD4+ CD25+, tanto murinas quanto humanas, suprimem a proliferação de células T CD4+ CD25- e CD8+ em cultura e impedem o desenvolvimento de processos inflamatórios autoimunes, em camundongos imunodeficientes, quando administradas juntamente com células T efectoras, demonstrando atividade supressora tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Piccirillo e Shevach, 2001). Estudos realizados em humanos descreveram células fenotipicamente semelhantes, formando em torno de 6% das células T CD4+ circulantes em indivíduos saudáveis (Dieckmann e cols., 2001). Mesmo assim, no contexto de transplante, o que é observado quanto à atividade das células Treg no processo de indução de tolerância está restrito somente aos modelos experimentais. Por exemplo, o aumento da população de Tregs CD4+ CD25+ naturais antígeno-específicas, foi observada *in vivo*, em modelo de transplante de pele murino, esse processo foi capaz de induzir uma imunossupressão específica protegendo o aloenxerto (Nishimura e cols., 2004). Ainda sobre as células Treg naturais, demonstrou-se que

elas possivelmente contribuem no processo de manutenção tolerância ao próprio, pois tanto em humanos quanto camundongos deficientes de Foxp3, desenvolvem doenças autoimunes (Bennett e cols., 2001, Brunkow e cols., 2001). Também foi mostrado que as células Treg (CD4+ CD25+ Foxp3+) estão envolvidas com a regulação negativa de algumas doenças autoimunes em modelos experimentais (Read e cols., 2000) e na rejeição de aloenxertos, através de mecanismos dependentes de CTLA-4, IL-10 e TGF- β (Taylor e cols., 2001; Kingsley e cols., 2002).

Entre as células Treg induzidas (aquelas que adquirem função reguladora na periferia), podemos mencionar as Tr1 (células T reguladoras tipo I), que se originam a partir de células T CD4+ naive induzidas por IL-10 (Groux et al., 1997), dexametasona e vitamina D3 in vitro (Barrat e cols., 2002). Essas células Tr1 produzem IL-10, TGF- β , IFN- γ quando ativadas pelo TCR (Chen e cols., 2003) e, in vitro, possuem uma baixa capacidade de proliferação (Bacchetta e cols., 2002). Além disso, esse subtipo celular tem a capacidade de suprimir tanto células T naive quanto células de memória Th1 e Th2 pela produção de IL-10 e TGF- β (revisado por Levings e cols., 2002; Cavani e cols., 2000). Tem sido observado, em modelos experimentais, que a diferenciação das células Tr1 pode ser regulada por células dendríticas através da produção de IL-10 (Jonuleit e cols., 2000). Além disso, células T tolerogênicas com características semelhantes às células Tr1 também podem ser geradas a partir de estímulos de células dendríticas imaturas (Levings e cols., 2005). Outra subpopulação das células Treg induzidas são as células Th3 (*T helper 3*) (Chen e cols., 1994). Inicialmente essas células foram descritas, tanto in vivo quanto in vitro, em modelos experimentais de tolerância oral e diferenciam-se em células Treg na presença de TGF- β . Demonstrou-se também que essas células são capazes de suprimir diferentes tipos de resposta imune, como Th1, Th2 e Th17 (revisado por Faria e Weiner, 2005, Mueller, 2010, Sakaguchi e cols., 2009).

Também existem relatos de células B com esta capacidade de regulação, sua ação possivelmente esta relacionada com a supressão de processos inflamatórios ou com o favorecimento de uma recuperação mais rápida da homeostase do organismo (Mizoguchi e Bhan, 2006). Estas células B regulatórias (Bregs) poderiam diminuir as respostas autoimunes e processos inflamatórios, tanto in vitro como in vivo (Lund, 2008, Mauri e Ehrenstein, 2008, Yanaba et al, 2008). Nesse processo os

mecanismos utilizados seriam a produção de IL-10 (citocina descrita como imunorreguladora), apresentação secundária de antígenos e a interação com outras células, tanto diretamente como através de anticorpos secretados (Mizoguchi e Bhan, 2006). Em um estudo realizado por Fillatreau e colaboradores (2002) camundongos portadores da doença encefalomielite autoimune experimental (EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis) apresentaram linfócitos B produtores de IL-10 envolvidos com a recuperação da doença. Teoricamente o mecanismo de ação desse tipo de célula B é dependente da interação com as células T, onde os linfócitos B apresentariam antígenos de forma a induzir uma resposta do tipo Th2, diminuindo a resposta inflamatória mediada por células da resposta imune inata. Nesse modelo, a polarização Th2 seria alcançada justamente pelas citocinas produzidas pelas células B (Fillatreau e cols., 2002). Além disso, foi observado que células B incubadas com LPS (Dalwadi e cols., 2003) ou com a proteína HSP60 humana (heat shock protein 60) (Zanin-Zhorov e cols., 2005) também produzem IL-10, mostrando uma participação no controle de respostas inflamatórias tanto a antígenos próprios como não próprios. Além disso, foi descrito em camundongos outro subtipo de células B (CD1dhi CD5+) que regula negativamente processos inflamatórios dependentes de células T, essas células tem como característica uma alta expressão de IL-10 em relação aos demais subtipos de células B (Yanaba e cols., 2008). Foi proposto que durante o desenvolvimento, maturação e expansão, dessas células Bregs são necessários sinalizações externas via TLR, BCR de forma inespecífica, e CD40/CD40L. Entretanto, a presença de células T e NKT pode não ser necessária (Yanaba e cols., 2009). Tudo isso nos leva a crer que os linfócitos B produtores de IL-10 talvez participem da regulação da resposta imune através da supressão de respostas exacerbadas e no controle de respostas autoimunes. Esse subtipo de célula B já foi descrito em humanos, muito embora sem esse papel imunoregulador (Duddy e cols., 2004), mesmo assim, em outros estudos, foram encontradas células B humanas circulantes produtoras de IL-10 (Bouaziz e cols., 2008), além de um subtipo de célula B (CD19+ CD24hi CD38hi) que apresenta capacidade reguladora após estímulo via CD40 (Blair e cols., 2010). Essas células B CD19+ CD24hi CD38hi inibiram a diferenciação de células Th1 pela secreção de IL-10, mas não por TGF- β . Blair e colaboradores (2010) reverteram sua capacidade supressora utilizando anticorpos contra as moléculas coestimuladoras CD80/86. A

princípio, esta interação via CD80/86 entre as células B e células T CD4+ atuam em conjunto com a liberação de IL-10 pelas células B, na supressão da atividade de células T CD4+ (Blair e cols., 2010).

A imunorregulação induzida pelas células B, além da produção de IL-10, também parece estar associada à produção de IgGs reativas a antígenos expressos por células apoptóticas. Estas células apoptóticas devem ser eliminadas, já que são capazes de ativar células T autorreativas afetando assim a manutenção da tolerância ao próprio. Ao eliminar os antígenos próprios potencialmente indutores de uma resposta autoimune patológica essas células B podem funcionar como células reguladoras em condições inflamatórias através da produção de IgGs reativas resultando na eliminação de potenciais indutores de uma resposta autoimune patológica (Mizoguchi e Bhan, 2006).

Quanto ao papel regulador das células B na indução de tolerância no contexto do transplante de medula óssea foi observado que camundongos células B deficientes do gene de IL-10 desenvolvem uma forma mais grave de GVHD (graft versus host disease) do que camundongos com células B capazes de produzir IL-10 (Rowe e cols., 2006). Essas células B produtoras de IL-10 atuam diminuindo a proliferação das células T CD4+ e suprimindo a diferenciação de células Th1, inibindo assim o desenvolvimento de GVHD (Rowe e cols., 2006).

Ainda existem poucos estudos envolvendo a indução de tolerância ao transplante e o papel regulador das Bregs. Novas investigações sobre o papel das células B reguladoras no contexto do transplante podem nos fornecer caminhos para o desenvolvimento de estratégias de indução da tolerância em indivíduos transplantados

1.80 repertório de imunoglobulinas circulantes como um marcador fisiológico

Como foi observado anteriormente, o repertório de imunoglobulinas circulantes encontrados em um dado indivíduo é resultado de diversos fatores associados a variações de origem genética e ambiental (revisado por Delves e Roitt, 2000). Portanto o estado fisiológico pode modular o repertório imune, e a reatividade a determinados antígenos pode servir de marcador para um dado estado patogênico

ou de homeostasia (Mintz e cols., 2003; Quintana e cols., 2004). Vários estudos abordaram esse tema e incluíram um aspecto preditivo, onde mudanças no repertório de reatividade poderiam prever o aparecimento de algumas enfermidades, como doença de Alzheimer (Reddy, 2010) influenza (Legutki, 2010), infecção por nematóides (Bongartz, 2009) ou diabetes autoimune em camundongos susceptíveis (Quintana e cols., 2004). Além disso, estudos realizados por Quintana e colaboradores (2004 e 2006) e Cohen e colaboradores (2002, 2004 e 2007) mostraram que, com base na reatividade do soro dos indivíduos testados a um conjunto de antígenos randômicos (imunochip), foi possível distinguir com antecedência, se um animal iria ou não desenvolver diabetes. Esse conceito se insere no modelo do “homúnculo imunológico” (Quintana e cols., 2006 e Cohen, 2007), no qual a reatividade do sistema imune é uma forma de “ver” o mundo antigênico, e o conjunto de antígenos reativos pode ser utilizado como um “classificador” do estado imunológico.

Pacientes transplantados normalmente são tratados com drogas imunossupressoras que permitem a tolerância ao aloenxerto. Após um determinado tempo de tratamento, é possível definir três grupos distintos: indivíduos que precisam continuar tomando altas imunossupressores para tolerar o enxerto; indivíduos que conseguem um estado de “quase tolerância”, ou seja, necessitam das doses habituais ou até mesmo menores doses de medicamentos imunossupressores; e um terceiro grupo que dispensa essas drogas atingindo o estado conhecido como “tolerância operacional”, isto é, esses indivíduos convivem com o aloenxerto sem desenvolver resposta imune adversa. Como tratado anteriormente, a definição desse estado implica na sobrevivência estável do órgão transplantado por um longo período, demonstrando características histológicas e funcionais normais em um receptor não imunossuprimido (Ashton-Chess e cols., 2006).

A principal questão neste trabalho é explorar quais fatores humorais poderiam estar relacionados ao reconhecimento do aloenxerto como algo próprio, ou tornar o sistema imune menos ou mais responsivo ao órgão transplantado. Esperamos que partindo da análise do perfil imunológico de pacientes transplantados renais possamos identificar padrões de reatividade imune associados ao estado de tolerância operacional ou rejeição crônica.

Esperamos que analisando o padrão de reatividade das imunoglobulinas IgM e IgG, contra o conjunto de antígenos diversos reconhecidos por elas, e cruzando os dados dos grupos experimentais dos pacientes com longo tempo de transplante, consigamos encontrar padrões de reconhecimento diferenciais entre esses quatro grupos de indivíduos (tolerantes operacionais, estáveis, rejeição crônica e saudáveis).

Esse projeto faz parte do projeto multicêntrico “Estudo do perfil imunológico regulador em pacientes com longo tempo de transplante de órgãos sólidos, em estado de tolerância operacional” e está contido dentro de um dos projetos do Instituto de Investigação Imunológica, iii – INCT (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia) Instituto do Milênio, CNPq (420166/2005 - 0), coordenado pelo Prof. Dr. Jorge Kalil (InCor). Este projeto multicêntrico tem por objetivo investigar o perfil global das respostas imunes celular e humoral, assim como o perfil proteômico e imunogenômico diferencial nos distintos grupos clínicos de pacientes transplantados. Nosso papel nesse projeto, é a investigação dos fatores humorais envolvidos, isto é, os padrões de reatividade a anticorpos relacionados ao estabelecimento da tolerância.

Contamos também com a colaboração da Dra. Michal Or-Guil coordenadora do *Systems Immunology Research Group* do *Institute for Theoretical Biology* da *Humboldt University* de Berlin onde foi avaliado o perfil imunológico do soro dos pacientes utilizando a técnica de microarranjo peptídico e posteriores análises computacionais e estatísticas estabelecidas pelo grupo da Dra. Or-Guil (Weiser e cols., 2005 e Tapia e cols., 2007).

Desta forma, procuramos apontar possíveis marcadores precoces que possam caracterizar o desenvolvimento do estado da tolerância que esses pacientes conseguem desenvolver, tanto de tolerância operacional, quase tolerância ou não-tolerância. A caracterização desses marcadores pode contribuir para o prognóstico do desenvolvimento dessa tolerância, ou mesmo em um futuro, colaborar para o surgimento de terapias mais eficazes contra a rejeição crônica do enxerto.

Justificativa

“Tudo o que vale ser feito, vale ser bem feito”

Baden Powell

Fundador do movimento Escoteiro

2. JUSTIFICATIVA

O repertório imune e a reatividade a determinantes antígenos pode mudar de acordo com o estado fisiológico associado a variações de origem genética e ambiental de cada indivíduo, e as moléculas presentes neste repertório podem servir de marcadores para o estado patogênico ou de homeostasia (Mintz *et al.*, 2003; Quintana *et al.*, 2004). Por isso propomos o estudo da reatividade de imunoglobulinas (IgM e IgG) em pacientes renais transplantados afim de encontrar um padrão na resposta imune humoral destes pacientes que nos levam a um possível modelo imunoregulatório para a progressão ou não para o estado de tolerância operacional e/ou rejeição crônica.

Para a análise de reatividade foram utilizadas duas técnicas distintas que avaliam a reatividade de peptídios, a apresentação de peptídeos na superfície de fagos (*phage display*) e o microarranjo peptídico (*peptide microarray*). No *phage display* esperamos estabelecer um protocolo de análise global dos anticorpos do plasma ao invés de encontrar os melhores ligantes como usualmente a técnica é utilizada, já no microarranjo peptídico faremos uma análise individual de cada plasma testando sua reatividade contra o mesmo conjunto de peptídios fusionados na superfície do microchip.

Objetivos

*“A tecnologia ensinou uma lição à humanidade:
nada é impossível”*

Lewis Mumford

Filósofo Estadunidense

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o perfil de reatividade das imunoglobulinas IgM e IgG no plasma de pacientes renais transplantados com longo tempo de transplante. Visando identificar padrões de reconhecimento e contribuir para a compreensão de mecanismos envolvidos no estado de tolerância e rejeição crônica.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar as imunoglobulinas IgG e IgM assim como a proteína total presente no plasma dos indivíduos dos grupos experimentais;
- Analisar o padrão de ligação das imunoglobulinas IgM e IgG, nos grupos experimentais, utilizando *phage display* como painel de reconhecimento.
- Analisar o padrão de ligação das imunoglobulinas IgM, nos grupos experimentais, utilizando microarranjo peptídico como painel de reconhecimento.
- Estabelecer o protocolo de seleção de fagos reativos aos anticorpos presentes no plasma dos grupos experimentais, utilizando como modelo os protocolos dos manuais: *Phage display: A laboratory Manual* (Barbas et al, 2001) e *Ph.D.TM Phage Display Libraries Instruction Manual* (New England Biolabs Ph.D.-12 #E8110S)
- Identificar potenciais peptídeos reconhecidos pelo repertório das imunoglobulinas IgG e IgM nos grupos de estudo *phage display*.
- Identificar potenciais peptídeos reconhecidos diferencialmente pelo repertório das imunoglobulinas IgM nos grupos de estudo utilizando microarranjo peptídico.
- Validar a metodologia de microarranjo peptídeos utilizando os anticorpos IgM presentes no plasma dos sujeitos da pesquisa.

Materiais e Métodos

*“Mestre não é quem sempre ensina,
mas quem, de repente, aprende”*

João Guimarães Rosa

Escritor Brasileiro

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Sujeitos da pesquisa

Foram analisados quatro grupos de indivíduos: Um grupo de indivíduos saudáveis (doadores de rim) e três grupos de indivíduos transplantados renais, conforme mostrado abaixo.

- **Grupo OT (Tolerância Operacional):** Indivíduos estáveis com longo tempo de transplante (mais de um ano de transplante), sem uso de drogas imunossupressoras há pelo menos um ano.
- **Grupo CR (Rejeição Crônica):** Indivíduos com longo tempo de transplante (mais de um ano de transplante) com rejeição crônica (diagnóstico por biópsia com os critérios de classificação das patologias do rim transplantado – Banff)
- **Grupo ST (Estáveis):** Indivíduos com longo tempo de transplante (mais de um ano de transplante) que apresentam um quadro clínico estável (indicado pela clínica) quanto ao estado inflamatório renal. Estes indivíduos se encontram utilizando doses habituais de imunossupressores.
- **Grupo HE (Saudáveis):** Indivíduos sadios doadores renais.

Os indivíduos do presente estudo provêm de dois centros integrantes do estudo multicêntrico em tolerância operacional. No total, são quatro indivíduos provenientes do Rio Grande do Sul (PUC-RS) e 19 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As informações clínicas dos pacientes transplantados renais (anexo III) foram obtidas no prontuário eletrônico do Serviço de Transplante Renal do HCFMUSP e no serviço de transplante renal do Hospital São Lucas da PUC-RS com auxílio dos colaboradores clínicos do projeto.

Todos os sujeitos de pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I). Demais dados demográficos sobre os indivíduos utilizados na

pesquisa estão disponíveis no anexo III, assim como o documento de aprovação do projeto pelo comitê de ética (Anexo II).

Os indivíduos HE, os saudáveis, são doadores de pacientes transplantados renais no HCFMUSP. Os critérios de seleção do grupo HE foram: indivíduos com a idade semelhante aos demais grupos de estudo; indivíduos que não fizeram uso de qualquer medicamento por pelo menos um mês antes da coleta; e indivíduos saudáveis no momento da coleta e que não possuem doenças crônicas. Adotamos como critério de exclusão do estudo os indivíduos com qualquer tipo de neoplasia prévia e aqueles com diagnóstico de infecção urinária no momento da coleta de urina.

Tabela 01. Dados demográficos e clínicos sobre os grupos de estudo^a

Grupos de estudo	ST	CR	OT	HE
Tamanho (n)	8	8	5	9
Sexo (m, f)	4,4	6,2	3,2	4,5
Idade (anos)	50 ± 6	46 ± 12	43 ± 9	38 ± 8
Faixa etária (anos)	40 - 56	28 - 64	31-54	30 - 52
Tempo desde o transplante (anos)	9 ± 7	11 ± 3	16 ± 9	n/a
Doador (vivo, morto)	6,2	3,5	4,1	n/a
HLA (A, B, DR) Disparidades	3,87 ± 1,24	4,57 ± 1,98 (n=7) n/a = 1	0 (n=2) 3 (n=2) 4 (n=1)	n/a
Transfusão de sangue (S, N)	4,2	3,1	2,2	n/a
Episódio de rejeição aguda (Y, N)	3,5	5,3	1,4	n/a
Infecções virais (S,N)	2,4	4,2	1,2	n/a
Tempo sem o uso de medicamento (anos)	n/a	n/a	4,7 (1,5-8)	n/a

^aOs grupos de estudo em tratamento com imunossupressores (ST, indivíduos com função estável do enxerto; CR, indivíduos com rejeição crônica) e os grupos que não estão sob tratamento de imunossupressores (OT, indivíduos tolerantes operacionais; HE, voluntários saudáveis); m, masculino; f, feminino; n/a, não se aplica; S/N, sim/não. Os dados numéricos são dados como média ± desvio padrão (SD). Para mais detalhes sobre os dados clínicos dos sujeitos da pesquisa veja Anexo III

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

No grupo CR, os indivíduos com rejeição crônica tiveram o seu diagnóstico confirmado por biópsia renal que foi analisada de acordo com a classificação histopatológica do rim transplantado – Banff 1997 (Racusen e cols., 1999). Nesta

classificação de 1997, o termo rejeição crônica era englobado dentro da terminologia nefropatia crônica do transplante. Em todos os pacientes incluídos neste grupo, nas biópsias renais foram observados achados histopatológicos de fibrose intersticial e atrofia tubular, além de fibrose vascular e neoproliferação intimal. Além disso, dispúnhamos da pesquisa de C4d pelas técnicas de imunofluorescência ou imunoperoxidase. Desta maneira, pudemos classificar as biópsias como, rejeição crônica mediada por células T ou por anticorpos, segundo a classificação de Banff-2005 (Solez e cols., 2007).

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

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

4.1.2 Anticorpos para captura

Foi feito um teste ELISA de ligação direta para selecionar os anticorpos que tivessem melhor grau de ligação as moléculas de IgG ou IgM. Para a padronização deste experimento as placas foram sensibilizadas com moléculas de IgG e IgM disponíveis comercialmente.

Contra os poços que foram sensibilizados com IgG humana foram usados os anticorpos Ab 07, Ab 19, Ab 71 e Ab 20 (Tabela 02). Já nos poços sensibilizados com IgM humana foram utilizados os anticorpos Ab 70 e 72, sendo que foram utilizadas duas alíquotas diferentes do Ab 70 (Tabela 02). Os anticorpos testados foram utilizados em duas titulações diferentes: 1:2.500 e 1:10.000. Para as sensibilizações utilizaram-se três concentrações distintas de IgG e IgM humanas: 1ug, 0,5ug e 0,1ug.

Para a revelação foram utilizados o Ab 03 contra os anticorpos feitos em coelho e o Ab 13 contra os anticorpos feitos em cabra, ambos utilizados na titulação 1:5.000. Não foi necessário o uso de anticorpos secundários contra o Ab 19 e o Ab 72 pois já são conjugados a fosfatase alcalina.

Tabela 02. Anticorpos utilizados para o teste de captura

CÓDIGO	DESCRIÇÃO	MARCA	NÚMERO DE CATÁLOGO
Ab 03	Anti-IgG de coelho feito em cabra conjugado a fosfatase	Sigma	A3687
Ab 07	F(ab') ₂ Anti-IgG humana (H+L) feito em cabra	KPL	215-1006
Ab 13	Anti-IgG de cabra feito em coelho conjugado a fosfatase	Pierce	31300
Ab 19	Anti-Fc humano feito em cabra conjugado a fosfatase alcalina	Sigma	A9544
Ab 20	Anti-Fc humano feito em coelho	Sigma	I9135
Ab 70	Anti-IgM humana feito em cabra	Thermo Sc.	31136
Ab 71	Anti- IgG humana (H+L) feito em cabra	Thermo Sc.	31119
Ab 72	Anti-IgM humana feito em cabra conjugado a fosfatase	Sigma	A3437
IgM	IgM Humana	Sigma	I8260
IgG	IgG Humana	Sigma	I4506

* usado como anticorpo secundário contra o anticorpo Ab 20.

** usado como anticorpo secundário contra os anticorpos Ab 07, Ab 70 e Ab 71.

4.1.3 Biblioteca de peptídeos apresentados em fagos

O isolamento dos peptídeos reativos aos anticorpos dos indivíduos transplantados foi feito a partir da biblioteca de peptídeos apresentada em fago pH.D.12 (#E8110S) disponível comercialmente (*New England Biolabs, USA*).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Desenho experimental

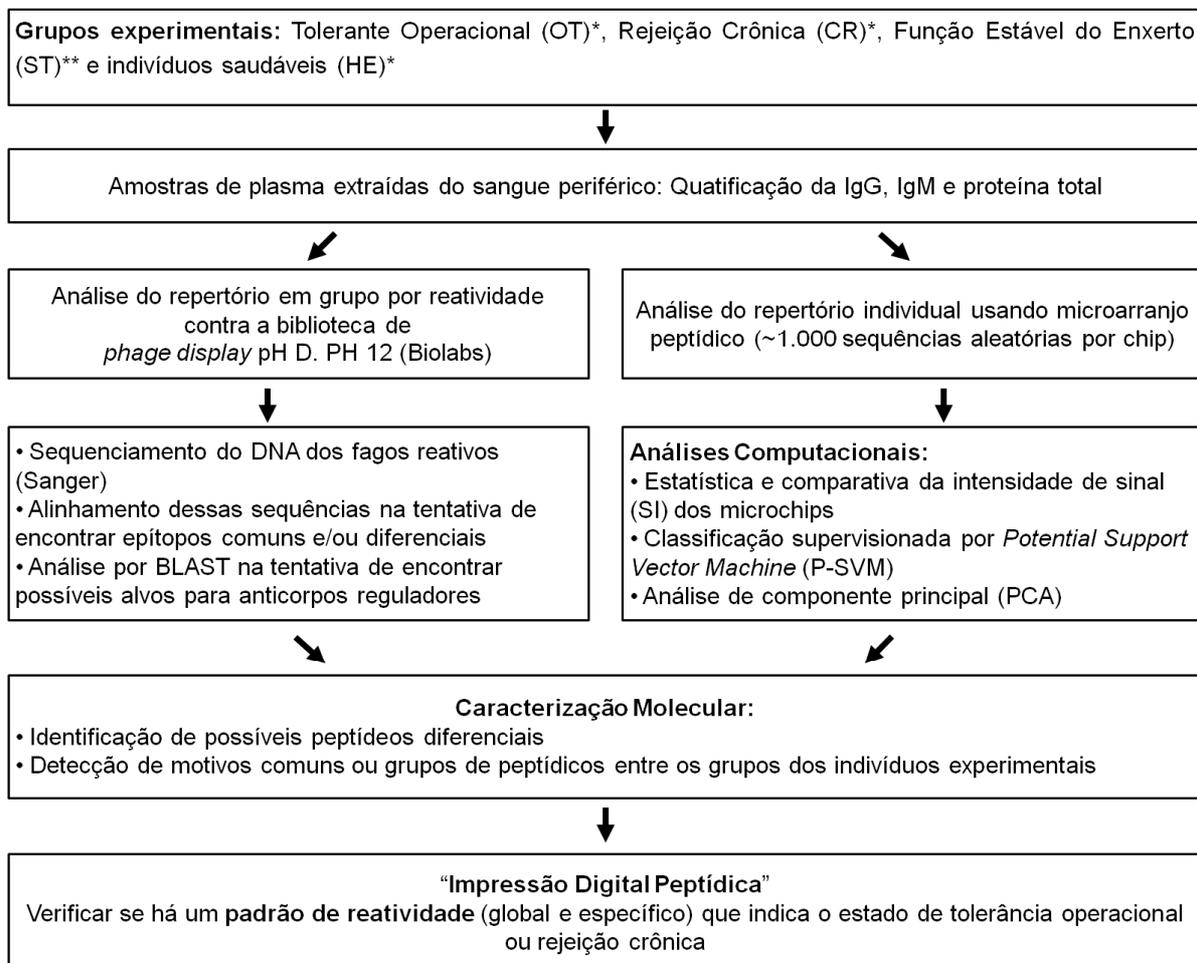


Figura 01. Representação esquemática dos passos metodológicos utilizados. (*) Grupos experimentais utilizados nos experimentos de phage display, foram selecionados quatro indivíduos de cada grupo para serem trabalhados em conjunto (pool); (**) Grupos experimentais utilizados nos experimentos de microarranjo peptídico, todos os indivíduos analisados.

4.2.2 Preparação das IgGs e IgMs para o *phage display*

O plasma de cada paciente/doador foi incubado durante uma hora com a biblioteca de peptídeos apresentada em fagos. Optou-se por trabalhar com um pool de indivíduos em cada seleção, por isso foram selecionados quatro plasmas de indivíduos diferentes para cada grupo de pesquisa. Indivíduos tolerantes operacionais: Ltx03, Ltx08, Ltx10 e Ltx62; Indivíduos rejeição crônica: Ltx04, Ltx06, Ltx13 e Ltx25; Indivíduos saudáveis: Ltx15, Ltx18, Ltx36 e Ltx44.

4.2.3 Seleção dos fagos reativos

O conjunto biblioteca de fagos mais plasma de paciente foi selecionada por adsorção em anticorpos anti-IgG ou IgM humana gerando um conjunto de fagos reativos com o repertório de IgG e outro com o repertório de IgM.

Os anticorpos anti-IgG e IgM humana foram adsorvidos em um placa de microtitulação de 96 poços. Logo após o bloqueio com BSA 5% o conjunto biblioteca de fagos mais anticorpos dos indivíduos transplantados foi incubado para que houvesse a captura dos anticorpos ligantes ao repertório de peptídeos apresentados na biblioteca de fagos.

Após a incubação o excesso de fagos foi retirado, sendo estes fagos que não ligaram denominados subtraídos. Os fagos que permaneceram ligados foram eluídos com tampão ácido e estes foram chamados eluídos.

O plasma dos indivíduos saudáveis foi utilizado para subtrair da biblioteca original os fagos que eram reconhecidos por alvos desses indivíduos. Os fagos subtraídos dos indivíduos normais foram utilizados para a seleção dos indivíduos tolerantes e rejeição crônica. Desta maneira os anticorpos de indivíduos normais subtraem da biblioteca comercial os peptídeos ligantes a este grupo de pacientes, diminuindo assim a probabilidade de ligação entre os anticorpos dos indivíduos TO ou RC de se ligar a peptídeos específicos reativos aos indivíduos saudáveis.

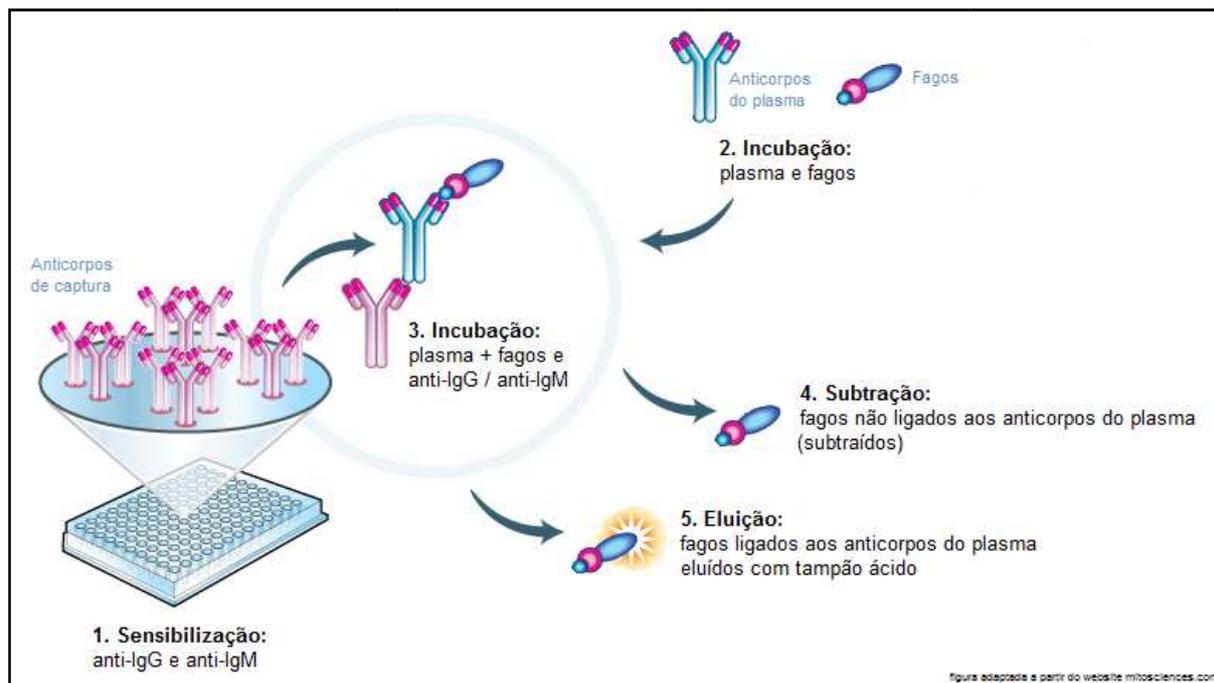


Figura 02. Esquema de seleção dos fagos reativos. O pool de plasmas de cada grupo de indivíduos foi incubado juntamente com a biblioteca de peptídeos apresentada em fagos. Os anticorpos anti-IgG e anti-IgM humana foram adsorvidos em um placa de microtitulação de 96 poços. Logo após o bloqueio o conjunto biblioteca de fagos mais anticorpos dos pacientes transplantados foi incubado para que houvesse a captura dos anticorpos ligantes ao repertório de peptídeos apresentados na biblioteca de fagos. Após a incubação os fagos não ligados foram retirados, sendo estes denominados subtraídos. Os fagos que permaneceram ligados foram eluídos com tampão ácido e denominados eluídos.

4.2.4 Titulação dos fagos selecionados

Os fagos eluídos e subtraídos são amplificados e plaqueados em várias diluições para que seja feita a titulação. As placas de retardo de crescimento são então pinçadas e cultivadas em placas Deep Weel para posterior extração de DNA de fago. Este DNA foi então sequenciado.

4.2.5 Sequenciamento automático do DNA dos fagos selecionados e análises das sequências obtidas

O DNA dos fagos selecionados foi sequenciado utilizando-se o sequenciador automático MegaBACE 500Plus (Molecular Dinamics®). Eram utilizadas de 150 a 200 ng de DNA, 10 picomoles do oligonucleotídeo apropriado.

As sequências obtidas por meio do sequenciamento automático eram analisadas, utilizando-se ferramentas de bioinformática: Phred e CAP3 disponíveis na página: www.biomol.unb.br. Depois da análise de qualidade, as seqüências eram manipuladas para a obtenção do reverso complemento e posterior tradução *in silico*. O peptídeo era localizado devido à presença de dois espaçadores que flanqueiam a sequência peptídica de interesse, VPFYSHS e GGSAE. O programa para estas análises foi desenvolvido em Pearl pelos alunos do laboratório de bioinformática Halian Vilela e Paulo Alvarez (Anexo IV).

As sequências foram submetidas à ferramenta de procura de alinhamentos básicos locais (BLAST, *basic local alignment search tool*, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para análise de identidade com sequências já depositadas no GenBank. As sequências também eram manipuladas e analisadas com sequências depositadas em um banco de dados pessoal utilizando o programa BioEdit Sequence Aligment Editor (Hall, 2007).

Para verificação da distribuição dos aminoácidos codificados pelas sequências analisadas eram utilizadas ferramentas presentes na página WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>). O WebLogo é um aplicativo capaz de criar uma representação gráfica de um alinhamento múltiplo de aminoácidos ou ácidos nucléicos. Cada gráfico é composto por pilhas de símbolos, uma pilha para cada posição na seqüência. A altura total indica a conservação da sequência naquela posição, enquanto que a altura dos símbolos indica a frequência relativa de cada aminoácido ou nucleotídeos naquela posição, medida em bits (Crooks et. al., 2004).

Também foram usadas ferramentas disponíveis no programa EMBOSS (*European Molecular Biology Open Software Suite* - <http://bioinfo.nhri.org.tw/cgi-bin/emboss>). O EMBOSS é um *software* livre de análise especialmente desenvolvido para as necessidades da biologia molecular. O software trabalha automaticamente com os dados em uma variedade de formatos e integra uma gama de pacotes disponíveis e ferramentas para análise de sequências. Dentre esses pacotes, foram usados programas de análises e predição de estruturas secundárias, composição, motivos e assinaturas de famílias protéicas e ponto isoelétrico (Rice e Bleasby, 2000).

4.2.6 Tecnologia de microarranjo peptídico

O soro dos indivíduos também foi analisado utilizando o microarranjo peptídico utilizado pelo grupo de pesquisa da Dra.Or-Guil. As amostras foram levadas para *Humboldt University* em Berlin onde avaliamos o padrão do perfil peptídico/imunológico do soro de cada paciente utilizando a técnica de *peptide microarray technology*. As análises matemáticas/estatísticas comparativas desta técnica foram de acordo com os protocolos utilizados correntemente pelo grupo da Dra. Or-Guil (Weiser e cols., 2005 e Tapia e cols., 2007). Para a realização destes experimentos foi aplicada uma bolsa do tipo sanduíche.

A técnica do microarranjo peptídico consistiu na hibridização de peptídeos na superfície de um microchip. Esses microchips foram adquiridos através do contato da Dra. Orguil com a empresa Pepscan Presto (RC Lelystad, Holanda). Os microchips foram então incubados com o plasma dos indivíduos dos grupos experimentais, que continha os anticorpos a serem analisados, conforme descrito no item 4.2.9 de métodos. Anticorpos conjugados com a fluorescência Alexa647 foram utilizados para a detecção da ligação dos anticorpos presentes no plasma. A partir dessa ligação pode-se inferir a afinidade dos anticorpos presentes no plasma aos peptídeos fusionados ao microchip, testando assim quais peptídeos são detectados preferencialmente em cada um dos indivíduos experimentais.

4.2.7 Quantificação das imunoglobulina IgG e IgM dos sujeitos da pesquisa por ensaio imunoenzimático (ELISA).

A IgG e IgM do plasma do sujeitos da pesquisa foram medidas de acordo com as instruções do fabricante dos kits quantificação de IgG e IgM humanas (BethylLabs, Montgomery, TX). As placas de 96 poços EIA (Sigma, Monique, Alemanha) foram revestidas com 10 ug/ml do anticorpo de cabra anti-IgM humana ou cabra anti-IgG-Fc humana e bloqueadas com TBS com BSA 1%.

As pré-diluições dos padrões, controles e amostras dos grupos de estudo, foram incubadas a 4° C durante a noite. Após sucessivas lavagens, os anticorpos ligantes foram detectados utilizando 10 ug/ml do anticorpo de cabra anti-IgM

humana ou IgG-Fc ambos conjugados com peroxidase (HRP). Os ensaios foram revelados com o substrato TMB e lidos por um leitor Tekan a 450nm. As curvas padrão foram estabelecidas a partir do soro humano de referência (IgG e IgM). Todas as amostras foram medidas em duplicata e os ensaios incluíram o controle de um pool de soro humano (Lonza, Verviers, Bélgica). O R2 dos quatro parâmetros da curva padrão foi igual ou maior que 0,996 e a OD mensurada no branco foi menor que 0,15 para todas as placas EIA. Quando a porcentagem do coeficiente de variação da mensuração da duplicata excedia 10, a amostra era dosada novamente.

4.2.8 Quantificação da proteína total (BCA)

A proteína total do soro plasma foi determinada pelo ensaio *Pierce's BCA protein* (Fisher Scientific, Schwerte, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante e usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. As pré-diluições dos padrões, controles e amostras dos grupos de estudo foram misturadas com a *working solution* do kit BCA numa proporção 1:8, e foram incubadas em placas de 96 poços EIA a 37 °C por 30 min. Após o arrefecimento, a absorbância foi mensurada a 560nm em um leitor Tekan XY. Todas as amostras foram mensuradas em duplicata.

4.2.9 Ensaio de microarranjo peptídico - *Peptide Microarray Probing*

Os chips de microarranjo peptídico foram adquiridos da empresa Pepscan Presto (RC Lelystad, Holanda). Cada microarranjo foi dividido em três subarranjos exibindo a mesma biblioteca contendo 1.000 peptídeos aleatórios (942 15-mers, 16x YGGFL, 2x RRPYIL, 2x RPPGFSAFK and 4x RPPGFSPFR). A distribuição de aminoácidos dos peptídeos foi aleatória com exceção do aminoácido cisteína que foi excluído. Todas as incubações dos arranjos peptídicos foram realizadas automaticamente em uma estação de hibridização TECAN (4800HS Pro, TECAN, Salzburg, Áustria). Inicialmente os chips foram bloqueados com PBS/BSA 1% (p/v) por 30 min. e lavados em PBS contendo 0,05% Tween-20 (PBST) antes da injeção da amostra. As amostras foram incubadas durante duas horas, em um volume total 180uL por amostra, em uma diluição de 1:10 em PBS/BSA 1% cada. Os chips foram

lavados com PBST e os anticorpos ligantes foram detectados utilizando 180uL do anticorpo anti-IgM humana conjugado a Alexa647 (20 µg/ml; Invitrogen, Darmstadt, Alemanha). Após uma incubação de uma hora, os chips foram consecutivamente lavados em PBST (3x), tampão salino de citrato de sódio (SSC) (2x) e água destilada (1x). Finalizando, todos os chips foram secos por centrifugação a 1.500 rpm por dois minutos. Todas as incubações e passos de lavagens foram realizados a 30°C. Juntamente com as incubações das amostras, foram utilizados um branco e cinco repetições de um indivíduo normal (Ltx36) como controles, respectivamente da influência da detecção da IgM humana e da variabilidade tecnológica do ensaio.

4.2.10 Aquisição e processamento de dados

Os Microarranjos foram escaneados usando um Scanner GenePix 4200AL Microarray (Molecular Devices GmbH, Ismaning, Alemanha) a um comprimento de onda de 635 nm. O software GenePix Pro 6.0 foi usado para a geração automatizada de arquivos de imagem com uma resolução de 10 µm e posterior análise dessas imagens. O posicionamento dos *spots* (microambiente ou ponto de incubação do microchip onde ocorre a interação do peptídeo com os anticorpos do plasma ou com os controles) e do *grid* de análise (grade onde o software posiciona os *spots*) foi feito de forma semi-automática, por meio do software GenePix Pro 6.0 e a intensidade do sinal (SI) de cada *spot* foi quantificada levando em conta a intensidade média de todos os pixels nas regiões circulares em torno do centro do *spot*.

4.2.11 Análise de dados e estatística

A média da intensidade de sinal (SI) dos *spots* foi determinada usando uma função de leitura de dados implementada no ambiente R (R-Development-Core-Team. 2011). A média da SI foi cruzada nos sub-arrays (n=3) e calculada para cada peptídeo (n=942). Os dados quantitativos foram testados quanto a normalidade usando o teste coletivo de normalidade D'Agostino-Pearson. A associação entre variáveis nos conjuntos de dados foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) e regressão linear. Diferenças significativas entre os grupos de estudo foram determinadas pelo teste Kruskal-Wallis ANOVA com Dunn's post-test ou

Mann-Whitney U test. Kruskal-Wallis ANOVA with Dunn's post-test or Mann-Whitney U test. Os níveis de significância foram fixados em $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$ e $P \leq 0,0001$.

4.2.12 PCA e P-SVM

Análise de componente principal não-supervisionado (PCA – *principal component analysis*) foi feito no ambiente estatístico R usando o pacote PCA-métodos (R-Development-Core-Team. 2011). A principal função do método PCA é a análise dos dados usados visando sua redução, eliminação de sobreposições e a escolha das formas mais representativas desses dados a partir de combinações lineares das variáveis originais.

Foi inventado por Pearson (1901) e Hotelling (1933) e, provavelmente, é o método multivariado mais utilizado e conhecido de redução de dados, sendo muito utilizado no reconhecimento de padrões, ou seja, é uma maneira de identificar a relação entre as características extraídas dos dados. É bastante útil quando os vetores de características têm muitas dimensões e quando uma representação gráfica não é possível, mas também pode ser útil em dimensões menores.

A classificação de dados supervisionados, foi realizada utilizando uma implementação do algoritmo P-SVM (*Potential Support Vector Machine*) (Hochreiter e Obermayer, 2006) em R. O P-SVM é uma técnica para a análise de dados que possivelmente contenham uma dualidade antagônica, onde dois conjuntos de dados são caracterizados por uma matriz de valores numéricos que descrevem suas relações mútuas. Esta técnica é um método para a construção de classificadores e funções de regressão para os dados analisados.

Ao contrário da abordagem utilizada no SVM tradicional, o P-SVM minimiza a medida de capacidade em escala invariante e requer um novo conjunto de restrições. Como resultado, o método de P-SVM leva a uma expansão normalmente escassa das funções de classificação e regressão em termos da linha, em vez de os objectos de coluna e pode manipular os dados e as matrizes do kernel que não são nem definida positiva nem quadrado.

Hochreiter e Obermayer (2006) descrevem dois esquemas de regularização complementares. O primeiro esquema melhora o desempenho de generalização

para tarefas de classificação e de regressão; o segundo esquema leva à seleção de um pequeno conjunto informativo de objectos de suporte em linha e pode ser aplicado na seleção das características. Parâmetros de referência, para a classificação, regressão, e tarefas de seleção de características são realizados tanto com os dados de teste (*toy data*) quanto como os vários conjuntos de dados (*real-world data*) a serem analisados.

Resultados

*“Não se preocupe em entender.
Viver ultrapassa todo entendimento.
Mergulhe no que você não conhece”*

Clarisse Linspector

Escritora Brasileira

5. RESULTADOS

5.1 ELISA de ligação direta

Conforme descrito no item 4.1.2 de materiais e métodos foi feito o teste do tipo ELISA de ligação direta para a detecção dos anticorpos que foram utilizados na captura dos anticorpos presentes no plasma dos sujeitos da pesquisa (fig.03 e 04).

A figura 03 mostra a ligação dos anticorpos (tabela 02) a placa sensibilizada com IgG humana, todos os anticorpos ligaram-se a IgG sensibilizada na placa, inclusive aqueles que tem como alvo a IgM com exceção do Ab 72. Já a figura 04 mostra a ligação dos anticorpos a placa sensibilizada com IgM humana, todos os anticorpos ligaram-se a IgM sensibilizada na placa, inclusive aqueles que tem como alvo a IgG com exceção do Ab 19.

Para a verificação de respostas cruzadas os anticorpos inicialmente utilizados contra IgG humana também foram testados contra IgM humana e vice-versa. A figura 03 apresenta a ligação dos anticorpos a placa que foi sensibilizada com IgG humana enquanto que a figura 04 apresenta a ligação dos anticorpos que se ligaram a placa sensibilizada com IgM humana.

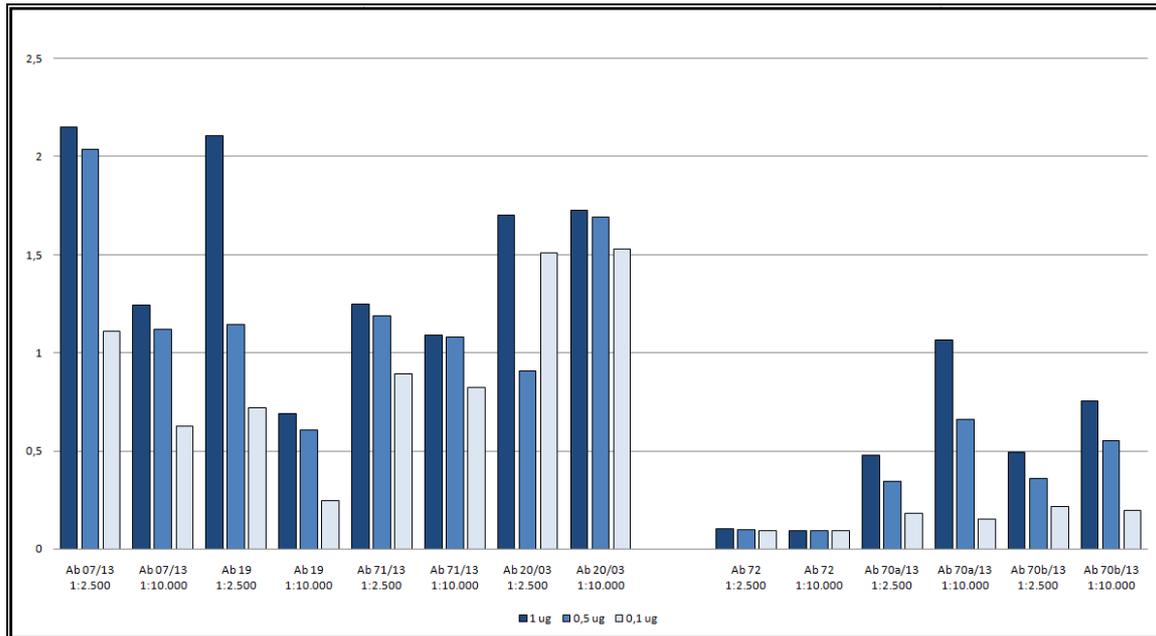


Figura 03: Imunoensaio enzimático de ligação direta (ELISA) a IgG humana comparando a atividade ligante dos diferentes anticorpos. A placa de microtitulação foi sensibilizada com IgG humana em três concentrações distintas (1ug, 0,5ug e 0,1ug), bloqueada com 3% BSA e logo após foi incubado com os anticorpos de interesse (Ab 07, 19, 20, 70a, 70b, 71 e 72) em duas titulações diferentes (1:2.500 e 1:10.000). As proteínas de interesse foram detectadas com os anticorpos Ab 03 (anti-IgG de coelho feito em cabra conjugado a fosfatase alcalina) para os anticorpos feitos em coelho e o Ab 13 (anti-IgG de cabra feito em coelho conjugado a fosfatase alcalina) para os anticorpos feitos em cabra, ambos utilizados na titulação 1:5.000. Não foi necessário o uso de anticorpos secundários para a detecção dos alvos Ab 19 e Ab 72 devido eles já serem conjugados a fosfatase alcalina. A reação colorimétrica foi visualizada adicionando-se 1 mg/mL de pNPP.

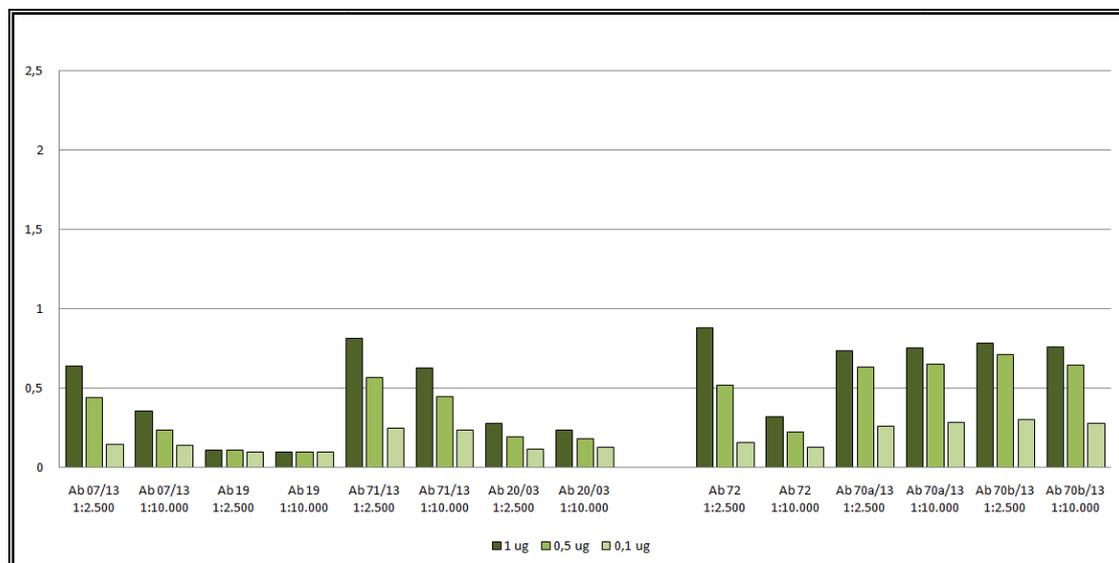


Figura 04: Imunoensaio enzimático de ligação direta (ELISA) a IgM humana comparando a atividade ligante dos diferentes anticorpos. A placa de microtitulação foi sensibilizada com IgM humana em três concentrações distintas (1ug, 0,5ug e 0,1ug), bloqueada com 3% BSA e logo após foi incubado com os anticorpos de interesse (Ab 07, 19, 20, 70a, 70b, 71 e 72) em duas titulações diferentes (1:2.500 e 1:10.000). As proteínas de interesse foram detectadas com os anticorpos Ab 03 (anti-IgG de coelho feito em cabra conjugado a fosfatase alcalina) para os anticorpos feitos em coelho e o Ab 13 (anti-IgG de cabra feito em coelho conjugado a fosfatase alcalina) para os anticorpos feitos em cabra, ambos utilizados na titulação 1:5.000. Não foi necessário o uso de anticorpos secundários para a detecção dos alvos Ab 19 e Ab 72 devido eles já serem conjugados a fosfatase alcalina. A reação colorimétrica foi visualizada adicionando-se 1 mg/mL de pNPP.

5.2 Seleção dos fagos reativos

A partir do imunoensaio enzimático de ligação direta foram selecionados os anticorpos Ab 19 e o Ab 72 para a captura dos anticorpos do plasma dos sujeitos da pesquisa, respectivamente IgG e IgM. A concentração escolhida para a captura foi de 1ug/poço.

Optou-se por trabalhar com um pool de pacientes em cada seleção. Foram selecionados quatro amostras de plasma de indivíduos diferentes para cada grupo de pesquisa. O conjunto biblioteca de fagos mais plasma de paciente foi selecionada por adsorção em anticorpos anti-IgG ou anti-IgM humana gerando um conjunto de fagos reativos com o repertório de IgG e IgM.

Esses fagos foram então sequenciados para que obtivéssemos as sequências dos peptídeos reativos aos anticorpos dos pacientes.

5.3 Sequências peptídicas obtidas a partir do pool de indivíduos saudáveis

As sequências de DNA obtidas por meio do sequenciamento automático foram manipuladas para obtenção do reverso complemento e tradução *in silico*. O programa feito pelo laboratório de bioinformática da UnB localizava a presença do peptídeo mimético pela presença de dois espaçadores que flanqueiam a sequência peptídica de interesse. VPFYSHS (próximo ao sítio *KpnI*) e GGSAE (próximo ao sítio *EagI*).

5.4 Análise comparativa das sequências peptídicas

As análises comparativas foram feitas utilizando programas e aplicativos disponíveis livremente na internet. Para a comparação entre as sequências foram verificados os seguintes critérios e aplicativos;

- Predição de estruturas secundárias – EMBOSS/Garnier (tabelas 03 a 08);
- Localização de sítios antigênicos – EMBOSS/Antigenic (tabelas 03 a 08);
- Composição da proteína quanto ao ponto isoelétrico – EMBOSS/Iep (tabelas 03 a 08 e fig.05);
- Frequência dos aminoácidos – Weblogo (fig.06 a 20);

Tabela 03. Dados obtidos a partir das análises computacionais das sequências peptídicas obtidas a partir dos fagos eluídos selecionadas com o pool de anticorpos IgG dos indivíduos saudáveis.

Sequência	Nome	PI [*]	Estrutura Secundária ^{**}				Estrutura Predita	Antigenic ^{***}
			Helix (H)	Sheet (E)	Turns (T)	Coil (C)		
IHPTLANQVRFA	EGS.01	10.55	0	7	0	5	EECCCCCEEEEE	TLANQV
TSNSHPSNEKLP	EGS.02	7.54	0	0	5	7	TCTCCCTTTCCC	-
HTNLHAKELPTL	EGS.03	7.71	12	0	0	0	HHHHHHHHHHHH	-
SNPGVHNLPSSS	EGS.04	7.55	0	3	3	6	CCTTEEECCCTCC	-
ATPVGALAVSGQ	EGS.05	6.09	0	10	2	0	EEEEEEEEEEETT	VGALAV
QLTQAPHSSTR	EGS.06	10.55	0	4	3	5	EEEECCCTCCCTT	-
LGNLELGPVDKV	EGS.07	4.18	4	2	0	6	CCCCCECHHHHE	-
TTSTTELMVSVV	EGS.08	3.84	5	3	0	4	CCCCHHHEEEHH	-
HNLSSGGQTPA	EGS.09	7.55	0	1	5	6	CCCTTTTCCCEET	-
KSMPADVKINSL	EGS.10	9.53	6	4	1	1	TCHHHHHHEEEEE	PADVKI
ALHPLTNRHYAT	EGS.11	9.35	2	1	5	4	HHCCCTTTTTTCE	-
SHALPLTWSTAA	EGS.12	7.55	3	0	1	8	CCCCCTHCHHC	LPLTWS
SPSMLTSMWPNT	EGS.13	6.09	0	3	2	7	CCTEEECTCCCC	-
SPSLSLPNGHTQ	EGS.14	7.55	0	1	3	8	CCTCCCCTTTCC	-
ALHPLTNRHYAT	EGS.15	9.35	2	1	5	4	HHCCCTTTTTTCE	-
TINPHKSRYEAP	EGS.16	9.29	0	2	3	7	ECCCTCCTTECC	-
SILPTKELPFEP	EGS.17	4.25	2	2	2	6	EECTCCCCCTHH	-
LNFTTPKSAFNL	EGS.18	6.70	1	4	2	5	EETCCCTCCHEE	-
APMGMTPTTMYQ	EGS.19	6.09	0	4	2	6	CCTTCCCCCEEEE	-
VTKAPYTQESTS	EGS.20	6.40	0	3	4	5	ETCCCCCEETTTC	-
HPADHAHPNSP	EGS.21	6.96	4	0	4	4	CHHHHTCCTTCT	DHAHP
DAGTHKQSEIR	EGS.22	7.55	4	3	0	5	HHHHCCCCCEEEE	-
SSPYIPIRLSS	EGS.23	9.34	0	6	2	4	CCTTEEEEEEECC	YIPIPR
SPELMIASFEKH	EGS.24	5.49	11	0	0	1	CHHHHHHHHHHH	-
NHNWHGKQYRL	EGS.25	10.45	0	1	9	2	CCTTTTTTTTTTE	-
TQNPEATRTNAH	EGS.26	7.55	3	0	1	8	CCCCTCCHHCC	-
WQTHNKPFMRSY	EGS.27	10.45	1	2	4	5	HCCTCCCTTEET	-
GNWSQPQSVTRV	EGS.28	10.54	0	4	4	4	TTCCCTCEEEE	-
HAARSDTTSSNH	EGS.29	7.71	4	0	2	6	HHHHTTCCCCC	-
SLMPTQPYVNP	EGS.30	6.09	0	3	5	4	CEETTETTCCCT	PTQPYV
TNTPITQQSQR	EGS.31	10.54	0	3	4	5	TCCCTCEEECTT	-
TPQTNTVNTRY	EGS.32	9.35	0	1	4	7	CCTCCCECCTTT	-
RAYDFLPAADFL	EGS.33	4.10	6	4	2	0	EETTEEHHHHHH	DFLPAA

KSPHSHSHAAMQ	EGS .34	9.70	5	0	0	7	CCCCCCHHHHH	HTHSHA
HDHNPSTTNGTL	EGS .35	6.49	0	2	8	2	TTCCTTTTTTTEE	-
HENKSMILISLP	EGS .36	7.54	6	4	0	2	HHHHHHEEEEC	-
NNQLWHSSSPPP	EGS .37	7.55	0	0	6	6	CTTTTCTCCCCT	-
QAQPPRVVALV	EGS .38	10.54	0	6	3	3	TCCCTTEEEEEE	PPRVPV
QAQPPRVVALV	EGS .39	10.54	0	6	3	3	TCCCTTEEEEEE	PPRVPV
TLFANDMSGSSQ	EGS .40	3.74	2	2	3	5	EEHHCTTCTCCC	-
MNNKPRPYLNL	EGS .41	10.45	0	5	3	4	TTCCCEEEEEE	-
YYQDHLAADRLK	EGS .42	7.53	10	2	0	0	EEHHHHHHHHHH	DHLAAD
DTHMAHQDTYQ	EGS .43	5.25	8	0	4	0	HHHHHHHHTTT	-
GDLTTATGPYR	EGS .44	6.32	0	5	5	2	TTEETCCTTEE	-
STELWNLSSEYY	EGS .45	3.61	3	0	4	5	CHHHTCCCCTT	-
GREPVGTSVWLS	EGS .46	6.41	0	5	3	4	TCCCTTEEEEC	-
HWTHFESPETKF	EGS .47	6.50	3	0	2	7	TCCCCCCTHHH	-
SVGLPAPPVDST	EGS .48	3.74	0	5	2	5	EECCCCCTEEE	LPAPPV
YNARTESLLLAP	EGS .49	6.40	8	1	0	3	CCCHHHHHHHH	-
HQHQFSSLSQSRH	EGS .50	10.55	1	0	6	5	HCCTTCTCTCT	QFSSLQ
RTPALDSMPAT	EGS .51	6.33	1	4	3	4	EECTCTCEECTH	-
HSPKIVALLPG	EGS .52	9.70	0	6	2	4	CCTEEEEEECT	LKIVAL
QFPPTLDSSANP	EGS .53	3.74	0	3	3	6	EEETTCTCCCC	-

ponto isoelétrico predito pelo programa EMBOSS/Iep ; ** estruturas secundárias preditas pelo programa EMBOSS/Garnier (Garnier, Osguthorpe and Robson (1978) J. Mol. Biol. 120:97-120); *** predição de regiões potencialmente antigênicas indicadas pelo programa EMBOSS/Antigenic.

Tabela 04. Dados obtidos a partir das análises computacionais das sequências peptídicas obtidas a partir dos fagos eluídos selecionadas com o *pool* de anticorpos IgM dos indivíduos saudáveis.

Sequência	Nome	PI [†]	Estrutura Secundária**				Estrutura Predita	Antigenic***
			Helix (H)	Sheet (E)	Turns (T)	Coil (C)		
SRTPPSISLPTV	EMS .01	10.54	0	5	5	2	TTCCTTEEEEEE	PPSISL
NQPHHQETDRYA	EMS .02	6.49	0	0	6	6	CCCCCTTTTTT	-
TNRSDVFTHARA	EMS .03	10.39	4	3	3	2	CCTTTEEEHHH	-
TPHFVDNAQMQG	EMS .04	5.29	5	0	2	5	CCTCCHHHHHTC	-
DSKETVQGIAHE	EMS .05	4.42	10	0	0	2	CCHHHHHHHHH	-
TLMTAAPTNPDY	EMS .06	3.74	0	5	3	4	EEEEECCTTT	-
GKTPLTSTSDS	EMS .07	6.33	0	5	2	5	TCCCEEEECTC	-
HWTHFVSPETKL	EMS .08	7.71	3	0	3	6	TTCCCCCTHHH	HFVSPE
APDNRGTLPSWR	EMS .09	10.39	0	0	6	6	CCTTTTCCCTTC	-
HWTHFVSPETKL	EMS .10	7.71	3	0	3	6	TTCCCCCTHHH	HFVSPE
QGQIKSTAPLQA	EMS .11	9.70	2	0	3	7	TTCCCCCCHH	-
HWTHFVSPETKL	EMS .12	7.71	3	0	3	6	TTCCCCCTHHH	HFVSPE
HWTHFVSPETKL	EMS .13	7.71	3	0	3	6	TTCCCCCTHHH	-
YQPYQLTAQIPV	EMS .14	6.08	0	8	3	1	TCTTEEEEEE	YQLTAQ
NRNSAVSLVTRA	EMS .15	12.50	2	5	2	3	CTTCCCEEEHH	-
DPRETATHESED	EMS .16	3.95	10	0	0	2	CCHHHHHHHHH	-
SATPSPIASTVP	EMS .17	6.09	0	5	2	5	TCCCCTEEEEEE	PSPIAS
NPSAVNAPVKQN	EMS .18	9.70	1	6	1	4	CCCCEEEETHEE	AVNAPV
NLIPGMDARGGS	EMS .19	6.33	0	6	4	2	EEETEECTTTC	-
VTPPPAYTDSTL	EMS .20	3.74	0	7	2	3	ECCCTTEEEEEE	-
YNNPQARQLSLS	EMS .21	9.34	0	5	2	5	TCCCTTEEEEC	-

ponto isoelétrico predito pelo programa EMBOSS/Iep ; ** estruturas secundárias preditas pelo programa EMBOSS/Garnier (Garnier, Osguthorpe and Robson (1978) J. Mol. Biol. 120:97-120); *** predição de regiões potencialmente antigênicas indicadas pelo programa EMBOSS/Antigenic.

Tabela 05. Dados obtidos a partir das análises computacionais das sequências peptídicas obtidas a partir dos fagos subtraídos selecionadas com o *pool* de anticorpos IgG dos indivíduos saudáveis.

Sequência	Nome	PI*	Estruturas Secundária**				Estrutura Predita	Antigenic***
			Helix (H)	Sheet (E)	Turns (T)	Coil (C)		
APPILTEPKSAA	SGS.01	6,40	4	3	1	4	CCCEEECHTHHH	-
APQDNTIMPSPT	SGS.02	3,74	0	2	5	5	CCTTTTEECCT	-
APQDNTIMPSPT	SGS.03	3,74	0	2	5	5	CCTTTTEECCT	-
ATWSHHLSSAGL	SGS.04	7,71	4	0	1	7	HHHCCCTCC	SHHLSS
CPSTHARLAHKP	SGS.05	9,83	6	0	2	4	CTHHHHHHCCC	THARLA
DHLLANVTPHPM	SGS.06	6,49	4	0	3	5	HHHHTTCCCT	LANVTP
DIYPYLWRFNTW	SGS.07	6,32	0	3	9	0	TEEETTTTTTTT	-
FHGPLTIAPKHH	SGS.08	9,70	3	0	2	7	TCCCCCHHTCC	PLTIAP
IRSDLTATYSHR	SGS.09	9,34	0	3	4	5	EEETCCCTCTT	-
LEPTNGILPVAP	SGS.10	3,84	0	6	4	2	CCTTTTEEEEEE	-
LPYEDFYKPFYQ	SGS.11	4,18	0	2	9	1	EETTTTCTTTT	EDFYKP
MKPSYHMDVFRD	SGS.12	7,54	4	4	1	3	CCCTHEEEEEEH	-
MLVPRSHGVGQS	SGS.13	10,55	0	4	2	6	EEEEETCCCCC	PRSHGV
MRPDTAYPHAPR	SGS.14	9,34	0	1	4	7	ECTTCCCCCT	-
NTINFWRGPLR	SGS.15	10,39	0	3	5	4	CEEETTTCCCT	-
NTPAHANADFFD	SGS.16	4,10	8	0	0	4	CCCCHHHHHHH	-
QPMHVPPQFIFR	SGS.17	10,55	0	5	4	3	ETTCCCTEEEE	HVPPQF
QSSMHVTSLPAG	SGS.18	7,55	1	5	1	5	HCEEEECCTC	MHVTSL
QYLPATKPDLAG	SGS.19	6,33	3	3	3	3	EEETCCCTHHH	-
RHHEAVTHYIYT	SGS.20	7,79	7	5	0	0	HHHHHHHEEEEE	EAVTHY
SCAALHSSNTTE	SGS.21	5,36	5	0	0	7	HHHHCCCCCCC	-
SGHQLLLKNMPN	SGS.22	9,70	3	3	2	4	CHHHEETCCCT	-
SNRAPLLTAVSW	SGS.23	10,54	1	6	1	4	CTCCCEEEEEEH	APLLTA
SPPLKLYSAQPF	SGS.24	9,29	0	6	3	3	CCTTEEEECT	LKLYSA
SPSMLTSMWPNT	SGS.25	6,09	0	3	2	7	CTTEECTCCCC	-
SPVTPWYSPPLS	SGS.26	6,09	0	0	6	6	CTTCTCCCTTC	TPWYSP
TGGTPIGGLRTL	SGS.27	10,54	0	6	2	4	TTCCCEEEEE	-
TLFTNPIVPRNY	SGS.28	9,34	0	5	2	5	EETCCCTEEEE	TNPIPV
TRQTVMAPPPY	SGS.29	9,34	0	5	3	4	TEEEECCTT	-
TVGTPIGGLRTL	SGS.30	10,54	0	8	1	3	EEECTCCEEEE	-
VATHVRTSSTSN	SGS.31	10,55	1	5	2	4	HEEEETCCCC	-
VATHVRTSSTSN	SGS.32	10,55	1	5	2	4	HEEEETCCCC	-
VLNNQPASSMDV	SGS.33	3,74	0	6	1	5	EECCCTCEEEE	-
YDPPRAHPPLP	SGS.34	7,54	0	0	5	7	TCCCTTCCCT	PPRAHP

ponto isoelétrico predito pelo programa EMBOSS/Iep ; **estruturas secundárias preditas pelo programa EMBOSS/Garnier (Garnier, Osguthorpe and Robson (1978) J. Mol. Biol. 120:97-120); ***predição de regiões potencialmente antigênicas indicadas pelo programa EMBOSS/Antigenic.

Tabela 06. Dados obtidos a partir das análises computacionais das sequências peptídicas obtidas a partir dos fagos subtraídos selecionadas com o *pool* de anticorpos IgM dos indivíduos saudáveis.

Sequência	Nome	PI*	Estruturas Secundária**				Estrutura predita	Antigenic***
			Helix (H)	Sheet (E)	Turns (T)	Coil (C)		
AHENTKHNEAAG	SMS.01	6,50	12	0	0	0	HHHHHHHHHHHH	-
AHENTKHNEAAG	SMS.02	6,50	12	0	0	0	HHHHHHHHHHHH	-
ANHHLPANTNRV	SMS.03	10,55	2	2	2	6	HHCCCTTCCEE	-
ASGRDHFLRLSF	SMS.04	10,39	2	3	5	2	CCTTHHEEETT	-
CPNGLLGPSPSL	SMS.05	5,82	0	4	6	2	ETTTTCCTEETE	GLLGPC
DPVITLPLRELV	SMS.06	4,18	5	7	0	0	EEEEEEHHHHH	ITLPLR
DYGRVTFRPLAG	SMS.07	9,34	0	5	4	3	TTTEEEECTCC	RVTFRP
EIGTGAHPNSR	SMS.08	7,55	0	1	4	7	ETTCCCCCTCT	TGAHP
GAPGHDSSQIMG	SMS.09	5,29	0	4	1	7	CCCCCCEEEET	-
GPQAVLQEAALQ	SMS.10	3,84	9	0	0	3	CCHHHHHHHHH	AVLQEA
GSVYDINPLIVP	SMS.11	3,74	0	12	0	0	EEEEEEEEEEEE	YDINPL
IDHTDHGWRSLF	SMS.12	6,49	0	2	5	5	ECCCTTTTCCT	-
IHNPOPLGPSTF	SMS.13	7,55	0	2	2	8	TCCCCTCCCCEE	PQPLGP
KAQPAEMLTSM	SMS.14	6,40	12	0	0	0	HHHHHHHHHHH	-
KCVVNGCFGRLP	SMS.15	8,82	0	6	4	2	EEEEETTTTECC	VNGCFG
KTIPRQSFWDQP	SMS.16	9,69	0	1	6	5	TECCTTTTTCCT	-
KYFQPPLQAAA	SMS.17	9,29	5	0	3	4	TTTCCCCHHHH	QPPLQQ
LVIYEDAQARRY	SMS.18	6,48	7	3	2	0	EEHHHHHHHTT	-
MPALITLQRAH	SMS.19	10,55	5	3	1	3	EHHHHEECTCC	LITLQP
NITEKGFQQAAR	SMS.20	9,69	4	0	2	6	CCCTTCCCCHHH	-
QETMYETHRQTE	SMS.21	4,47	11	0	0	1	HHHHHHHHHHHC	-
QLTARGVTETTT	SMS.22	6,41	0	6	0	6	EECCCCCEEEEC	-
QSTDDSPHRIL	SMS.23	5,40	0	4	5	3	ETTTTCCTEEE	-
QVMLASTTAESL	SMS.24	3,84	8	4	0	0	EEEEHHHHHHH	-
QYTKWSVTPTMS	SMS.25	9,29	0	0	6	6	TTTTTCCCCTCC	-
RPPAQPEAYSLP	SMS.26	6,40	0	1	2	9	CCCCCTETCCC	-
SHQMSPALNYMT	SMS.27	7,54	0	3	0	9	CCCCCCCCEEE	MSPALN
SNMRHNGSHPVA	SMS.28	10,55	0	2	6	4	CTTTTTTCCEE	-
SSAPSVSSRHHP	SMS.29	10,55	0	0	3	9	CCCCTCCTTCCC	PSVSSR
THTFTQGRPPAP	SMS.30	10,55	0	2	4	6	CETTTTTCCCC	-
TLQAKDKVPQAR	SMS.31	10,78	6	2	2	2	HHHHTTCCEHHE	-
TNIRQVALPTNL	SMS.32	10,54	0	7	1	4	CEEEEEECTCC	RQVALP
TPLYYSVWPHAF	SMS.33	7,53	0	5	5	2	EETTEEECTCT	YYSVWP
TPPPYLSLRIPP	SMS.34	9,34	0	5	3	4	CCCTTEEEECT	PYLSLR
TPPTRSYWPTEA	SMS.35	6,40	0	0	5	7	CCTTTTCCCCC	-
TPRPVWSSLQAH	SMS.36	10,55	0	0	1	11	CCCCCCCCCCC	PWSSL
TQLRQSDTART	SMS.37	10,39	0	4	3	5	EEETTCCCCCET	-
VSYPKHPIIVAN	SMS.38	9,30	0	7	2	3	ECCTTCEEEEE	PKHPII
VVHKPGLSHYDH	SMS.39	7,80	0	3	5	4	EEECTTCCCTTT	KPGLSH
VYAKIHPAHRSS	SMS.40	10,45	4	2	4	2	HHHEECTCTTT	KIHPAH
WHGGPFRDVHYQ	SMS.41	7,70	0	2	6	4	TCCCCTTEETT	-
YPLTNMHLLEPL	SMS.42	5,36	5	4	1	2	CCTEEEEHHHHH	-

ponto isoelétrico predito pelo programa EMBOSS/Iep ; ** estruturas secundárias preditas pelo programa EMBOSS/Garnier (Garnier, Osguthorpe and Robson (1978) J. Mol. Biol. 120:97-120); *** predição de regiões potencialmente antigênicas indicadas pelo programa EMBOSS/Antigenic.

Tabela 07. Dados obtidos a partir das análises computacionais das sequências peptídicas obtidas a partir dos fagos eluídos e subtraídos selecionadas com o *pool* de anticorpos IgG e IgM dos indivíduos tolerantes operacionais.

Sequência	Nome	PI [*]	Estrutura Secundária ^{**}				Estrutura Predita	Antigenic ^{***}
			Helix (H)	Sheet (E)	Turns (T)	Coil (C)		
HNLSSGGQTPA	EGT.01	7.55	0	1	5	6	CCCTTTTCCCE	-
KSM PADVKINSL	EGT.02	9.53	6	4	1	1	TCHHHHHHEEE	PADVKI
LLADTTHHRPWT	EGT.03	7.71	5	0	2	5	HHHHHCCCCTTC	-
VYKNPYGHSQIS	EGT.04	9.14	0	4	5	3	ETTCTTTCCCEE	-
CIAKSHATPLWR	EGT.05	9.83	4	1	2	5	HHHHCCCCTTE	KSHATP
ALHPLTNRHYAT	EGT.06	9.35	2	1	5	4	HHCCCTTTTTCCE	-
SPSLSLPNGHTQ	EGT.07	7.55	0	1	3	8	CCTCCCCTTCCE	-
RSMTMPTPMHLP	EGT.08	10.55	0	0	4	8	TTTCCCCCTCC	-
SILPTKELPFEP	EGT.09	4.25	2	2	2	6	EECCTCCCCTHH	-
TQTTVSSTQKPY	EGT.10	9.29	0	5	3	4	EEEEECCTCCTT	TVSSTQ
IHQPVIIQLNLN	EMT.01	7.55	0	8	1	3	TEEEEEEEBCCC	PVIIQL
TTSTTELMVSVV	EMT.02	3.84	5	3	0	4	CCCCHHHHEEHH	-
QSSGALSFPMP	EMT.03	10.54	0	2	3	7	TCCTCCCEETCC	GALSFP
WDSYSVRVLA PM	SMT.01	6.33	0	7	5	3	TTTTEEEEEEET	YSVRVL
TQTYGAQEPKLE	SMT.02	4.25	3	1	0	8	ECCCCCCCCHH	-
NQPHHQETDRYA	SMT.03	6.49	0	0	6	6	CCCCCCTTTTTT	-
LANTLANPPTGD	SMT.04	3.74	0	3	4	5	EECCCCCCTTTT	-
TNRSDVFTHARA	SMT.05	10.39	4	3	3	2	CCTTTEEEHHHH	-
SVSKPSLAGGAH	SMT.06	9.70	0	1	1	10	ETCCCCCCCCCC	KPSLAG
DSKETVQGIHNE	SMT.07	4.42	5	0	0	7	CCHHHHHCCCC	ETVQGI
TLMTAAPTNPDY	SMT.08	3.74	0	5	3	4	EEEECCCCCTTT	-
AQALEVQNKSMH	SMT.09	7.54	12	0	0	0	HHHHHHHHHHHH	-
TANYIQSRPSLG	SMT.10	9.34	0	6	4	2	EETEEECEETCT	YIQSRP
YPLTNTSFGGMN	SMT.11	6.09	0	5	3	4	EETEEECTTCCC	-
APMGMTPTTMYQ	SMT.12	6.09	0	4	2	6	CCTTCCCCEEEE	-
ITHTGMTRGMIT	SMT.13	10.55	0	6	0	6	EECCCCCEEEEE	-
HPADHAHPNSP	SMT.14	6.96	4	0	4	4	CHHHHTCCTTCT	DHAHP
IHPTLANQVRFA	SMT.15	10.55	0	7	0	5	EECCCCCEEEEE	TLANQV
HTNLHAKELPTL	SMT.16	7.71	12	0	0	0	HHHHHHHHHHHH	-
APTYNNHTRSP	SMT.17	9.35	0	0	7	5	CCTTTTTCTCCT	-
DPTLAPRTRLYP	SMT.18	9.34	0	5	4	3	CCTCEETETEET	-
ATPVGALAVSGQ	SMT.19	6.09	0	10	2	0	EEEEEEEEEEET	VGALAV
QLTQAPHSSSTR	SMT.20	10.55	0	4	3	5	EEEECCCTCCCTT	-
LGNLELGPVDKV	SMT.21	4.18	4	2	0	6	CCCCCECHHHHE	-

^{*}ponto isoelétrico predito pelo programa EMBOSS/Iep ; ^{**}estruturas secundárias preditas pelo programa EMBOSS/Garnier (Garnier, Osguthorpe and Robson (1978) J. Mol. Biol. 120:97-120); ^{***}predição de regiões potencialmente antigênicas indicadas pelo programa EMBOSS/Antigenic.

Tabela 08. Dados obtidos a partir das análises computacionais das sequências peptídicas obtidas a partir dos fagos eluídos e subtraídos selecionadas com o *pool* de anticorpos IgG e IgM dos indivíduos rejeição crônica.

Sequência	Nome	PI [†]	Estrutura Secundária ^{**}				Estrutura Predita	Antigenic ^{***}
			Helix (H)	Sheet (E)	Turns (T)	Coil (C)		
		7.55	4	1	3	4	CHHHCTTCCTHE	HELRSP
NSFDLLNGFRSA	EGR.02	6.33	0	3	2	7	CCEEECTCTCCC	-
		9.30	0	0	6	6	TTCTCCCCCTTT	TPLPS
QNDRMPPTHGSF	EGR.04	7.55	0	1	5	6	TTTTCCCTCCCE	-
		7.54	0	4	4	4	EECTCTCEETT	-
GMKSPSPPSVDQ	EMR.01	6.33	0	3	4	5	TTCCCCCTTEEE	-
		5.45	0	2	3	7	EECCCTCCTTCC	-
QHPSSERPRSLT	SGR.02	10.39	0	0	2	10	CCCCCCTTCCC	-
		4.25	1	0	4	7	CTTCCCCCHCTT	-
TLITGHNGLKPK	SGR.04	10.80	0	4	3	5	EEEETTCCCCCT	-
		5.45	2	4	4	2	EEEECTTTTHH	-
SSQFLSLNSRGV	SMR.01	10.54	00	4	3	5	CEEEECCCTTTC	FLSLNS

ponto isoelétrico predito pelo programa EMBOSS/Iep ; ^{**} estruturas secundárias preditas pelo programa EMBOSS/Garnier (Garnier, Osguthorpe and Robson (1978) J. Mol. Biol. 120:97-120); ^{***} predição de regiões potencialmente antigênicas indicadas pelo programa EMBOSS/Antigenic.

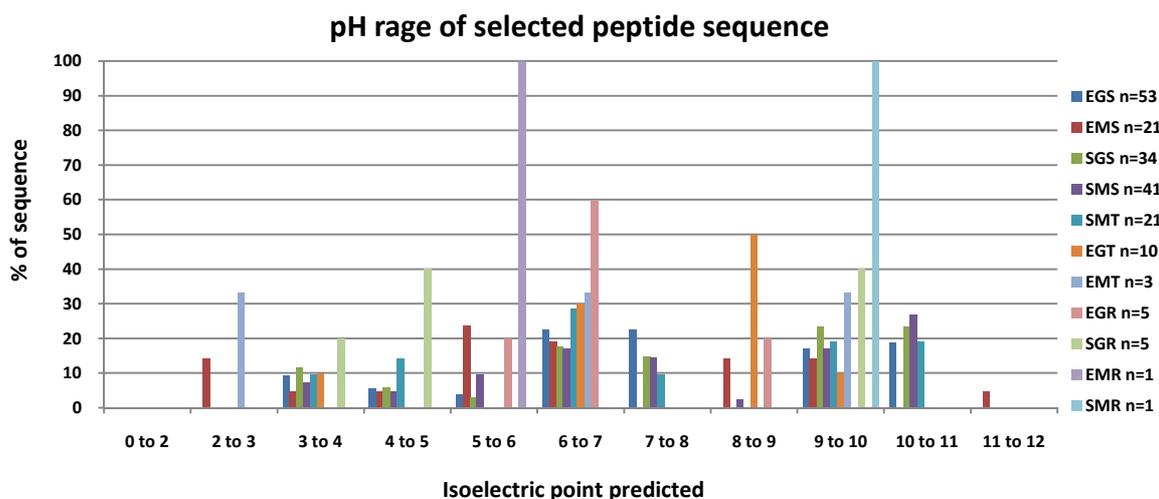


Figura 05. Gráfico com a predição do ponto isoelétrico das sequências obtidas a partir dos fagos subtraídos e eluídos selecionados com o *pool* dos anticorpos IgM e IgG dos grupos de estudo. EMS, fagos eluídos selecionados a partir do *pool* de IgM de indivíduos saudáveis; SMS, fagos subtraídos selecionados a partir do *pool* de IgM de indivíduos saudáveis; SGS, fagos subtraídos selecionados a partir do *pool* de IgG de indivíduos saudáveis; EGS, fagos eluídos selecionados a partir do *pool* de IgG de indivíduos saudáveis; SMT, fagos subtraídos selecionados a partir do *pool* de IgM de indivíduos tolerantes; EGT, fagos eluídos selecionados a partir do *pool* de IgG de indivíduos tolerantes; EMT, fagos eluídos selecionados a partir do *pool* de IgM de indivíduos tolerantes; EGR, fagos eluídos selecionados a partir do *pool* de IgG de indivíduos rejeição; SGR, fagos subtraídos selecionados a partir do *pool* de IgG de indivíduos rejeição; EMR, fagos eluídos selecionados a partir do *pool* de IgM de indivíduos rejeição; SMR, fagos subtraídos selecionados a partir do *pool* de IgM de indivíduos rejeição.

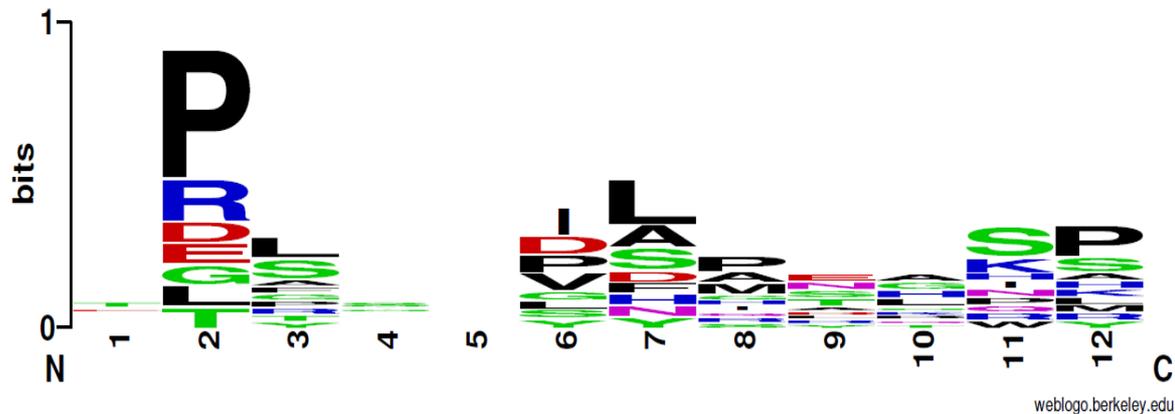


Figura 06. Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs subtraídas dos indivíduos saudáveis (SGS). Os peptídeos foram alinhados e a frequência de sua distribuição na sequência foi calculada utilizando o aplicativo WebLogo. A altura total indica a conservação da sequência naquela posição, enquanto que a altura dos símbolos indica a frequência relativa de cada aminoácido ou nucleotídeos naquela posição. n=34

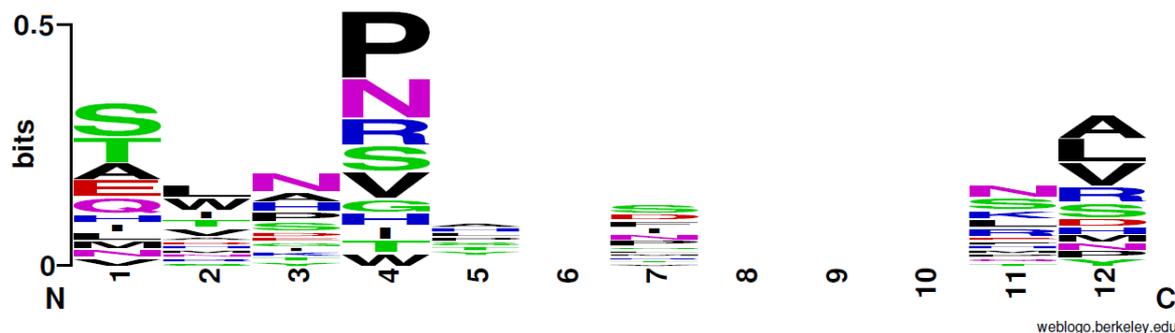


Figura 07. Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs subtraídas dos indivíduos saudáveis (SMS). Os peptídeos foram alinhados e a frequência de sua distribuição na sequência foi calculada utilizando o aplicativo WebLogo. A altura total indica a conservação da sequência naquela posição, enquanto que a altura dos símbolos indica a frequência relativa de cada aminoácido ou nucleotídeos naquela posição. n=42

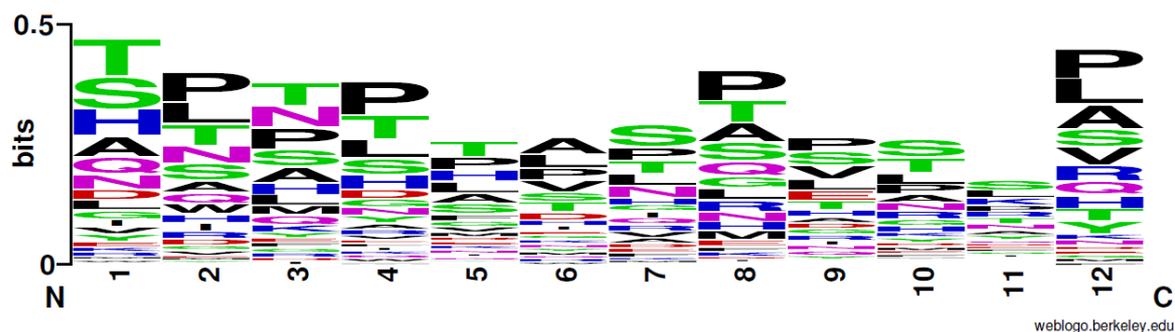


Figura 08. Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs eluídas dos indivíduos saudáveis (EGS). Os peptídeos foram alinhados e a frequência de sua distribuição na sequência foi calculada utilizando o aplicativo WebLogo. A altura total indica a conservação da sequência naquela posição, enquanto que a altura dos símbolos indica a frequência relativa de cada aminoácido ou nucleotídeos naquela posição. n=53

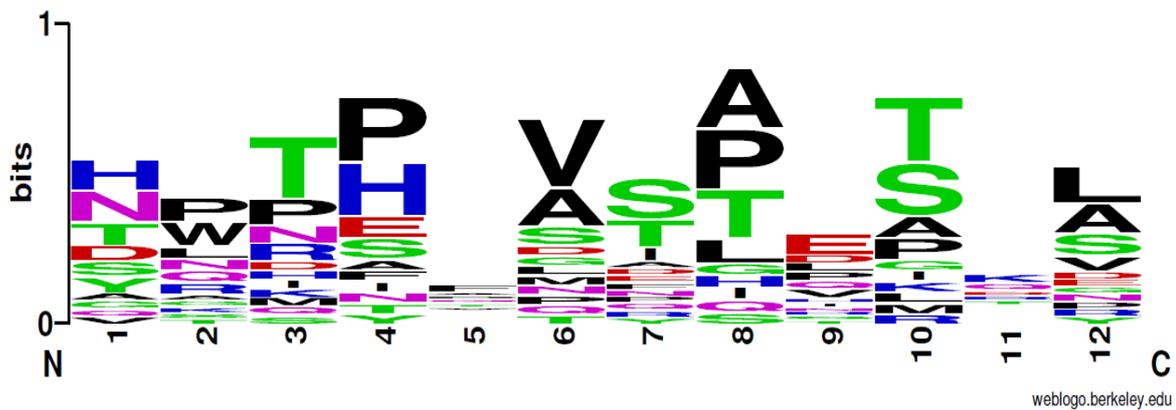


Figura 09. Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgMs eluídas dos indivíduos saudáveis (EMS). Os peptídeos foram alinhados e a frequência de sua distribuição na sequência foi calculada utilizando o aplicativo WebLogo. A altura total indica a conservação da sequência naquela posição, enquanto que a altura dos símbolos indica a frequência relativa de cada aminoácido ou nucleotídeos naquela posição. n=21

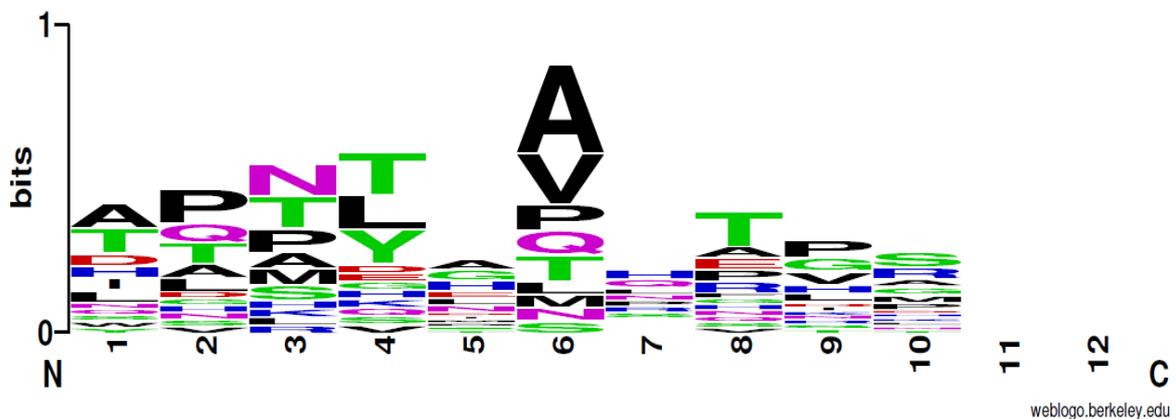


Figura 10. Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgMs subtraídas dos indivíduos tolerantes operacionais (SMT). Os peptídeos foram alinhados e a frequência de sua distribuição na sequência foi calculada utilizando o aplicativo WebLogo. A altura total indica a conservação da sequência naquela posição, enquanto que a altura dos símbolos indica a frequência relativa de cada aminoácido ou nucleotídeos naquela posição. n=21

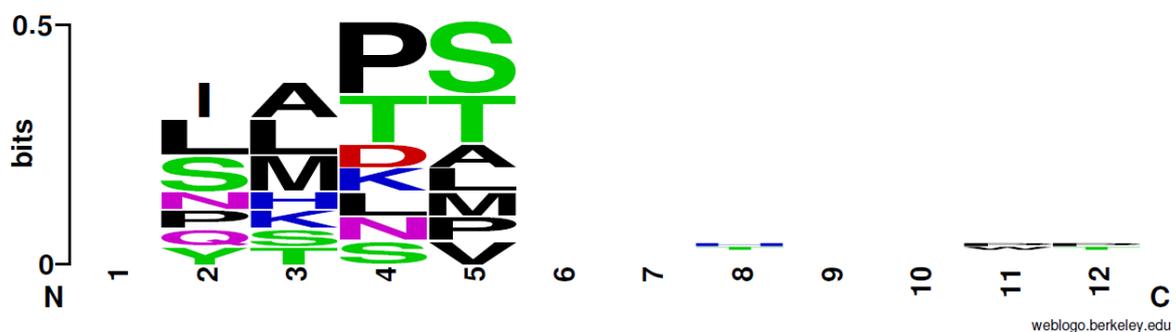


Figura 11. Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs eluídas dos indivíduos tolerantes operacionais (EGT). Os peptídeos foram alinhados e a frequência de sua distribuição na sequência foi calculada utilizando o aplicativo WebLogo. A altura total indica a conservação da sequência naquela posição, enquanto que a altura dos símbolos indica a frequência relativa de cada aminoácido ou nucleotídeos naquela posição. n=10

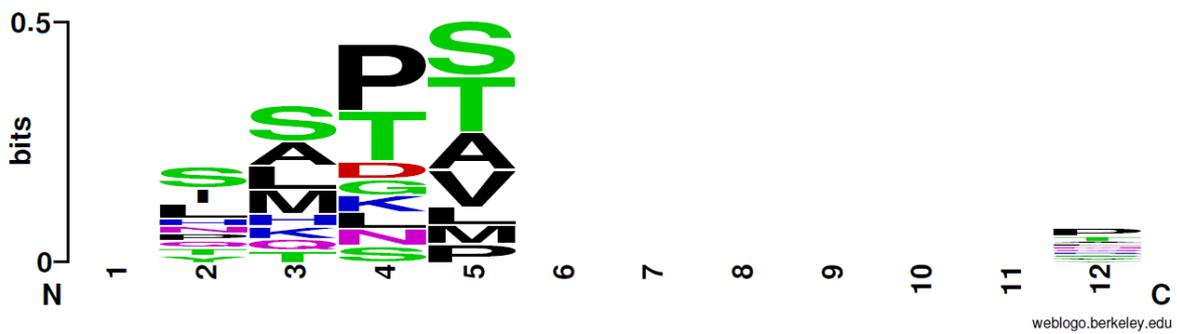


Figura 12. Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs e IgMs eluídas dos indivíduos tolerantes operacionais (EGT e EMT). Os peptídeos foram alinhados e a frequência de sua distribuição na sequência foi calculada utilizando o aplicativo WebLogo. A altura total indica a conservação da sequência naquela posição, enquanto que a altura dos símbolos indica a frequência relativa de cada aminoácido ou nucleotídeos naquela posição. n=13

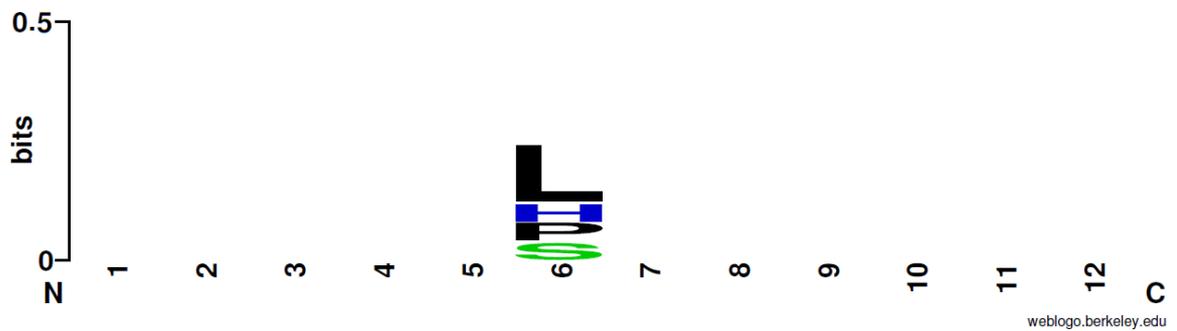


Figura 13. Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs e IgMs eluídas dos indivíduos rejeição crônica (EGR e EMR). Os peptídeos foram alinhados e a frequência de sua distribuição na sequência foi calculada utilizando o aplicativo WebLogo. A altura total indica a conservação da sequência naquela posição, enquanto que a altura dos símbolos indica a frequência relativa de cada aminoácido ou nucleotídeos naquela posição. n=6

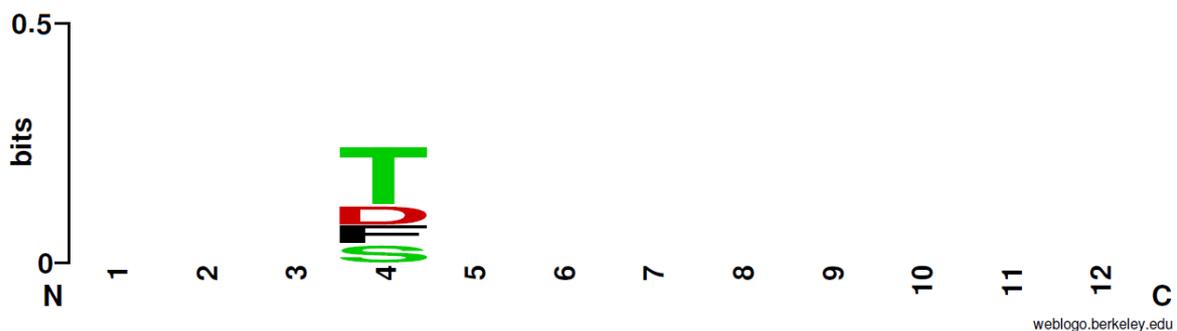


Figura 14. Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs e IgMs subtraídas dos indivíduos rejeição crônica (SGR e SMR). Os peptídeos foram alinhados e a frequência de sua distribuição na sequência foi calculada utilizando o aplicativo WebLogo. A altura total indica a conservação da sequência naquela posição, enquanto que a altura dos símbolos indica a frequência relativa de cada aminoácido ou nucleotídeos naquela posição. n=6

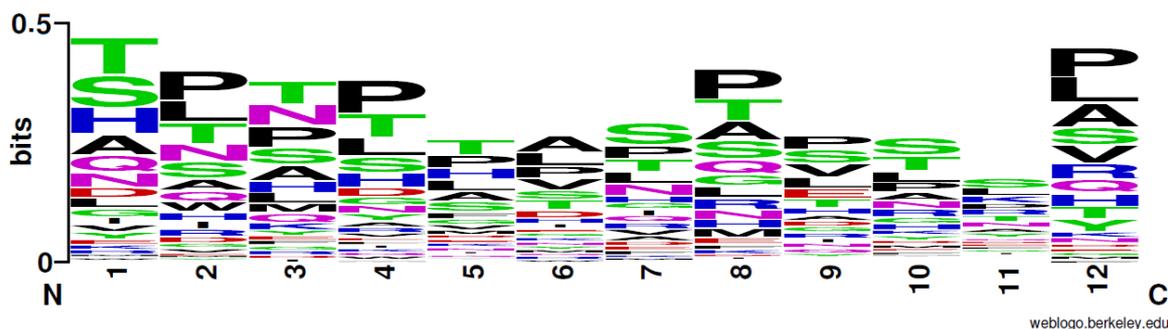


Figura 15. Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs e IgMs subtraídas e eluídas de todos os indivíduos dos grupos de estudo (OT, CR e HE). Os peptídeos foram alinhados e a frequência de sua distribuição na sequência foi calculada utilizando o aplicativo WebLogo. A altura total indica a conservação da sequência naquela posição, enquanto que a altura dos símbolos indica a frequência relativa de cada aminoácido ou nucleotídeos naquela posição. n=196

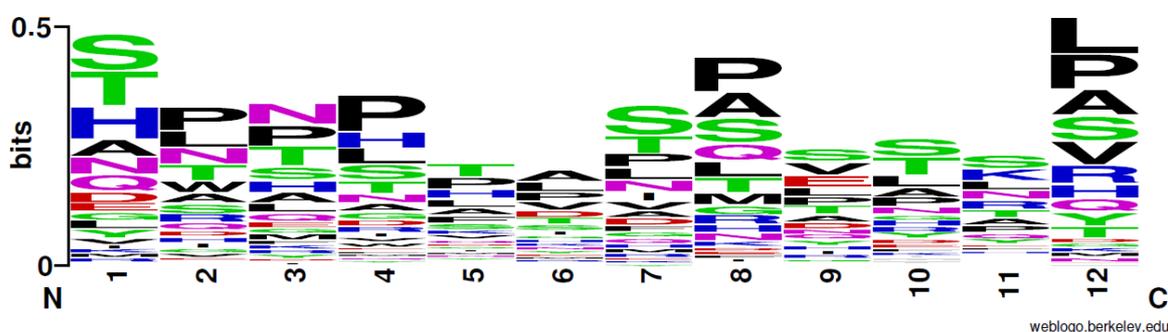


Figura 16. Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs e IgMs subtraídas e eluídas de todos os indivíduos saudáveis (EGS, EMS, SGS e SMS). Os peptídeos foram alinhados e a frequência de sua distribuição na sequência foi calculada utilizando o aplicativo WebLogo. A altura total indica a conservação da sequência naquela posição, enquanto que a altura dos símbolos indica a frequência relativa de cada aminoácido ou nucleotídeos naquela posição. n=150

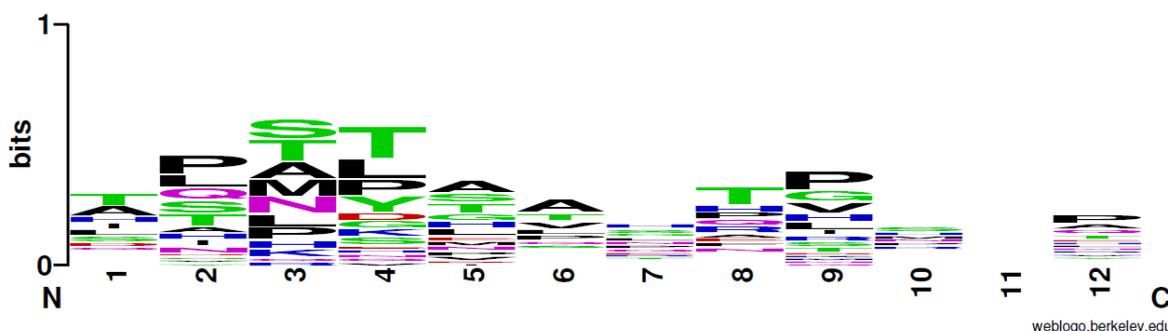


Figura 17. Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs e IgMs subtraídas e eluídas de todos os indivíduos tolerantes operacionais (EGT, EMT, SGT e SMT). Os peptídeos foram alinhados e a frequência de sua distribuição na sequência foi calculada utilizando o aplicativo WebLogo. A altura total indica a conservação da sequência naquela posição, enquanto que a altura dos símbolos indica a frequência relativa de cada aminoácido ou nucleotídeos naquela posição. n=34

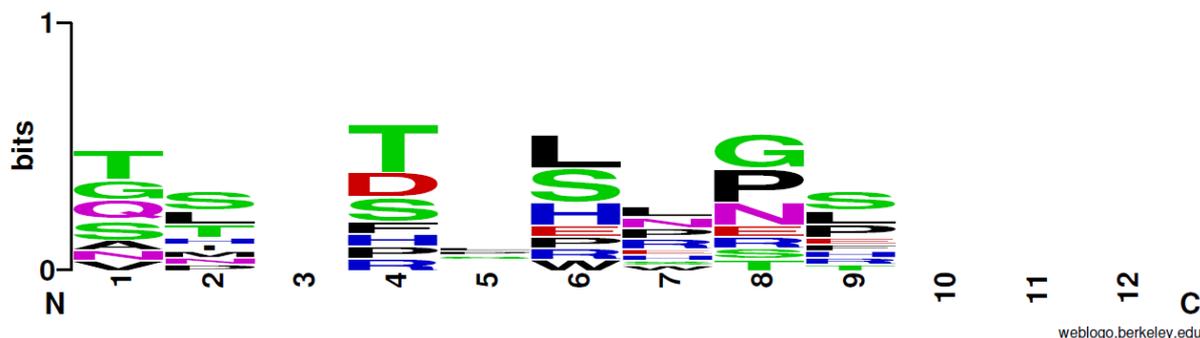


Figura 18. Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs e IgMs subtraídas e eluídas de todos os indivíduos rejeição crônica (EMR, EGR, SMR e SGR). Os peptídeos foram alinhados e a frequência de sua distribuição na sequência foi calculada utilizando o aplicativo WebLogo. A altura total indica a conservação da sequência naquela posição, enquanto que a altura dos símbolos indica a frequência relativa de cada aminoácido ou nucleotídeos naquela posição. n=12

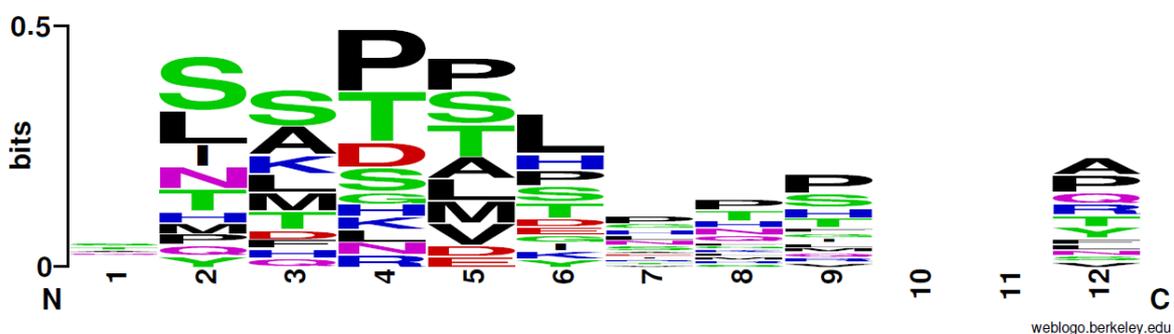


Figura 19. Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs e IgMs eluídas dos indivíduos tolerantes operacionais e rejeição crônica (eluídas de OT e CR). Os peptídeos foram alinhados e a frequência de sua distribuição na sequência foi calculada utilizando o aplicativo WebLogo. A altura total indica a conservação da sequência naquela posição, enquanto que a altura dos símbolos indica a frequência relativa de cada aminoácido ou nucleotídeos naquela posição. n=19

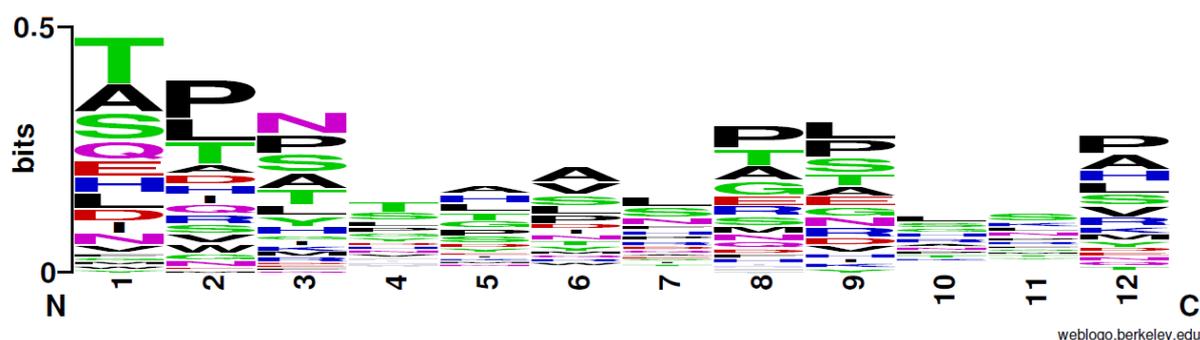


Figura 20. Distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas selecionadas a partir das IgGs e IgMs subtraídas dos indivíduos tolerantes operacionais e rejeição crônica (subtraídas de OT, CR e HE). Os peptídeos foram alinhados e a frequência de sua distribuição na sequência foi calculada utilizando o aplicativo WebLogo. A altura total indica a conservação da sequência naquela posição, enquanto que a altura dos símbolos indica a frequência relativa de cada aminoácido ou nucleotídeos naquela posição. n=103

5.5 Avaliação da concentração sérica de IgG, IgM e proteína total e a sua correlação com a intensidade de sinal (SI) encontrada nos microarranjos

Para avaliar as diferenças na composição protéica do plasma entre os grupos estudados, foi realizado um ELISA específico para os isotipos IgM e IgG e na quantificação de proteína total foi utilizando o kit BCA (tabela 09). As análises de Mann-Whitney U não revelaram diferenças significativas entre os grupos no que diz respeito a IgM (0,5-0,7 mg/ml), IgG (5,8-7,8 m/ml) ou de proteína total (39,3-43,4 mg/ml) ($p > 0,05$) (fig.21A-C). A variação interna de cada grupo foi comparável em todas as três análises (CV, coeficiente de variação 20-50%), com exceção dos níveis de IgM entre o grupo de pacientes estáveis (EST) (CV 93%). Este último é explicado pela presença de uma amostra de plasma sanguíneo (Ltx28) mostrando um título de IgM quatro vezes maior que os demais. No entanto, como os níveis de IgG e proteína total dessa amostra foram normais, esta não foi classificada como um caso isolado (*outlier*); vale ressaltar que a sua inclusão não afetou nenhuma das análises ou estatísticas apresentadas neste trabalho. Houve uma boa correlação quando cruzados os níveis de IgM e IgG das amostras de plasma (Pearson $r=0,663$; $p < 0,001$) (fig.22C). Da mesma forma, a proteína plasmática total mostrou um alto grau de correlação com IgG ($r > 0,702$; $p < 0,001$) (fig.22B), mas não com IgM ($r=0,145$; $p > 0,05$) (fig.22A). Não foram encontrados valores significativos que correlacionassem os níveis de concentração sérica das proteínas analisadas (IgG, IgM e proteína total) e a média da intensidade de sinal (SI) dos microarranjos. (fig.23A-C)

Tabela 09: Concentrações de IgM, IgG e proteína total do plasma das amostras sanguíneas dos indivíduos transplantados renais com diferentes níveis de tolerância (n=23) e dos indivíduos saudáveis (n=9). Média das concentrações em duplicatas determinadas por ELISA (IgG e IgM) e BCA (proteína total).

Grupos de estudo ^a	média [IgM] (mg/ml) Obtido por ELISA	média [IgG] (mg/ml) Obtido por ELISA	[proteína total] (mg/ml) Obtido por BCA
Tolerantes operacionais (OT - n = 5)			
LTx03	0.19	2.56	14.06
LTx08	0.45	4.21	24.27
LTx10	0.47	4.11	19.97
LTx16	0.16	5.29	32.90
LTx62	0.47	3.32	13.13
Rejeição Crônica (CR - n = 10)			
LTx01	0.17	2.50	5.09
LTx04	0.10	1.55	5.19
LTx05	0.43	4.95	30.01
LTx06	0.14	2.25	23.9
LTx07	0.28	3.23	22.19
LTx13	0.72	5.12	24.51
LTx25	0.29	3.51	29.49
LTx26	0.63	3.99	30.93
LTx32	0.30	3.96	23.67
LTx67	0.42	2.27	17.92
Estáveis (ST - n = 8)			
LTx09	0.23	3.36	24.86
LTx12	0.20	3.80	25.8
LTx14	0.16	1.65	13.64
LTx27	0.28	2.53	16.93
LTx28	1.13	2.94	18.75
LTx30	0.28	4.09	18.28
LTx31	0.23	2.06	19.56
LTx33	0.24	2.76	19.21
Saudáveis (HE - n = 8)			
LTx36	0.26	3.35	28.64
LTx37	0.39	4.07	27.85
LTx38	0.39	2.97	
LTx40	0.17	2.19	13.47
LTx41	0.16	2.93	25.94
LTx43	0.14	2.52	16.15
LTx44	0.38	3.09	21.87
LTx18	0.35	3.17	20.02
LTx15	0.15	1.62	12.92

^aGrupos de estudo utilizados na pesquisa, em tratamento com imunossuppressores (ST, indivíduos com função estável do enxerto; CR, indivíduos com rejeição crônica) e grupos que não estão sob tratamento de imunossuppressores (OT, indivíduos tolerantes operacionais; HE, voluntários saudáveis); Para mais detalhes sobre os dados clínicos dos sujeitos da pesquisa veja anexo III

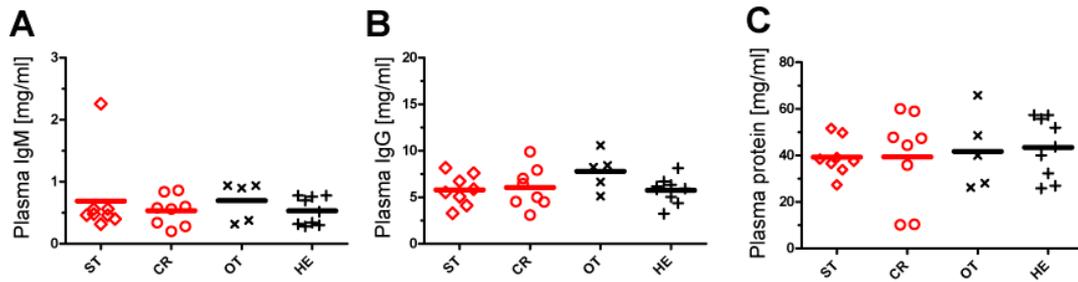


Figura 21. Níveis de IgM, IgG e proteína total no plasma sanguíneos das amostras dos grupos de estudo. (A) IgM plasmática total (ELISA). (B) IgG plasmática total (ELISA). (C) Proteína total (BCA). Os símbolos representam os valores médios das amostras analisadas em duplicata; barras indicam a média do grupo de estudo. Os grupos de estudo em tratamento com imunossupressores (ST, estáveis; CR, indivíduos com rejeição crônica) são destacados em vermelho. Os grupos que não estão sob tratamento de imunossupressores (OT, indivíduos tolerantes operacionais; HE, voluntários saudáveis) são mostrados em preto. Não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos de estudo ($p > 0,05$; teste Mann-Whitney U).

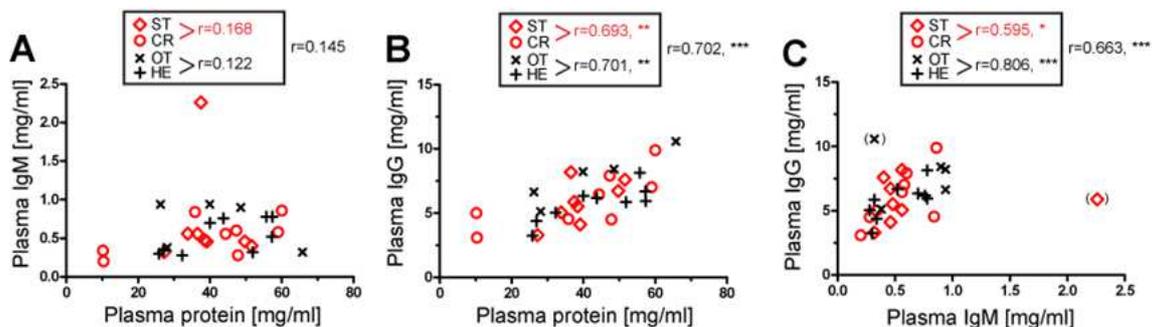


Figura 22. Correlação entre os níveis plasmáticos de IgM, IgG e proteína total das amostras sanguíneas dos grupos de estudo. (A-C) Os símbolos representam os valores médios das amostras analisadas em duplicata. Os grupos de estudo em tratamento com imunossupressores (ST, estáveis; CR, indivíduos com rejeição crônica) são destacados em vermelho. Os grupos que não estão sob tratamento de imunossupressores (OT, indivíduos tolerantes operacionais; HE, voluntários saudáveis) são mostrados em preto. As associações entre as concentrações plasmáticas de IgM, IgG e proteína total foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Pearson (r); ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Os valores atípicos (*outliers*) em parênteses foram excluídos das análises de correlação.

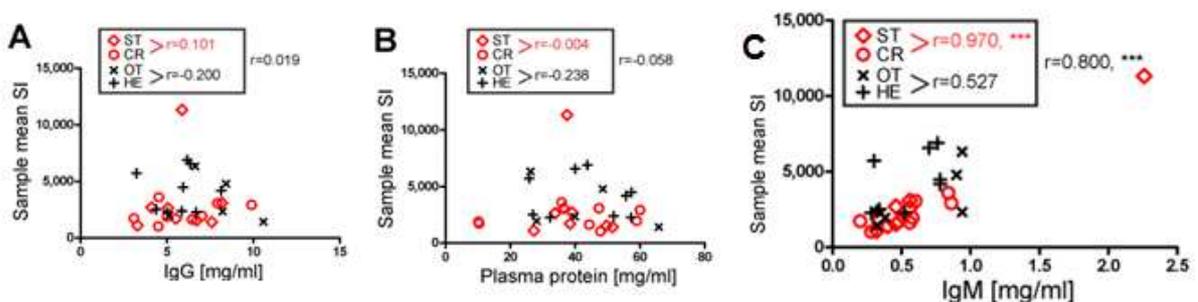


Figura 23. Análise de correlação entre a concentração sérica de IgG, proteína total e IgM e a média de intensidade de sinal (SI) das IgMs. (A) IgG plasmática (B) Proteína total (C) IgM plasmática. Os grupos de estudo em tratamento com imunossupressores (ST, estáveis; CR, indivíduos com rejeição crônica) são destacados em vermelho. Os grupos que não estão sob tratamento de imunossupressores (OT, indivíduos tolerantes operacionais; HE, voluntários saudáveis) são mostrados em preto. As correlações entre a concentração de IgM e a média da SI das IgMs. foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Pearson (r); ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.6 Análises de correlação e variação da intensidade de sinal nos microarranjos peptídicos

Para investigar as diferenças entre grupos de estudo foram utilizados os anticorpos do tipo IgM presentes no plasma dos sujeitos da pesquisa, as amostras de plasma (n=30) foram incubadas nas bibliotecas de microarranjo contendo 942 peptídeos aleatórios. Como controle interno do ensaio, seis microarranjos adicionais foram incubados com a amostra de um mesmo indivíduo saudável (HE) Ltx36 (n=5; repetições) ou somente tampão de incubação (n=1, branco). O perfil da intensidade de sinal (SI) das IgMs foi obtido através da detecção do anticorpo secundário anti-IgM humana conjugado com fluorescência (Alexa647).

A intensidade de sinal (SI) observada nos microchips peptídicos foi de uma forma geral, a mesma para todas as amostras (fig.25), a maioria seguiu o log de uma distribuição normal – curva gaussiana, mesmo quando analisamos a distribuição da intensidade de sinal (SI) dos dados agrupados das cinco incubações das repetições da amostra Ltx36 (fig.24A); contudo, a distribuição de SI diferiu por localização (média, μ) e escala (desvio padrão, SD) (fig.25). A SI dos brancos foi significativamente baixa (fig.24B) e não teve correlação com as SIs das amostras de plasma (Pearson $r_{\text{mean}}=0.253$), indicando que o perfil de SI das amostras não foi influenciado pelo anticorpo utilizado na detecção das IgMs. A variação experimental observada na sondagem do ensaio de microarranjo foi baixa, enquanto que a correlação de Pearson entre as repetições da amostra Ltx36 foram fortes e significativas ($r_{\text{mean}}=0.906$; $p>0.0001$) (fig.33). A correlação dos perfis de SI dentro dos grupos de estudo foi baixa ($r_{\text{mean}}=0.561$ to 0.663 ; $p>0.0001$ para todos os grupos) e o desvio padrão da média da SIs dos peptídeos foi maior para os grupos de estudo em comparação com o grupo de repetição Ltx36 (fig.24C). Assim, a variabilidade biológica das amostras excedeu a variabilidade tecnológico do ensaio.

Quando representados como curvas cumulativas de frequência, as distribuições individuais de SI das amostras dos quatro grupos de estudo não demonstrou uma separação, mas sim, uma sobreposição (fig.24B). Para analisar o nível desta sobreposição foram feitos vários gráficos do tipo *snake plots* comparando os grupos de estudo analisados um contra o outro ou em conjunto. Onde a média de cada peptídeo por grupo foi calculada e as medias de um grupo

foram ordenadas de acordo com a ordem crescente do outro grupo. Dessa forma a sobreposição das SI pode ser observada: imunossuprimidos contra não imunossuprimidos (fig.26), OT contra CR (fig.27), OT contra HE (fig.28), OT contra ST (fig.29), todas as SI dos grupos em conjunto (fig.30) e CR contra os demais grupos (fig.31). Além da comparação da SI de cada sujeito da pesquisa utilizando a média da intensidade de sinal de cada microchip (fig.32).

O teste de Kruskal-Wallis identificou diferenças significativas entre todas as amostras ($p < 0.0001$); no entanto um teste *a posteriori* revelou, que ambos, a variação intra-grupos e entre-grupos contribuíram para a significância. Além disso, os grupos de estudo não foram classificados exclusivamente pelos valores médios da SI de cada um dos 942 peptídeos (calculado através de todas as amostras em um grupo) (fig.24D) mas uma sobreposição das SIs foi observada.

Finalmente, a duplicata do teste Mann-Whitney U demonstrou nenhuma diferença significativa na média de SI das amostras entre os grupos ($p > 0,05$), com exceção dos voluntários saudáveis (HE) e os indivíduos com rejeição crônica (CR) ($p = 0.021$) (fig.24E). Quando analisados como um todo, os grupos de estudo não são classificados tendo como base unicamente a intensidade de sinal, ainda que as amostras CR demonstrem uma tendência de SI em níveis mais baixos quando comparados a SI das amostras dos indivíduos HE (fig.24B, D e E).

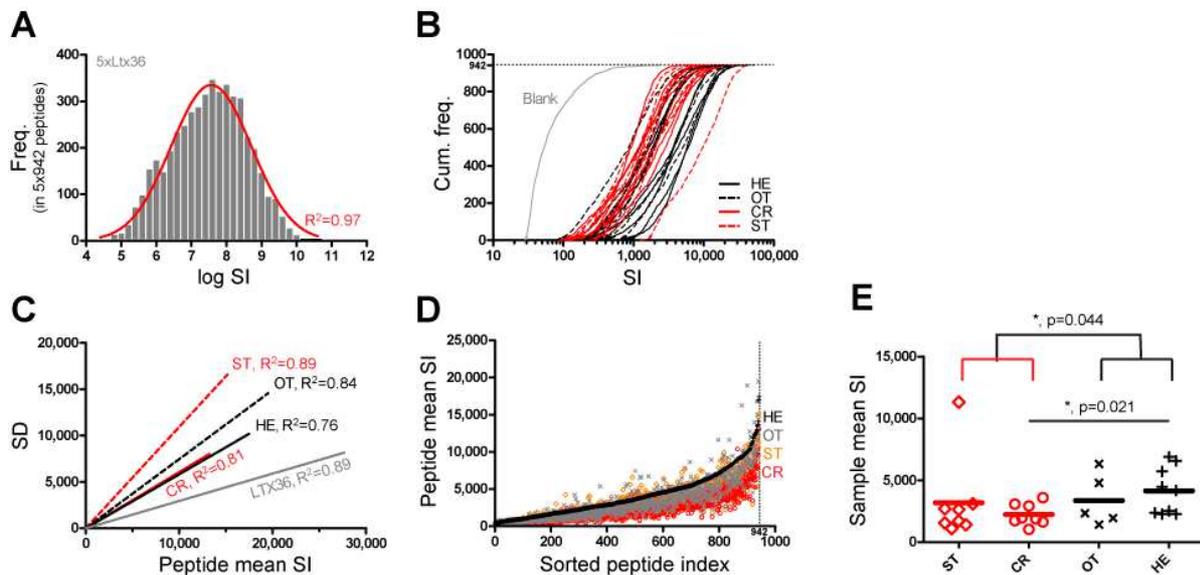


Figura 24. Intensidade de sinal (SI) do perfil de ligação das amostras de plasma dos grupos de estudo utilizando os microarranjos peptídicos randômicos. As amostras de plasma ($n=30$) e controles (cinco repetições do plasma Ltx36 e um branco) foram sondados utilizando os microarranjos contendo a biblioteca de 942 peptídeos randômicos. A intensidade de sinal dos perfis de ligação das IgMs foram obtidas após a detecção com o anticorpo secundário anti-IgM humana conjugado com Alexa647. **(A)** Distribuição da intensidade de sinal (SI) dos dados agrupados das cinco incubações das repetições da amostra Ltx36. O histograma em distribuição logarítmica (log) das intensidades de sinal (barras) se encaixou dentro de uma distribuição Gaussiana (distribuição normal) (linha vermelha). **(B)** Distribuições cumulativas das intensidades de sinal das amostras de plasma incluídas no estudo e a incubação do branco. **(C)** Relação entre a média da intensidade de sinal (SI) e o desvio padrão (SD – *standard deviation*). Para cada grupo, a média da intensidade de sinal (SI) de cada peptídeo foi calculada e plotada em função do seu desvio padrão (SD). As análises de correlação revelaram uma forte correlação linear em todos os grupos de estudo (Pearson $r > 0,85$). Para maior clareza de dados, apenas as curvas de regressão linear ajustadas aos dados são mostradas. **(D)** Comparação entre os grupos de estudo a partir dos peptídeos ordenados pela média da intensidade de sinal. Para o grupo de voluntários saudáveis, a média da intensidade de sinal foi ordenada em uma escala ascendente. A intensidade de sinal média correspondente aos peptídeos dos outros grupos de estudo também é mostrada de acordo com esta classificação. **(E)** A média de intensidade de sinal das amostras. Os símbolos representam a média de intensidade de sinal das amostras em todos os 942 peptídeos; as barras indicam a média dos grupos de estudo. Diferenças estatisticamente significativas são indicadas (* $p \leq 0,05$; teste Mann-Whitney U). Em todas as subfiguras, os grupos de estudo em tratamento com imunossupressores (ST, estáveis; CR, indivíduos com rejeição crônica) são destacados em vermelho e os grupos que não estão sob tratamento de imunossupressores (OT, indivíduos tolerantes operacionais; HE, voluntários saudáveis) são mostrados em preto.

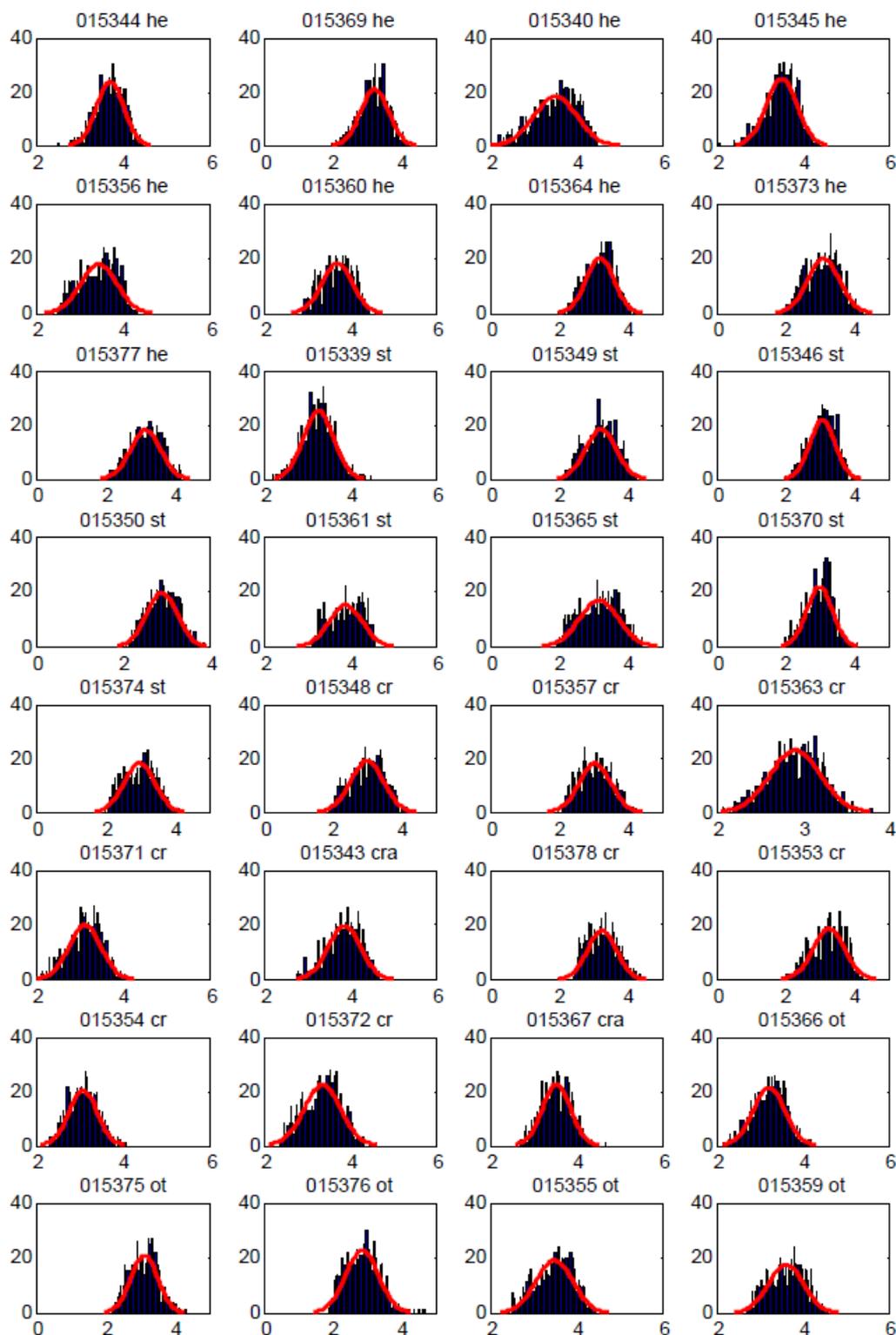
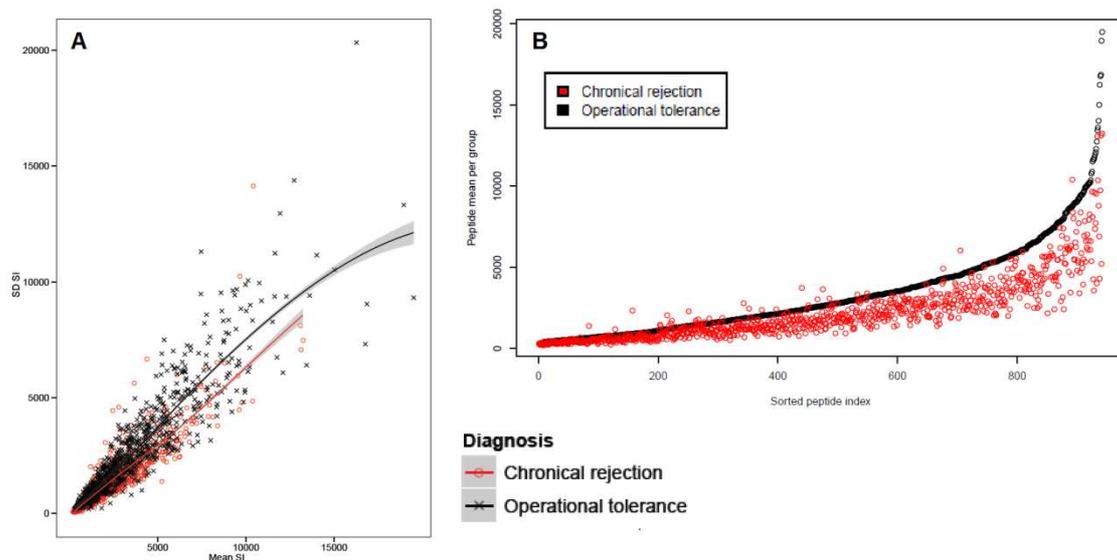
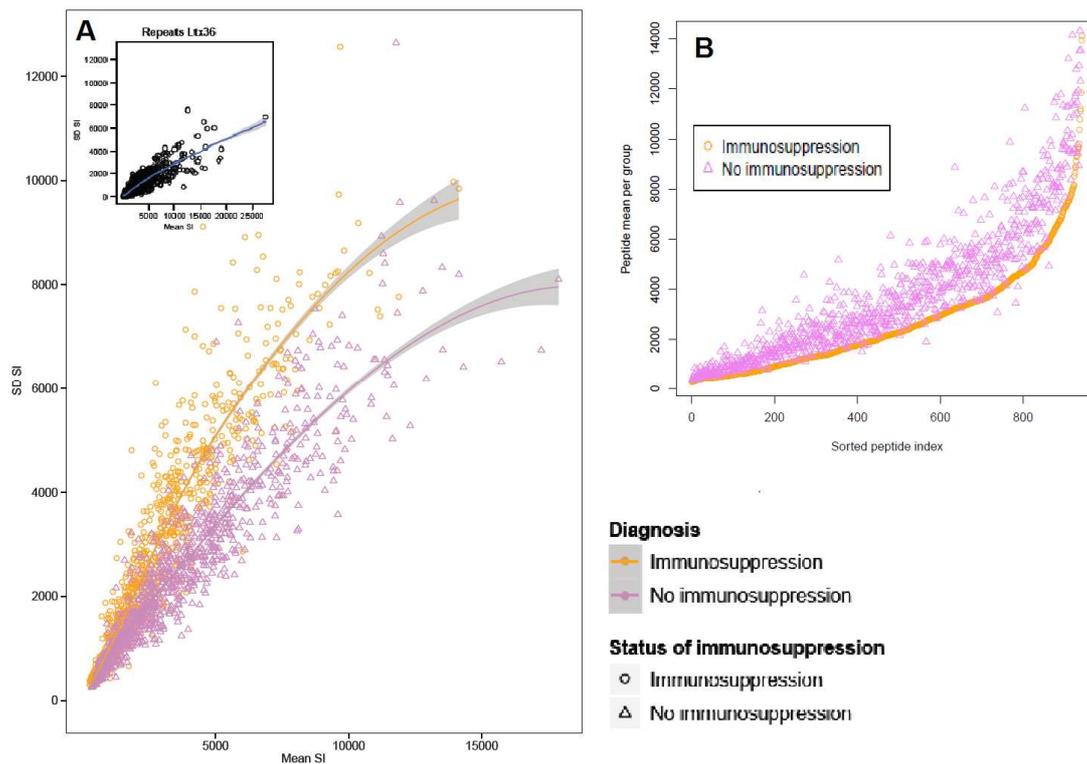


Figura 25. Histograma da distribuição logarítmica (log) das intensidades de sinal (SI) indicando uma distribuição normal na população analisada. Distribuição da intensidade de sinal (SI) dos dados de cada um dos microchips analisados. A função histfit (Matlab) foi aplicada para a transformação logarítmica da distribuição da intensidade de sinal de cada amostra. O histograma em distribuição logarítmica (log) das intensidades de sinal (barras) se encaixou dentro de uma distribuição Gaussiana (distribuição normal) (linha vermelha). ST, estáveis; CR, indivíduos com rejeição crônica, OT, indivíduos tolerantes operacionais; HE, voluntários saudáveis. n=33



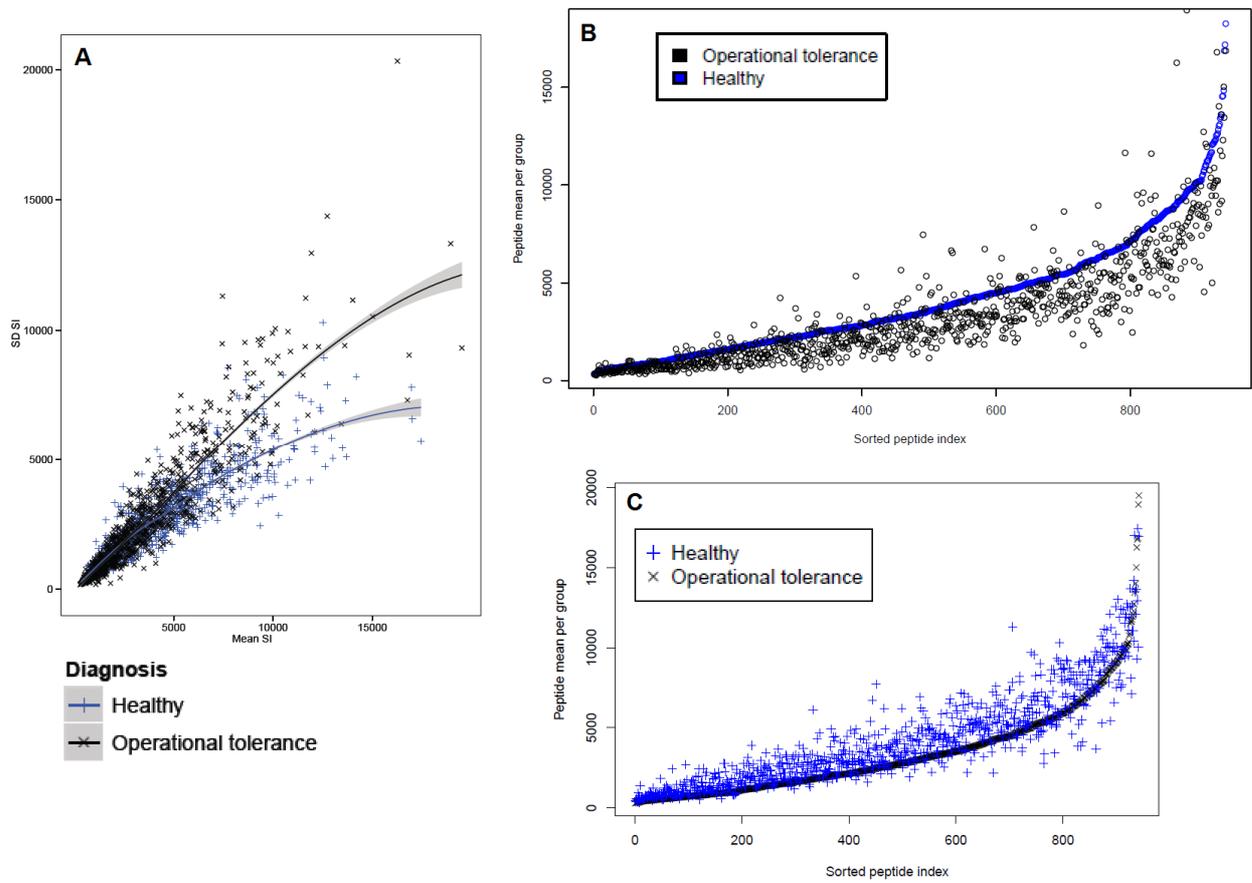


Figura 28. Snake plot dos grupos tolerantes operacionais contra os indivíduos saudáveis. (A) Sobreposição das intensidades de sinal dos peptídeos de cada microchip do grupo tolerante operacional (preto) contra o grupo de indivíduos saudáveis (azul) com o desvio padrão. O desvio padrão e a média foram calculadas por grupo e plotadas em função de cada um. (B e C) Snake plot onde média de cada peptídeo por grupo foi calculada e as médias de um grupo foram ordenadas de acordo com a ordem crescente do outro grupo.

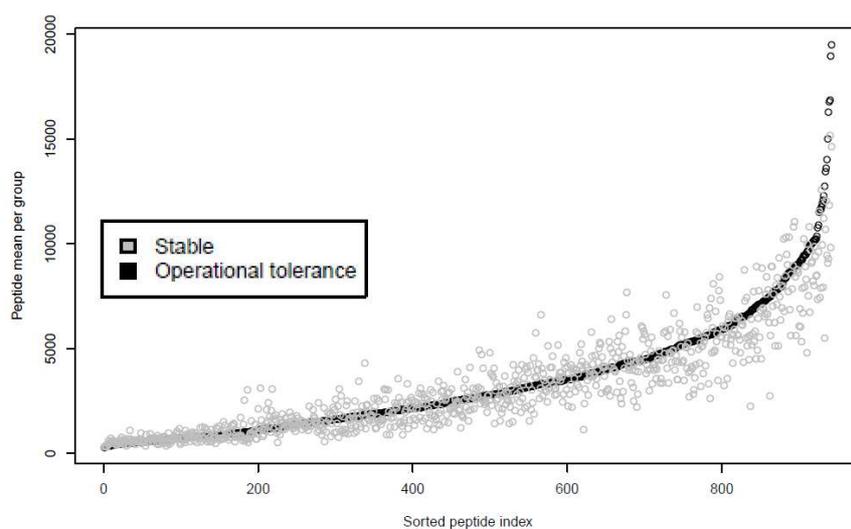


Figura 29. Snake plot dos grupos tolerantes operacionais contra os indivíduos estáveis. Snake plot onde média de cada peptídeo por grupo foi calculada e as médias das intensidades de sinal de um grupo foram ordenadas de acordo com a ordem crescente do outro grupo. Grupo tolerante operacional (preto) contra o grupo de indivíduos estáveis (cinza).

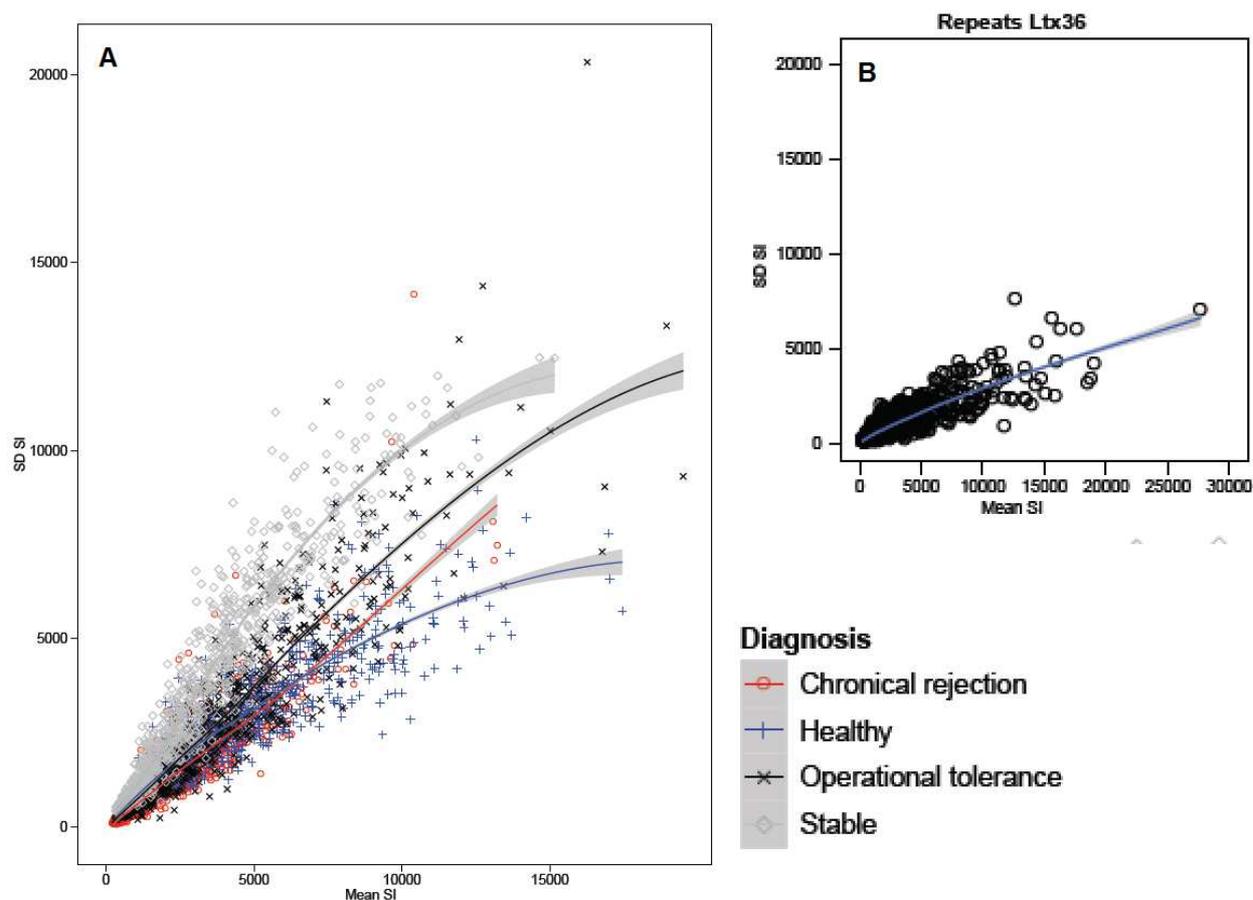


Figura 30. Sobreposição da intensidade de sinal (SI) de todos os grupos da pesquisa. (A) Sobreposição das intensidades de sinal dos peptídeos de cada microchip do grupo tolerante operacional (preto), indivíduos saudáveis (azul), indivíduos estáveis (cinza) e indivíduos rejeição crônica (vermelho). O desvio padrão e a média foram calculadas por grupo e plotadas em função de cada um. **(B)** Detalhe: média contra o desvio padrão de cada uma das 5 repetições da amostra Ltx 36 utilizada como controle das incubações interchips. n=30.

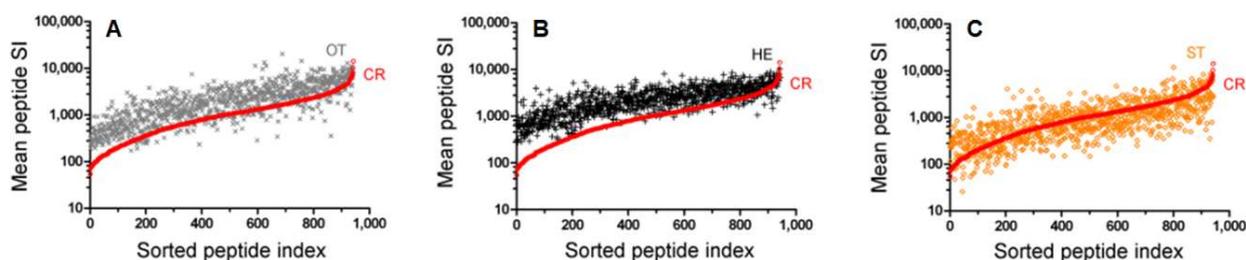


Figura 31. Comparação dos snake plots dos indivíduos rejeição crônica contra os demais grupos. A média de cada peptídeo do grupo rejeição crônica (vermelho) foi calculada e as medias foram ordenadas de acordo com a ordem crescente e plotadas contra a SI dos peptídeos de cada microchip dos demais grupos, **(A)** tolerantes operacionais (OT, cinza), **(B)** indivíduos saudáveis (HE, preto) e **(C)** indivíduos estáveis (ST, laranja)

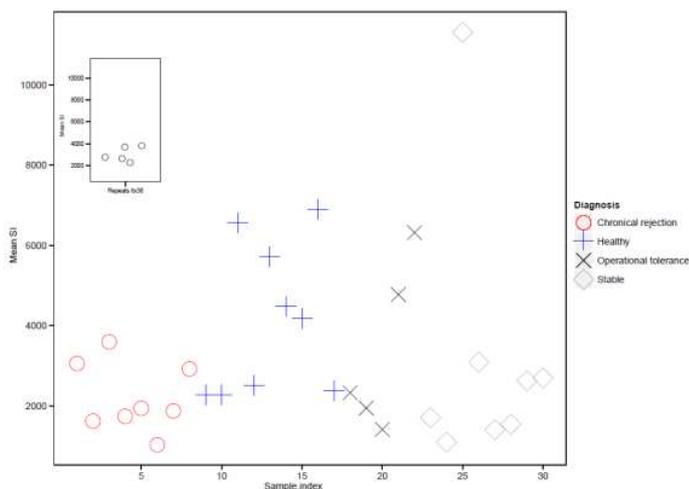


Figura 32. Comparação da SI de cada sujeito da pesquisa utilizando a média da intensidade de sinal de cada microchip. A média da intensidade de sinal de todos os peptídeos de cada microchip foi calculada resultando em 30 médias de intensidade de sinal, que foram codificados por cores de acordo com o diagnóstico clínico. Rejeição crônica em vermelho, saudáveis em azul, tolerantes operacionais em preto e estáveis em cinza. Detalhe: média de cada uma das 5 repetições da amostra Ltx 36 utilizada como controle das incubações interchips.

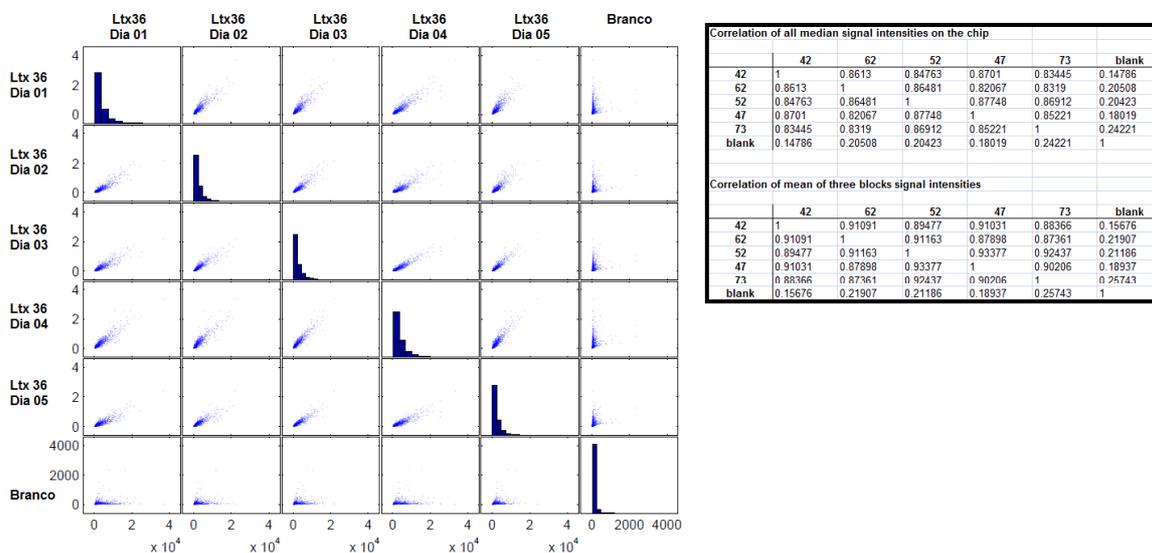


Figura 33. Análises de correlação entre as cinco repetições utilizadas como controle interchip e o branco. A correlação entre os controles interchips foi analisada através da incubação da mesma amostra (Ltx 36) em cada um dos dias em as incubações foram realizadas. Essas repetições foram comparadas entre si de acordo com o dia de incubação e o branco. A correlação foi calculada entre as repetições, ambas com suas respectivas médias e medianas

5.7 Correlação entre a intensidade de sinal e o título das IgMs

Para avaliar a influência da composição protéica das amostras nos perfis de SI das IgMs, foi realizada a análise de coeficiente de correlação de Pearson entre os níveis de IgM, IgG e proteína total e a média de SI das amostras.

Enquanto a foi observada uma correlação entre a concentração de IgM da amostras e a sua SI ($r=0,800$; $p<0,001$) (fig.34), nenhuma relação significativa foi observada entre IgG/SI ou proteína total/SI. (fig.23).

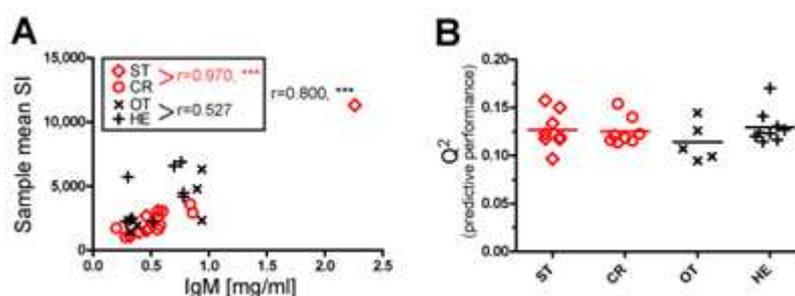


Figura 34. Análise de correlação entre a concentração da IgM plasmática e da média de intensidade de sinal (SI). Os símbolos representam as médias de intensidade de sinal das amostras analisadas em duplicata. Os grupos de estudo em tratamento com imunossupressores (ST, estáveis; CR, indivíduos com rejeição crônica) são destacados em vermelho. Os grupos que não estão sob tratamento de imunossupressores (OT, indivíduos tolerantes operacionais; HE, voluntários saudáveis) são mostrados em preto. As associações entre as concentrações plasmáticas de IgM e a média de intensidade de sinal foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Pearson (r); *** $p<0.001$.

5.8 Validação da correlação do branco contra as demais amostras

Para avaliar a confiabilidade da leitura das intensidades de sinal dos microchips foi feita a validação desses dados através de testes de correlação entre uma mostra aleatória (Ltx 33, ST) contra o branco (Fig 35A) e testes de correlação entre a média da SI de todos os grupos contra o branco (fig.35B). Além disso, também foi feito um diagrama do tipo *heatmap* para que fosse avaliado se a intensidade de sinal encontrada nos microchips era influenciada pelo dia da incubação (fig.36A) ou pelo diagnóstico clínico como imunossuprimido (IS, CR + ST) ou não imunossuprimido (NIS, OT+HE) e (fig.36B).

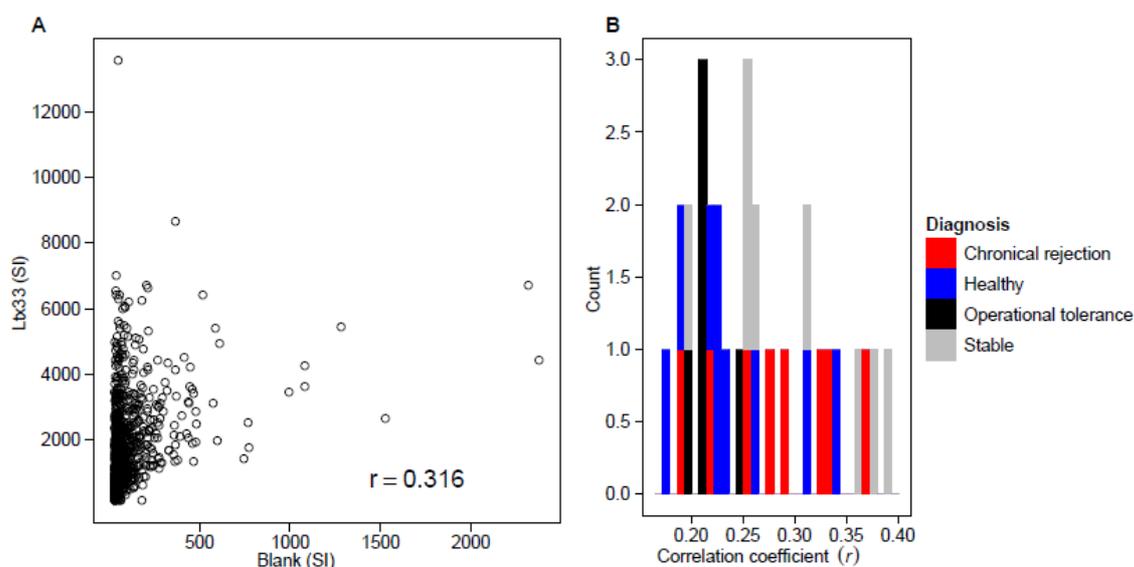
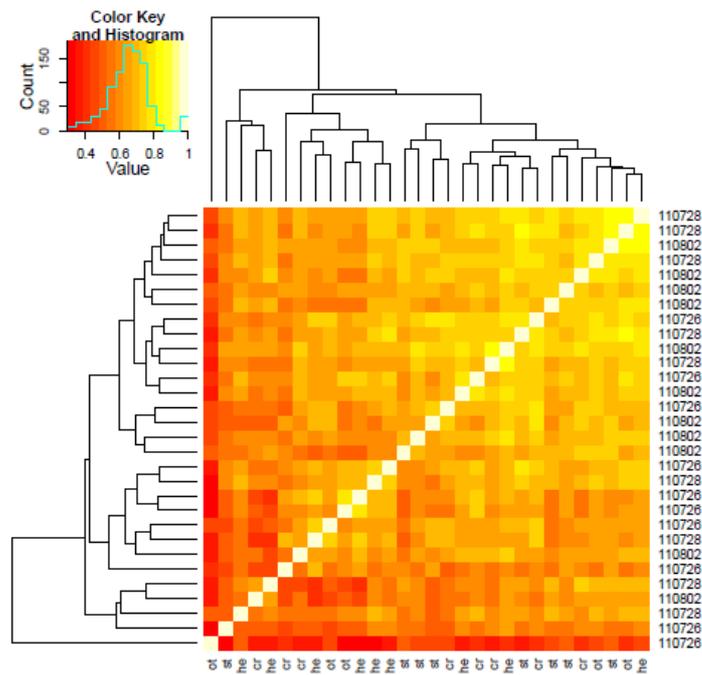
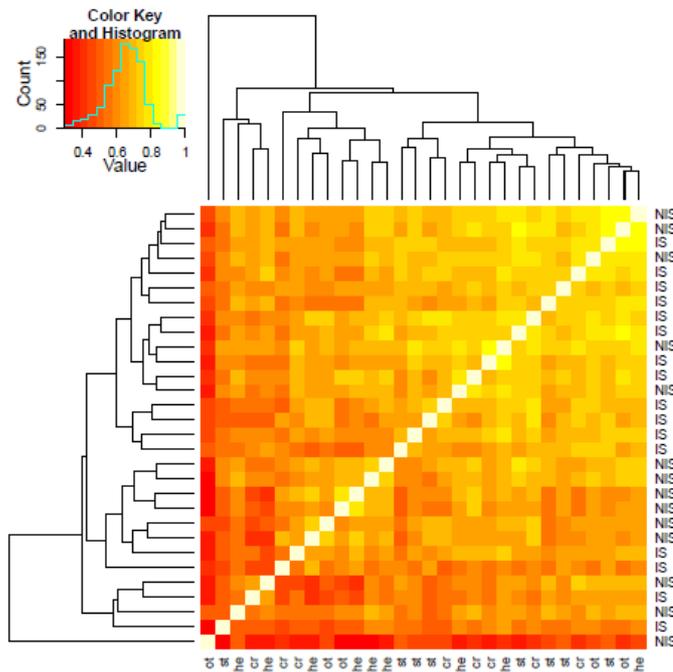


Figura 35. Baixa correlação entre o branco e as demais amostras. (A) Correlação entre o indivíduo Ltx 33 (SI) e o branco. **(B)** Histograma de todas correlações com o branco. A média da correlação com o branco foi $r_{\text{media}}=0,253$. O desvio padrão foi $\sigma=0,063$.



(a) Heatmap by diagnosis groups and day of incubation



(b) Heatmap by diagnosis groups and status of immunosuppression

Figura 36. Intensidades de sinal das IgMs agrupadas quanto ao dia da incubação e estado de imunossupressão. Histograma do agrupamento hierárquico da matrix de correlação de todos os perfis de ligação dos anticorpos. Não existe agrupamento aparente das amostras quanto ao dia de incubação. No entanto, estáveis e saudáveis se aglomeram. A média da correlação entre todas as amostras é $r_{\text{media}}=0,648$. O desvio padrão é $\sigma=0,102$. $n=30$. IS, imunossuprimidos. NIS, não imunossuprimido. ot, indivíduos tolerantes operacionais. cr, indivíduos rejeição crônica. st, indivíduos estáveis. he, indivíduos saudáveis.

5.9 Análises de componente principal (PCA)

No presente estudo 30 amostras de plasma foram sondadas utilizando 942 peptídeos randômicos. Assim, o conjunto completo de dados pode ser considerado como um conjunto de 30 pontos em um espaço dimensional de 942. Para explorar, se os quatro grupos de estudos (OT, CR, ST ou HE) se agrupariam nesse espaço altamente dimensional, foi inicialmente realizada a análise de componente principal (PCA – *Principal Componente Analysis*). PCA falhou em separar os grupos de estudo quando todos os grupos eram analisados em conjunto (fig.37A). Quando os dados foram confrontados aos pares a análise de PCA conseguiu separar no plano gerado pelo PC1 e PC2 entre os grupos CR contra OT (fig.37B) e CR contra HE (fig.37C). Dessa forma o grupo CR conseguiu ser agrupado.

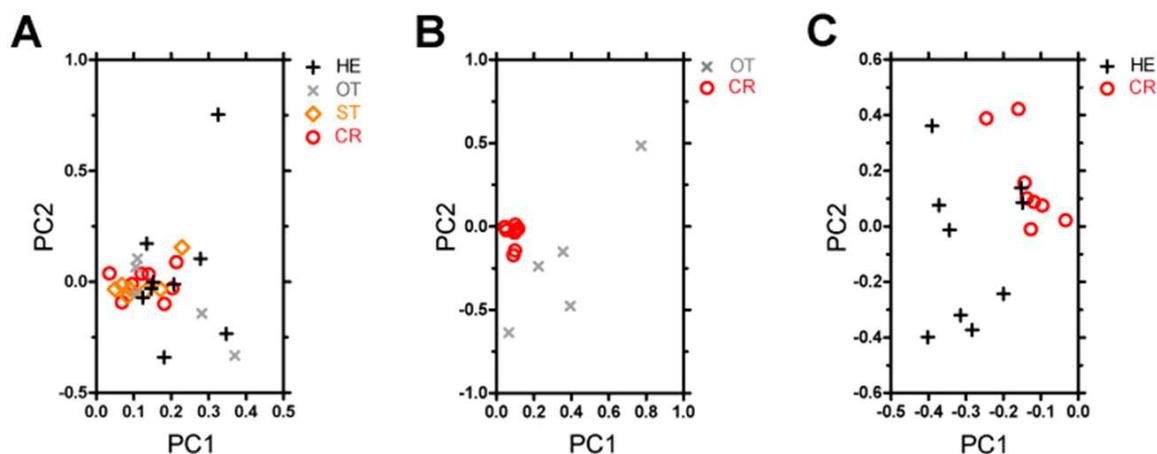


Figura 37. Análise de componente principal (PCA - *principal component analysis*) dos dados da intensidade de sinal das amostras. As amostras de plasma (n=30) foram sondadas utilizando os microarranjos contendo a biblioteca de 942 peptídeos randômicos. A intensidade de sinal dos perfis de ligação das IgMs foram obtidas após a detecção com o anticorpo secundário anti-IgM humana conjugado com Alexa647. **(A)** Corrida de PCA no plano dimensionado 942x30, a matrix de dados identificou duas fontes dominantes de variância (PC1 e PC2), que juntas respondem por 77,2% da variância nos dados. Os grupos de estudo não se separaram no plano gerado por PC1 e PC2. **(B)** Corrida de PCA entre os grupos CR e OT com os dados de intensidade de sinal de 16 peptídeos extraídos por P-SVM. Foi identificado duas fontes dominantes de variância (PC1 e PC2), que juntas respondem por 91,7% da variância nos dados. O grupo CR se separou nesse plano gerado por PC1 e PC2. **(C)** Corrida de PCA entre os grupos CR e HE com os dados de intensidade de sinal de 22 peptídeos extraídos por P-SVM. Foi identificado duas fontes dominantes de variância (PC1 e PC2), que juntas respondem por 68,3% da variância nos dados. O grupo CR se separou nesse plano gerado por PC1 e PC2. ST, indivíduos transplantados estáveis (laranja); CR, indivíduos transplantados com rejeição crônica (vermelho); OT, indivíduos transplantados com tolerância operacional (cinza); HE, voluntários saudáveis (preto).

5.10 Análise por P-SVM (*Support Vector Machine Analysis*) e BACC (*Balanced Accuracy*)

A análise de vetor de suporte de máquina foi realizada utilizando uma implementação em R do algoritmo P-SVM (*Potential Support Vector Machine*) (Hochreiter e Obermayer, 2006). A SVM facilitou a classificação linear de dados em multidimensões com incorporação de seleção de características. O desempenho da classificação foi medido usando a validação cruzada *leave-one-out*. Onde a seleção de características e a seleção de hiper parâmetros foram realizadas em um *loop* de validação cruzada interno, independentemente da amostra teste do *loop* de validação cruzada externo. O *loop* interno foi usado para determinar a combinação de parâmetros que dariam o melhor desempenho de classificação: o custo do parâmetro *C* variou de 1 a 13 em 5 passos, o parâmetro de dispersão variou de 0,1 a 1,4 em 5 passos, e o número máximo de características variou de 1 a 10. O critério de classificação almejado foi o BACC (balanced accuracy, Equação 1), uma vez que o número de recursos é elevado em relação ao número de amostras, as correlações entre as características e do alvo podem ocorrer ao acaso. Para quantificar esses efeitos aleatórios, foram realizados testes de permutação. Para cada uma das três tarefas de classificação, anteriormente foi realizada uma validação cruzada com 1000 embaralhamentos independentes do *label vector*. Em seguida, a proporção dos resultados em que a BACC foi, pelo menos tão bom quanto para o *label vector* original desembaralhado é uma estimativa não tendenciosa do verdadeiro *p-value*, i. e. a probabilidade para alcançar uma BACC pelo menos tão boa quanto a observada sob a hipótese nula de que as etiquetas e os dados de entrada são independentes.

Tabela 10. Classificação supervisionada dos grupos de estudo por P-SVM^a

Study Groups	BACC	Sensitivity [%]	Specificity [%]	p-value
OT-CR	73.8	60.0	87.5	0.029
(ST+CR)-(HE+OT)	68.8	50.0	87.5	0.019
CR-HE	66.0	44.4	87.5	0.037
(HE+OT+ST)-CR	49.4	36.4	62.5	0.553
OT-HE	46.7	60.0	33.3	0.461
OT-ST	37.5	75.0	0.0	1.000
CR-ST	37.5	75.0	0.0	1.000

^aGrupos de estudo em tratamento com imunossupressores (em vermelho, ST, estáveis; CR, indivíduos com rejeição crônica) e os grupos que não estão sob tratamento de imunossupressores (OT, indivíduos tolerantes operacionais; HE, voluntários saudáveis); BACC, balanced accuracy.

Equação 1: $BACC = 1/2 \times (\text{recall class 1} + \text{recall class 2})$

Tabela 11. Conjunto de peptídeos randômicos selecionados por P-SVM^a

#	OT-CR	CR-HE
1	GKILTMKKEQEFFDE	MNFMQIAINVTVPHF
2	PTNSSFFRQKQEIYIH	YGNRAQNWWISHVRE
3	AWHNP IAWLTPLYI	PQESSQTYALWPGNI
4	LVMVRGGYKKYEMHR	ADATPQQYLKHYQTT
5	LEINFHQRTNVYPP	WQWESVANIKFLTPR
6	FLFRWPWTRHQIGAG	VRKVTTHSAYWLIYYG
7	HTGAPLSKSWGKVPD	GFTGKPGQWLPGWQ
8	RNHDILEIEIEAPKR	PIGMTKSDWWRGQAF
9	QWIWQNGPKLVDHIP	GMLPMNNELGSWWGT
10	LQWKVRGTMWISHWA	IKVNHRYESLPGQSL
11	KVEQMGQERPDETTY	VDGLQFLTSDMTETH
12	PIGMTKSDWWRGQAF	TMNHIYEMRQAENVH
13	GSVGTPGAHDEFIVI	HPASPSWGIDRPHKI
14	SEIQPSMWMIDADAH	QHNEMRFRWAWNREM
15	WGVIPRPHSLLLFFE	ESNRWLEWGQIYASH
16	EKTVSAEYVIVDMHA	FNPWNEVEFNKTKMA
17		ERFQWGHLETLAQHR
18		IDYVKTKNNMDKDMP
19		SYLWWNSRQYDTMNO
20		TWEIFNWTGYAEVG
21		GYWTFNGHIRNMWDP
22		YWTQKQVFVEVAENYS

^a Sequência de aminoácidos dos peptídeos que discriminaram OT-CR (n=16) ou CR-HE (n=22).

Discussão

“Quem decidir se colocar como juiz da verdade e do conhecimento é naufragado pela garganta dos Deuses”

Albert Einstein

Físico Alemão

6. DISCUSSÃO

6.1 Resultados obtidos a partir do *phage display*

Diante dos objetivos propostos, inicialmente observamos que foi possível padronizar as técnicas de seleção dos fagos reativos, tanto da biblioteca comercial, quanto dos fagos subtraídos e eluídos a partir dos anticorpos dos pacientes saudáveis (fig.02), como exemplo podemos citar a detecção dos melhores anticorpos (Ab 19 e Ab 72, respectivamente, anti-Fc humano feito em cabra conjugado a fosfatase alcalina e anti-IgM humana feito em cabra conjugado a fosfatase alcalina) que foram utilizados na captura dos anticorpos presentes no plasma dos sujeitos da pesquisa (fig.03 e 04). Mesmo que os anticorpos Ab 19 e 72 tenham apresentado um melhor desempenho pela ausência de um anticorpo conjugado para sua detecção, eles apresentaram um resultado aceitável quanto à captura, devido não apresentarem resposta cruzada, ou seja, o anticorpo anti-IgG (Ab19) não demonstrou um alto sinal de captura ($Abs >0,1$) quando desafiado contra a molécula de IgM, o mesmo aconteceu quando o anticorpo anti-IgM foi testado contra a molécula de IgG ($Abs >0,1$).

A ausência de um perfil diferencial utilizando a técnica de *phage display*, provavelmente se deve a presença de poucas sequências de indivíduos tolerantes e indivíduos com rejeição crônica para a devida comparação com as sequências peptídicas obtidas até o presente momento (tabelas 03 a 08), assim como a necessidade de um maior número de sequências peptídicas dos indivíduos saudáveis para que se possa estabelecer um padrão de reatividades dos desses indivíduos ditos normais. Isso se deve até por uma dificuldade da técnica, já que o sequenciamento utilizado foi pelo método Sanger, onde apesar de ser uma metodologia de sequenciamento automático, as amostras devem ser preparadas uma-a-uma na placa de 96 poços. Pela metodologia do *phage display*, as seleções deveriam ser plaqueadas a partir de várias diluições de células, que foram previamente infectadas com os fagos selecionados pelos anticorpos. Como recomendação do kit (pH D. 12 Biolabs (# E8110S) as placas com mais de 100 colônias são pouco confiáveis. O que tornou laborioso o processo de obtenção de

colônias para serem seqüenciadas. Apesar disso, com as sequências obtidas conseguimos fazer uma análise prévia dos peptídeos selecionados pelos fagos, tanto dos eluídos quanto dos subtraídos. Nessa caracterização notamos que a frequência de ponto isoelétrico (PI) encontrada na maioria das sequências é em torno de 6 a 7 ou 9 a 10 (fig.05). Mesmo assim, com uma porcentagem menor, foram encontrados peptídeos entre os PIs 3 a 5 e 7 a 8 (fig.05).

As análises relacionadas à distribuição dos aminoácidos que compõem as sequências peptídicas demonstram uma frequência bastante randômica, salvo algumas exceções. Nos peptídeos dos indivíduos saudáveis há indícios de uma predominância do aminoácido prolina nas posições 2 (SGS e EGS – fig.06 e 08), 4 (SMS, EGS e EMS – fig.07, 08 e 09), 8 e 12 (EGS – fig.08) e esta frequência se repete nas posições 4, 8 e 12 quando os peptídeos reconhecidos pelos indivíduos saudáveis são analisados em conjunto (fig.16)

Quanto aos peptídeos dos indivíduos tolerantes operacionais. Nas amostras SMT, há frequência do aminoácido arginina na posição 6 (fig.10). Já nas amostras EGT (fig.11) o aminoácido prolina aparece na posição 4 e serina na posição 5. Nas posições 1 e de 6 a 12 a frequência de aminoácidos é muito randômica, provavelmente devido ao número de sequências obtidas ser muito baixo (n=10). Na figura 12 analisando as amostras EGT juntamente com as três sequências obtidas nas amostras EMT não houve alteração na frequência das posições 4 (P) e 5 (S), mas foi observado um pequeno aumento na frequência de serina nas posições 2 e 3, as demais posições não se alteraram. Quando as análises dos indivíduos tolerantes operacionais foram em conjunto nada significativo foi encontrado (fig.17).

Nos peptídeos dos indivíduos rejeição crônica, provavelmente devido ao baixo número de sequências obtidas (n=12), a frequência observada foi bastante randômica em todas as posições, salvo diferenças sutis entre as amostras eluídas (EGR e EMR – fig.13) e subtraídas (SGR e SMR – fig.14), onde observamos a presença do aminoácido leucina na posição 6 das amostras eluídas e a presença do aminoácido treonina na posição 4 das amostras subtraídas. Nas demais posições nada foi observado. Quando as amostras dos indivíduos CR foram analisados em conjunto (fig.18) a frequência das posições 4 e 6 se manteve, e apesar de alguns aminoácidos aparecem nesta análise em conjunto nas posições 1, 2, 7, 8 e 9

nenhuma frequência predominante foi observada. As demais posições não se alteraram.

Quando as análises são feitas com todos os peptídeos dos indivíduos OT, CR e HE ao mesmo tempo (fig.15), somente os fagos subtraídos OT, CR e HE (fig.20) ou somente os fagos eluídos de OT e CR (fig.19) a frequência de todas as posições é bastante randômica não podendo ser indicada nenhuma prevalência apesar da presença dos aminoácidos prolina e treonina em algumas posições.

Mesmo assim, com os resultados de *phage display* obtidos até o presente momento, podemos iniciar uma padronização de dados para posteriores análises computacionais. Nas tabelas 03 a 08 foram agrupadas informações quanto a composição de aminoácidos, ponto isoelétrico, presença de regiões potencialmente antigênicas, conformação e estrutura secundária dos peptídeos obtidos até o momento. Informações estas que podem ser utilizadas como entrada de dados em algoritmos de aprendizado de máquina ou rede neural que serão desenvolvidos e utilizados para a identificação de peptídeos ou grupos de peptídeos potencialmente diferenciais entre os grupos de pacientes. Este tipo de algoritmo preditivo já foi obtido com sucesso pelo nosso grupo para a diferenciação entre RNAs codificadores e não codificadores (Arrial e cols., 2009).

A titulação e sequenciamento do DNA dos fagos selecionados foi adaptada e padronizada a partir do protocolo fornecido pelo kit pH.D.12 Biolabs (# E8110S). Para tanto o *primer* de sequenciamento teve que ser modificado e re-desenhado para que se adequasse a plataforma de sequenciamento automático utilizada (Sanger), já que o *primer* fornecido pelo kit da Biolabs não amplificou a sequência com uma qualidade aceitável.

Para maiores análises dos resultados obtidos a partir dos peptídeos selecionados por *phage display*, há necessidade de obtenção de uma maior quantidade de sequências a partir de todos os grupos analisados. Somente a partir disso as análises matemáticas, estatísticas e comparativas poderão ser aplicadas dando maior confiabilidade aos nossos dados. Vale lembrar que sequenciar várias placas de uma mesma seleção ou obter mais clones de uma mesma seleção não é indicado pelo kit da Biolabs. Dessa forma várias sequências poderiam se repetir e ainda assim isso não demonstra uma preferência de reconhecimento dos anticorpos utilizados, nem mesmo um perfil diferencial. Por isso o uso de uma nova tecnologia

de sequenciamento que gere uma maior quantidade de sequências em uma única seleção deve ser utilizada.

6.2 Resultados obtidos a partir do microarranjo peptídico

Apresentamos nesse trabalho os resultados obtidos a partir da colaboração internacional com o grupo de pesquisa da Dra.Or-Guil. da Humboldt University em Berlin realizado durante o período de doutorado-sanduiche. Nessa colaboração avaliamos o padrão do perfil peptídico e imunológico do soro de cada paciente utilizando a técnica de *peptide microarray*. Onde o soro de cada um dos indivíduos dos grupos de interesse foi hibridizado na superfície dos microchips obtidos através da empresa Pepscan Presto (RC Lelystad, Holanda). Todas as análises matemáticas, estatísticas e comparativas desta técnica foram feitas de acordo com os protocolos utilizados correntemente pelo grupo da Dra. Or-Guil. Com isso pretendíamos identificar potenciais epítopos de anticorpos reguladores, selecionar peptídeos reconhecidos diferencialmente e analisar o padrão de reconhecimento das imunoglobulinas IgM nos grupos experimentais. A intensidade de sinal (SI) de cada ponto no chip com a presença de um peptídeo (*spot*) foi medida a partir da ligação das IgMs presentes no plasma dos sujeitos de pesquisa. A identificação dessa ligação somente foi possível devido ao uso do anticorpo anti-IgM humana conjugado a Alexa647 (20 µg/ml; Invitrogen, Darmstadt, Alemanha). Essa fluorescência foi medida e analisada computacionalmente.

Quanto a correlação na quantificação das amostras, Todos os plasmas tem o mesmo perfil quantitativo (fig.21A-C), ou seja, todos os indivíduos tem uma correlação próxima quanto a quantidade de anticorpos presentes no plasma. Isso pode indicar que a diferença de sinal observada nos microarranjos analisados seja devido a uma preferência de ligação e não a simples quantidade de anticorpos presentes no plasma. O único indivíduo que não se encaixa nesse perfil é o Ltx 28 (ST), sua alta intensidade de sinal parece estar relacionada à alta concentração de imunoglobulinas presentes no plasma. (fig.22C , 23 e 32). Razoavelmente este dado deveria ser desconsiderado das análises. Mas apesar disso este indivíduo permaneceu nas análises estatísticas, já que suas repetições indicaram sempre o mesmo resultado. Vale ressaltar que essas repetições não comprovam que a

intensidade de sinal do indivíduo em questão tenha alguma relação com perfil global de ligação do grupo. Seu caráter individual de ligação ser um indicativo de uma série de fatores não relacionados à análise, como por exemplo, uma infecção viral pouco tempo antes da coleta do plasma ou alguma outra reação imune que elevou a quantidade de imunoglobulinas presentes no plasma. Como não há como prever quais imunoglobulinas seriam importantes na análise do perfil inflamatório renal este dado poderia ser desconsiderado. Mas a sua inclusão não afetou nenhuma das análises estatísticas apresentadas nesse trabalho. Pois quando cruzados os níveis plasmáticos tanto de proteína total, IgM e IgG, nota-se um alta grau de correlação entre todos os grupos (fig.22A-C). Podendo indicar que o status imunológico humoral dos indivíduos, quanto aos anticorpos IgG e IgM, estaria no mesmo patamar, já que sua correlação é alta. Se esse perfil de imunidade humoral está de certa forma equilibrado, pode-se se dizer que o sistema imune dos indivíduos, numa visão quantitativa, seria bastante semelhante. Então qualquer resultado que indique uma variação na intensidade de sinal no perfil de ligação aos microarranjos estaria relacionado ao padrão de ligação de cada grupo e não a quantidade de anticorpos presentes. Sendo isso observado no testes de correlação dos níveis de concentração sérica de IgG (fig.23A), IgM (fig.23C) e proteína total (fig.23B) e a média da intensidade de sinal (SI) encontrada nos microarranjos

Para a comparação as distribuições individuais de intensidade de sinal (SI) das amostras dos quatro grupos de estudo foram feitos vários gráficos do tipo *snake plots* comparando os grupos de estudo analisados um contra o outro ou em conjunto. Quando a sobreposição das intensidades de sinal dos peptídeos de cada microchip é analisada com todas as amostras ao mesmo tempo fica difícil tirar qualquer tipo de conclusão (fig.30). Por isso, os *snake plots* feitos aos pares foi utilizado. Nesses *snake plots* observamos que a média da SI dos grupos de indivíduos imunossuprimidos (CR e ST) fica um pouco abaixo da média da SI dos indivíduos não imunossuprimidos (OT e HE) (fig. 26B). Talvez essa baixa SI seja um reflexo da carga de imunossupressores que esses indivíduos estão expostos, em contrapartida as análises da concentração de anticorpos presentes no plasma desses mesmos indivíduos não demonstram esta diferença quando comparamos os grupos. Sabemos que as drogas utilizadas no tratamento dos sujeitos da pesquisa, não afetam, pelo menos não diretamente, a concentração dos anticorpos do plasma

(Silva, H.M. e cols, 2012). Mas de alguma forma a intensidade de ligação dos anticorpos dos pacientes imunossuprimidos está sendo afetada de forma negativa. Nos *snake plots* onde foram utilizados um grupo contra outro este mesmo padrão de sinal foi observado. Nas comparações da média de SI do grupo dos indivíduos tolerantes operacionais (OT) com os demais grupos, seu sinal foi mais alto quando comparado com os indivíduos rejeição crônica (CR) (fig.27B), e apesar de SI muito próximos, os voluntários saudáveis (HE) demonstraram ter um sinal um pouco acima (fig.28B), mesmo quando comparamos de forma cruzada (fig.28C). Já quando comparamos os OT com os indivíduos estáveis (ST) as SIs praticamente se sobrepõem (fig.29B) mas quando observamos o desvio padrão desse mesmos SIs isso não é observado (fig.29A) Provavelmente se a intensidade de sinal desse snake plot em questão for corrigida pelo valor do desvio padrão esta sobreposição não seria observada.

Isso é observado quando tomamos como base o grupo de indivíduos portadores de rejeição crônica para as análises. Quando comparamos os indivíduos CR contra os indivíduos estáveis (ST), utilizando o desvio padrão como correção, as intensidades de sinal se sobrepõem (fig.31C) indicando um mesmo padrão de ligação dos anticorpos presentes no plasma desses dois grupos aos peptídeos randômicos presentes nos microchips. Quando comparamos os indivíduos CR contra OT (fig.31A) e CR contra HE (fig.31B) o mesmo padrão de intensidade de sinal é observado como o demonstrado nos testes anteriores.

Na comparação da intensidade de sinal de cada sujeito da pesquisa utilizando a média da intensidade de sinal de cada microchip (fig.32) conseguimos observar três níveis de SI. O primeiro fica em torno da média de SI de 0 a 4000. Nessa faixa estão presentes todos os indivíduos portadores de rejeição crônica, três indivíduos saudáveis, três tolerantes operacionais e sete dos oito indivíduos estáveis. O segundo nível observado fica em torno de média de SI de 4000 a 8000. Nesse nível estão os demais indivíduos saudáveis (n=5) e os demais indivíduos tolerantes operacionais (n=2). O terceiro e último nível observado fica com a média de SI acima de 10.000, nele se encontra apenas o indivíduo Ltx28 (ST). Que conforme foi observado anteriormente é o único indivíduo que a intensidade de sinal está muito acima da média (outlier). Este indivíduo em questão não foi retirado das análises devido suas repetições sempre indicarem o mesmo nível de SI, e também

pelo fato de seu alto nível não afetar as análises matemáticas e estatísticas realizadas no presente trabalho. Mesmo assim, este alto grau de SI dos anticorpos presentes no plasma do indivíduo em questão, não necessariamente tem relação com o quadro clínico em que ele se encontra. Podendo ser um reflexo de sua resposta imune frente a alguma infecção viral, bacteriana ou algum quadro inflamatório não relacionado com o nosso trabalho.

Por isso as análises de validação das SIs dos microchips foram necessárias. Dessa forma pudemos comprovar que a intensidade do sinal de ligação dos anticorpos presentes no plasma dos sujeitos de pesquisa não aconteciam fortuitamente (fig.33), e não sofriam influência da composição protéica das amostras (fig.23), do dia em que a incubação ocorreu (fig.36A), ou do estado clínico dos indivíduos (IS ou NIS) (fig.36B). Assim como, quando observamos a baixa correlação na intensidade de sinal das amostras quando comparadas ao branco (fig.23 e 35)

Apesar disso, a correlação entre a média da SI das amostras e a concentração de IgM sérica é um pouco elevada ($r=0,800$) (fig.23C) quando comparada com a correlação observada entre a média da SI das amostras e a concentração de IgG ($r=0,019$) (fig.23A) e proteína total ($r=0,058$) (fig.23B). Mesmo assim, apesar desse valor não ser considerado significativo e o gráfico se apresentar bastante disperso, um certo grau de correlação é esperado, afinal o sinal medido nas análise é o da molécula de IgM. Não foi encontrado um cutoff bem definido, mas normalmente se aceita uma correlação de Pearson com valor de r acima de 0,85 no mínimo. Curiosamente, a correlação entre o título de IgM e a media de SI foi forte quando os sujeitos do estudo estavam sob tratamento imunossupressivo (ST+CR, $r=0.970$; $p<0.001$) (fig.34A).

Para a análise da distribuição da intensidade de sinal foram feitos histogramas da distribuição logarítmica (log) das intensidades de sinal (SI) e estes indicaram uma distribuição normal (distribuição Gaussiana) na população analisada e para quase todas as amostras individuais (fig.25). A distribuição normal, como uma linha suave, existe apenas teoricamente. Na prática, o que se observam são histogramas que se aproximam, maior ou menor grau, de uma curva normal. Se o histograma lembra uma distribuição normal e se a amostra é relativamente grande, as probabilidades fornecidas pela curva e as freqüências relativas observadas no

histogramas são bastante próximas (Callegari-Jacques, S. M. 2003) Assim, a variabilidade biológica das amostras excedeu a variabilidade tecnológica do ensaio (fig 24C). Apesar da variação da intensidade de sinal ser bastante parecida, algumas diferenças sutis devem ser levadas em conta.

Para explorar o potencial classificatório das sequências peptídicas presentes nos microchips, foram utilizadas técnicas computacionais de predição baseadas em classificação supervisionada por Máquina de Vetores de Suporte (P-SVM) e Análise de Componente Principal (PCA). Sendo que o conjunto completo de dados pode ser considerado como um conjunto de 30 pontos (sujeitos da pesquisa) em um espaço dimensional de 942 (peptídeos randômicos presentes nos microchips). A análise de componente principal (PCA – Principal Component Analysis) foi inicialmente realizada na intenção de agrupar os quatro grupos experimentais em um espaço altamente dimensional. Embora, os dois primeiros componentes principais encontrados expliquem 77,2% da variação do conjunto de dados, o PCA falhou em separar os grupos de estudo quando todos os grupos eram analisados em conjunto (fig.37A). Quando os dados foram confrontados aos pares na corrida de PCA entre os grupos CR e OT com os dados de intensidade de sinal de 16 peptídeos extraídos por P-SVM. Foi identificadas duas fontes dominantes de variância (PC1 e PC2), que juntas respondem por 91,7% da variância nos dados. O grupo CR se separou nesse plano gerado por PC1 e PC2. (fig.37B) e com a Corrida de PCA entre os grupos CR e HE com os dados de intensidade de sinal de 22 peptídeos extraídos por P-SVM. Foi identificadas duas fontes dominantes de variância (PC1 e PC2), que juntas respondem por 68,3% da variância nos dados. O grupo CR se separou nesse plano gerado por PC1 e PC2 (fig.37C). Dessa forma o grupo CR conseguiu ser agrupado. Com isso conseguimos um conjunto de peptídeos randômicos selecionados por P-SVM que discriminaram OT-CR (n=16) ou CR-HE (n=22).

Conclusão e Perspectivas

*“Para os crentes, Deus está no princípio de todas as coisas.
Para os cientistas, no final de toda reflexão”*

Max Planck
Físico Alemão

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A partir dos dados obtidos no presente trabalho concluímos que é possível a padronização da técnica de apresentação de peptídeos na superfície de fagos para a seleção de grupos peptídicos na tentativa de encontrar uma identidade randômica quanto ao perfil de ligação de anticorpos presentes nos sujeitos da pesquisa. Mesmo a sendo técnica de phage display mais comumente utilizada para a seleção de melhores ligantes entre uma biblioteca de moléculas foi possível selecionar um grupo de moléculas capazes de se ligar aos anticorpos presentes no plasma de forma que não somente os melhores ligantes foram selecionados, mas sim todas os peptídeos presentes nas partículas virais que de alguma forma tinham alguma afinidade pelos anticorpos dos pacientes. Mesmo assim a técnica deve ser melhorada para que seja possível a obtenção de mais sequencias utilizando as novas técnicas de sequenciamento de alto desempenho que surgiram na última década. Possivelmente uma nova metodologia de seleção deva ser testada, pois como as atuais tecnologias de sequenciamento automático o número de sequencias fornecidas em uma única corrida já seria suficiente para varrer todas as possibilidades de moléculas ligantes e não mais seria necessário uma seleção subtrativa, eliminando uma das etapas do processo de seleção utilizado neste trabalho. Para tanto a amplificação por PCR dos fagos selecionados deve ser padronizada, procedimento este que já está em andamento como projeto de mestrado da aluna Oliveira MP, assim como a análise dos novos indivíduos tolerantes operacionais que foram acrescentados durante o período do presente trabalho e não puderam ser adicionados as análises que já estavam em andamento.

Neste trabalho também conseguimos caracterizar os peptídeos selecionado por phage display quanto a sua frequência dos aminoácidos, composição da proteína quanto ao ponto isoelétrico, assinaturas de famílias protéicas, localização de sítios antigênicos e predição de estruturas secundárias. Com essas informações podemos iniciar uma padronização de dados para posteriores análises computacionais, essas informações também podem ser utilizadas como entrada de dados em algoritmos de aprendizado de máquina ou rede neural que são

desenvolvidos e utilizados para a identificação de peptídeos ou grupos de peptídeos potencialmente diferenciais entre os grupos de pacientes.

Durante o trabalho realizado em colaboração com o grupo da Dra. Orguil conseguimos validar a metodologia de microarranjo peptídico utilizando o plasma dos indivíduos sujeitos da pesquisa assim como confirmar que as diferenças encontradas na intensidade de sinal de cada uma das amostras não tem correlação com a concentração sérica de anticorpos IgG ou IgM presentes no plasma dos pacientes. Mostrando que os sinais encontrados estão relacionados a capacidade de ligação dos anticorpos de interesse e não a sua quantidade presente no soro dos indivíduos estudados. Além disso conseguimos encontrar um conjunto de peptídeos randômicos selecionados por P-SVM e PCA que tem a capacidade, ainda que limitada, de discriminar os grupos OT-CR (n=16) ou CR-HE (n=22). Outra perspectiva para o presente trabalho é o uso de um outro tipo de microarranjo peptídico, um imunochip, este microchip ao invés de peptídeos randômicos possui utiliza antígenos sabidamente discriminatórios para distinguir com antecedência, se um animal pode vir a desenvolver diabetes, doença de Alzheimer, influenza ou infecção por nematóides e possivelmente a progressão ou não para o estado de tolerância operacional.

Referências Bibliográficas

“Culto é aquele que sabe onde encontrar aquilo que não sabe”

George Simmel

Sociólogo Alemão

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afzali B, Lechler RI, Hernandez-Fuentes MP. Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens*. 2007 Jun;69(6):545-56.
- Ahmed KA, Xiang J. Mechanisms of cellular communication through intercellular protein transfer. *J Cell Mol Med*. 2010 Jan 11.
- Ansari, M. J., Tinckam, K. e Chandraker, A. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med*. 2005;352(19):2027-8; author reply 2027-8.
- Arrial RT, Togawa RC, Brigido Mde M. Screening non-coding RNAs in transcriptomes from neglected species using PORTRAIT: case study of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *BMC Bioinformatics*. 2009 Aug 4;10:239.
- Ashton-Chess J, Brouard S, Souillou JP. Is clinical tolerance realistic in the next decade? *Transpl Int*. 2006 Jul;19(7):539-48.
- Ashton-Chess, J., M. Giral, et al. Using biomarkers of tolerance and rejection to identify high- and low-risk patients following kidney transplantation. *Transplantation*, v.87, n.9 Suppl, May 15, p.S95-9. 2009.
- Bacchetta R, Sartirana C, Levings MK, Bordignon C, Narula S, Roncarolo MG. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur J Immunol*. 2002 Aug;32(8):2237-45.
- Barbas III CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. Phage display: A laboratory Manual. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med*. 2002 Mar 4;195(5):603-16.
- Bedford, P., Garner, K. e Knight, S. C. MHC class II molecules transferred between allogeneic dendritic cells stimulate primary mixed leukocyte reactions. *Int Immunol*. 1999;11(11):1739-44.

- Bennett CL, Christie J, Ramsdell F et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20–1.
- Blair, P. A., Norena, L. Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D. J., Isenberg, D. A., Ehrenstein, M. R., et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity*. 2010;32:129-140.
- Bongartz, J., N. Bruni, and M. Or-Guil. 2009. Epitope mapping using randomly generated peptide libraries. *Methods Mol Biol* 524:237-246.
- Bonsib, S. M., Abul-Ezz, S. R., Ahmad, I., Young, S. M., Ellis, E. N., Schneider, D. L., et al. Acute rejection-associated tubular basement membrane defects and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int.* 2000;58(5):2206-14.
- Bouaziz, J. D., Yanaba, K. e Tedder, T. F. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol Rev.* 2008;224:201-14.
- Braudeau C, Ashton-Chess J, Giral M, Dugast E, Louis S, Pallier A, et al. Contrasted blood and intragraft toll-like receptor 4 mRNA profiles in operational tolerance versus chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation.* 2008 Jul 15;86(1):130-6.
- Brouard S, Dupont A, Giral M, Louis S, Lair D, Braudeau C, et al. Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am J Transplant.* 2005 Feb;5(2):330-40.
- Brouard S, Mansfield E, Braud C, Li L, Giral M, Hieh SC, et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 Sep 25;104(39):15448-53.
- Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA et al. Disruption of a new forkhead / winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001;27: 68–73.
- Cai J, Lee J, Jankowska-Gan E, Derks R, Pool J, Mutis T, et al. Minor H antigen HA-1-specific regulator and effector CD8+ T cells, and HA-1 microchimerism, in allograft tolerance. *J Exp Med.* 2004 Apr 5;199(7):1017-23.
- Cai J, Terasaki PI. Human leukocyte antigen antibodies for monitoring transplant patients. *Surg Today.* 2005a;35(8):605-12.

- Cai J, Terasaki PI. Humoral theory of transplantation: mechanism, prevention, and treatment. *Hum Immunol*. 2005b Apr;66(4):334-42.
- Caldas C, Luna E, Spadafora-Ferreira M, Porto G, Iwai LK, Oshiro SE, e cols. Cellular autoreactivity against heat shock protein 60 in renal transplant patients: peripheral and graft-infiltrating responses. *Clin Exp Immunol*. 2006 Oct;146(1):66-75.
- Callegari-Jaques SM. Bioestatística princípios e aplicações. Porto Alegre. Artmed. 2003
- Cancro, M. P. e Kearney, J. F. B cell positive selection: road map to the primary repertoire? *J Immunol*. 2004;173(1):15-9.
- Cavani A, Nasorri F, Prezzi C, Sebastiani S, Albanesi C, Girolomoni G. Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. *J Invest Dermatol*. 2000 Feb;114(2):295-302.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003 Dec 15;198(12):1875-86.
- Chen, Y. Kuchroo, V. K. Inobe, J. Hafler, D. A. Weiner, H. L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*, v. 265, n. 5176, p. 1237-40, Aug 26 1994.
- Chikuma S, Bluestone JA. CTLA-4 and tolerance: the biochemical point of view. *Immunol Res*. 2003;28(3):241-53.
- Cohen IR, Quintana FJ, Mimran A. Tregs in T cell vaccination: exploring the regulation of regulation. *J Clin Invest*. 2004 Nov;114(9):1227-32
- Cohen IR. Peptide therapy for type I diabetes: the immunological homunculus and the rationale for vaccination. *Diabetologia*. 2002, 45:1468-1474.
- Cohen IR. Real and artificial immune systems: computing the state of the body. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jul;7(7):569-74.
- Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol*. 2005 Oct;5(10):807-17.
- Colvin, R. B. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol*, v.18, n.4, Apr, p.1046-56. 2007.

- Colvin, R. B. e Nickeleit, V. Renal Transplant Pathology. In: J. Jennette, J. Olson, M. Schwartz e F. Silva, editors. *Heptinstall's Pathology of the Kidney*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2006. p. 1347-1490.
- Cornell, L. D., Smith, R. N. e Colvin, R. B. Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:189-220.
- Costell, M., Gustafsson, E., Aszodi, A., Morgelin, M., Bloch, W., Hunziker, E., et al. Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol*. 1999;147(5):1109-22.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research*. 2004, 14:1188-1190.
- Dalwadi, H., Wei, B., Schrage, M., Spicher, K., Su, T. T., Birnbaumer, L., et al. B cell developmental requirement for the G alpha i2 gene. *J Immunol*. 2003;170(4):1707-15.
- Davey GM, Kurts C, Miller JF, Bouillet P, Strasser A, Brooks AG, et al. Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross presentation of self-antigen occurs by a Bcl-2-inhibitable pathway mediated by Bim. *J Exp Med*. 2002 Oct 7;196(7):947-55.
- Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000. Jul 6;343(1):37-49. Review.
- Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2000 Jul 13;343(2):108-17. Review.
- Denzer, K., Van Eijk, M., Kleijmeer, M. J., Jakobson, E., De Groot, C. e Geuze, H. J. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol*. 2000;165(3):1259-65.
- Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med*. 2002 Jul 15;196(2):247-53. Erratum in: *J Exp Med* 2002 Aug 19;196(4):559. *J Exp Med* 2002 Sep 16;196(6):867.
- Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T. e Schuler, G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*. 2001;193(11):1303-10.

- Dragun D, Müller DN, Bräsen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelhä M, Dechend R, et al. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med*. 2005 Feb 10;352(6):558-69.
- Dragun, D. Humoral responses directed against non-human leukocyte antigens in solid-organ transplantation. *Transplantation*. 2008; 86(8):1019-25.
- Dragun, D., Muller, D. N., Brasen, J. H., Fritsche, L., Nieminen-Kelha, M., Dechend, R., et al. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med*. 2005;352(6):558-69.
- Duddy, M. E., Alter, A. e Bar-or, A. Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J Immunol*. 2004;172(6):3422-7.
- Eikmans, M., Sijpkens, Y. W., Baelde, H. J., De Heer, E., Paul, L. C. e Bruijn, J. A. High transforming growth factor-beta and extracellular matrix mRNA response in renal allografts during early acute rejection is associated with absence of chronic rejection. *Transplantation*. 2002;73(4):573-9.
- Erlich, H. A., Opelz, G. e Hansen, J. HLA DNA typing and transplantation. *Immunity*. 2001;14(4):347-56.
- Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev*. 2005 Aug;206:232-59.
- Fehr T, Sykes M. Tolerance induction in clinical transplantation. *Transpl Immunol*. 2004 Sep-Oct;13(2):117-30.
- Ferry, H., Leung, J. C., Lewis, G., Nijnik, A., Silver, K., Lambe, T., et al. B-cell tolerance. *Transplantation*. 2006;81(3):308-15.
- Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev*. 2008 Aug;224:166-82.
- Fillatreau, S., Sweenie, C. H., Mcgeachy, M. J., Gray, D. e Anderton, S. M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol*. 2002;3(10):944-50.
- Game, D. S., Rogers, N. J. e Lechler, R. I. Acquisition of HLA-DR and costimulatory molecules by T cells from allogeneic antigen presenting cells. *Am J Transplant*. 2005;5(7):1614-25.
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997 Oct 16;389(6652):737-42.

- Hall, T.(2007) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis programa for Windows 95/98/NT. Carlsbad: Ibis Biosciences.
- Harshyne, L. A., Watkins, S. C., Gambotto, A. e Barratt-Boyes, S. M. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol.* 2001;166(6):3717-23.
- Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol.* 2003 Mar;3(3):233-42.
- Helderman JH, Goral S. Transplant Immunobiology. In: Danovitch GM, editor.
- Herrera, O. B., Golshayan, D., Tibbott, R., Salcido Ochoa, F., James, M. J., Marelli-Berg, F. M., *et al.* A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol.* 2004;173(8):4828-37.
- Hochreiter, S., and K. Obermayer. 2006. Support vector machines for dyadic data. *Neural Comput* 18:1472-1510.
- Hoffmann, S. C., Hale, D. A., Kleiner, D. E., Mannon, R. B., Kampen, R. L., Jacobson, L. M., *et al.* Functionally significant renal allograft rejection is defined by transcriptional criteria. *Am J Transplant.* 2005;5(3):573-81.
- Hourmant, M., Cesbron-Gautier, A., Terasaki, P. I., Mizutani, K., Moreau, A., Meurette, A., *et al.* Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(9):2804-12.
- Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med.* 2000 Nov 6;192(9):1213-22.
- Kindt, T. J., Osborne, B. A. e Goldsby, R. A. *Kuby Immunology*: W.H. Freeman. 2002. 574 p.
- Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol.* 2002 Feb 1;168(3):1080-6.
- Knoechel, B., Lohr, J., Zhu, S., Wong, L., Hu, D., Ausubel, L., *et al.* Functional and molecular comparison of anergic and regulatory T lymphocytes. *J Immunol.* 2006;176(11):6473-83.

- Kyewski B, Klein L. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:571-606
- Kyewski B, Klein L. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:571-606.
- Lawson, C., Holder, A. L., Stanford, R. E., Smith, J. e Rose, M. L. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibodies in sera of heart transplant recipients: a role in endothelial cell activation. *Transplantation.* 2005;80(2):264-71.
- Lechler, R. I. e Batchelor, J. R. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med.* 1982;155(1):31-41.
- Legutki, J. B., D. M. Magee, P. Stafford, and S. A. Johnston. 2010. A general method for characterization of humoral immunity induced by a vaccine or infection. *Vaccine* 28:4529-4537.
- Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002 Dec;129(4):263-76.
- Levings MK, Gregori S, Tresoldi E, Cazzaniga S, Bonini C, Roncarolo MG. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood.* 2005 Feb 1;105(3):1162-9.
- Li Y, Koshiba T, Yoshizawa A, Yonekawa Y, Masuda K, Ito A, et al. Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transplant.* 2004 Dec;4(12):2118-25.
- Lisik W, Kahan B. Proliferation signal inhibitors: chemical, biologic, and clinical properties. *Transplantation Reviews.* 2005. 19:186-212.
- Liu, Y. J. A unified theory of central tolerance in the thymus. *Trends Immunol.* 2006;27(5):215-21.
- Louis S, Braudeau C, Giral M, Dupont A, Moizant F, Robillard N, et al. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation.* 2006 Feb 15;81(3):398-407.
- Lund FE. Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. *Curr Opin Immunol.* 2008 Jun;20(3):332-8.

- Magro CM, Klinger DM, Adams PW, Orosz CG, Pope-Harman AL, Waldman WJ, *et al.* Evidence that humoral allograft rejection in lung transplant patients is not histocompatibility antigen-related. *Am J Transplant.* 2003 Oct;3(10):1264-72.
- Martin L, Guignier F, Bocrie O, D'Athis P, Rageot D, Rifle G, *et al.* Detection of anti-HLA antibodies with flow cytometry in needle core biopsies of renal transplants recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation.* 2005 May 27;79(10):1459-61.
- Martínez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I, Orlando G, Tisone G, Lerut J, *et al.* Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest.* 2008 Aug;118(8):2845-57.
- Matthews JB, Ramos E, Bluestone JA. Clinical trials of transplant tolerance: slow but steady progress. *Am J Transplant.* 2003 Jul;3(7):794-803.
- Mauri C, Ehrenstein MR. The 'short' history of regulatory B cells. *Trends Immunol.* 2008 Jan;29(1):34-40.
- Mazariegos GV, Zahorchak AF, Reyes J, Chapman H, Zeevi A, Thomson AW. Dendritic cell subset ratio in tolerant, weaning and non-tolerant liver recipients is not affected by extent of immunosuppression. *Am J Transplant.* 2005 Feb;5(2):314-22.
- Mazariegos GV, Zahorchak AF, Reyes J, Ostrowski L, Flynn B, Zeevi A, *et al.* Dendritic cell subset ratio in peripheral blood correlates with successful withdrawal of immunosuppression in liver transplant patients. *Am J Transplant.* 2003 Jun;3(6):689-96.
- Mintz PJ, Kim J, Do KA, Wang X, Zinner RG, Cristofanilli M, Arap MA, Hong WK, Troncoso P, Logothetis CJ, Pasqualini R, Arap W. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat Biotechnol.* 2003 Jan;21(1):57-63
- Miyajima T, Shimizu R, Kuzuhara H, Fujimoto S. Anti-idiotypic antibodies in a patient with a well-functioning renal graft without azathioprine. II. Anti-idiotypic antibodies directed to a clonotype of a certain cytotoxic T lymphocyte. *Int Immunol.* 1989;1(5):503-8.
- Mizoguchi A, Bhan AK. A case for regulatory B cells. *J Immunol.* 2006 Jan 15;176(2):705-10.

- Mizutani, K., Terasaki, P., Bignon, J. D., Hourmant, M., Cesbron-Gautier, A., Shih, R. N., et al. Association of kidney transplant failure and antibodies against MICA. *Hum Immunol.* 2006;67(9):683-91.
- Moll S, Pascual M. Humoral rejection of organ allografts. *Am J Transplant.* 2005 Nov;5(11):2611-8.
- Monaco AP. The beginning of clinical tolerance in solid organ allografts. *Exp Clin Transplant.* 2004 Jun;2(1):153-61.
- Moraes-Vieira PM, Silva HM, Takenaka MC, Monteiro SM, Lemos F, Saitovitch D, et al. Differential monocyte STAT6 activation and CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells in kidney operational tolerance transplanted individuals. *Hum Immunol.* 2010 May;71(5):442-50.
- Morelli, A. E., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Sullivan, M. L., Stolz, D. B., Papworth, G. D., et al. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood.* 2004;104(10):3257-66.
- Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol.* 2010 Jan;11(1):21-7.
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med.* 2003 Dec 11;349(24):2326-33.
- Neumann J, Spadafora-Ferreira M, Goldberg AC, Tuder R, Macaubas C, Sabbaga E, et al. Reactivity of renal transplant sera against a 17 kD mononuclear cell antigen. *Transpl Int.* 1992;5 Suppl 1:S617-20.
- Newell KA, Larsen CP. Tolerance assays: measuring the unknown. *Transplantation.* 2006 Jun 15;81(11):1503-9.
- Nishimura, E., Sakihama, T., Setoguchi, R., Tanaka, K. e Sakaguchi, S. Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol.* 2004;16(8):1189-201.
- Nishio-Lucar A, Balogun RA, Sanoff S. Therapeutic apheresis in kidney transplantation: A review of renal transplant immunobiology and current interventions with apheresis medicine. *J Clin Apher.* 2013 Feb;28(1):56-63.
- Nobrega A, Haury M, Grandien A, Malanchère E, Sundblad A, Coutinho A. Global analysis of antibody repertoires. II. Evidence for specificity, self-selection

- and the immunological "homunculus" of antibodies in normal serum. *Eur J Immunol.* (1993) 23(11):2851-9.
- Nobrega A, Stransky B, Nicolas N, Coutinho A. Regeneration of natural antibody repertoire after massive ablation of lymphoid system: robust selection mechanisms preserve antigen binding specificities. *J Immunol.* 2002 Sep 15;169(6):2971-8.
 - Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2009 Jan;227(1):221-33.
 - Piccirillo, C. A. e Shevach, E. M. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol.* 2001;167(3):1137-40.
 - Pons JA, Revilla-Nuin B, Baroja-Mazo A, Ramírez P, Martínez-Alarcón L, Sánchez-Bueno F, et al. FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal. *Transplantation.* 2008 Nov 27;86(10):1370-8.
 - Quintana FJ, Hagedorn PH, Elizur G, Merbl Y, Domany E, Cohen IR. Functional immunomics: microarray analysis of IgG autoantibody repertoires predicts the future response of mice to induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Oct 5;101 Suppl 2:14615-21
 - Quintana FJ, Merbl Y, Sahar E, Domany E, Cohen IR. Antigen-chip technology for accessing global information about the state of the body. *Lupus.* 2006;15(7):428-30
 - Raats, C. J., Bakker, M. A., Hoch, W., Tamboer, W. P., Groffen, A. J., Van Den Heuvel, L. P., et al. Differential expression of agrin in renal basement membranes as revealed by domain-specific antibodies. *J Biol Chem.* 1998;273(28):17832-8.
 - Racusen, L. C., Solez, K., Colvin, R. B., Bonsib, S. M., Castro, M. C., Cavallo, T., et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int.* 1999; 55(2):713-23.
 - Rapaport FT, Dausset J, Converse JM, Lawrence HS. Biological and ultrastructural studies of leucocyte fractions as transplantation antigens in man. *Transplantation.* 1965 Jul;3:490-500.
 - R-Development-Core-Team. 2011. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org>.

- Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2000, 192(2): 295-302.
- Reddy, M. M., R. Wilson, J. Wilson, S. Connell, A. Gocke, L. Hynan, D. German, and T. Kodadek. 2010. Identification of candidate IgG biomarkers for Alzheimer's disease via combinatorial library screening. *Cell* 144:132-142.
- Rice, P., Longden, I. and Bleasby, A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*. 2000, 16, (6) pp276—277
- Rocha PN, Plumb TJ, Crowley SD, Coffman TM. Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunol Rev*. 2003 Dec;196:51-64.
- Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A, Subra JF, Legendre C, Noël C, et al. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2006 Apr;6(4):736-46.
- Rowe, V., Banovic, T., Macdonald, K. P., Kuns, R., Don, A. L., Morris, E. S., et al. Host B cells produce IL-10 following TBI and attenuate acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2006;108(7):2485-92.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995 Aug 1;155(3):1151-64.
- Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol*. 2009 Oct;21(10):1105-11.
- Schneider TD, Stephens RM. Sequence Logos: A New Way to Display Consensus Sequences. *Nucleic Acids Res*. 1990, 18:6097-6100
- Schwartz, R. H. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nature Immunology*. 2005;6:327.
- Shoenfeld Y. The idiotypic network in autoimmunity: antibodies that bind antibodies that bind antibodies. *Nat Med*. 2004 Jan;10(1):17-8.
- Shoskes, D. A. e Wood, K. J. Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol Today*. 1994;15(1):32-8.
- Silva HM, Takenaka MC, Moraes-Vieira PM, Monteiro SM, Hernandez MO, Chaara W, Six A, Agena F, Sesterheim P, Barbé-Tuana FM, Saitovitch D, Lemos

- F, Kalil J, Coelho V. Preserving the B-cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation. *Mol Med*. 2012 Jul 18;18:733-43.
- Sis, B., Mengel, M., Haas, M., Colvin, R. B., Halloran, P. F., Racusen, L. C., et al. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant*. 2010;10(3):464-71.
 - Smyth, L. A., Afzali, B., Tsang, J., Lombardi, G. e Lechler, R. I. Intercellular transfer of MHC and immunological molecules: molecular mechanisms and biological significance. *Am J Transplant*. 2007;7(6):1442-9.
 - Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, Campbell PM, Cascalho M, Collins AB, Demetris AJ, Drachenberg CB, Gibson IW, Grimm PC, Haas M, Lerut E, Liapis H, Mannon RB, Marcus PB, Mengel M, Mihatsch MJ, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Platt JL, Randhawa P, Roberts I, Salinas-Madruga L, Salomon DR, Seron D, Sheaff M, Weening JJ. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant*. 2007 Mar;7(3):518-26.
 - Steele, D. J., Laufer, T. M., Smiley, S. T., Ando, Y., Grusby, M. J., Glimcher, L. H., et al. Two levels of help for B cell alloantibody production. *J Exp Med*. 1996;183(2):699-703.
 - Steinmann J, Kaden J, May G, Schroder K, Herwartz C, Muller-Ruchholtz W. Failure of in vitro T-cell assays to predict clinical outcome after human kidney transplantation. *J Clin Lab Anal*. 1994;8(3):157-62.
 - Strober S, Benike C, Krishnaswamy S, Engleman EG, Grumet FC. Clinical transplantation tolerance twelve years after prospective withdrawal of immunosuppressive drugs: studies of chimerism and anti-donor reactivity. *Transplantation*. 2000 Apr 27;69(8):1549-54.
 - Sumitran-Holgersson, S., Wilczek, H. E., Holgersson, J. e Soderstrom, K. Identification of the nonclassical HLA molecules, mica, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. *Transplantation*. 2002;74(2):268-77.
 - Sun Q, Liu Z, Yin G, Chen H, Chen J, Li L. Detectable circulating antiendothelial cell antibodies in renal allograft recipients with C4d-positive acute rejection: a report of three cases. *Transplantation*. 2005 Jun 27;79(12):1759-62.

- Tapia V, Bongartz J, Schutkowski M, Bruni N, Weiser A, Ay B, Volkmer R, Or-Guil M. Affinity profiling using the peptide microarray technology: a case study. *Anal Biochem.* 2007 Apr 1;363(1):108-18.
- Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med.* 2001, 193(11): 1311-1318.
- Taylor, A. L., Negus, S. L., Negus, M., Bolton, E. M., Bradley, J. A. e Pettigrew, G. J. Pathways of helper CD4 T cell allorecognition in generating alloantibody and CD8 T cell alloimmunity. *Transplantation.* 2007;83(7):931-7.
- Terasaki PI, Ozawa M. Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: results of a 2-year prospective trial. *Transplantation.* 2005 Nov 15;80(9):1194-7.
- Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant.* 2003 Jun;3(6):665-73.
- Thomson AW, Mazariegos GV, Reyes J, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Bentlejewski C, et al. Monitoring the patient off immunosuppression. Conceptual framework for a proposed tolerance assay study in liver transplant recipients. *Transplantation.* 2001 Oct 27;72(8 Suppl):S13-22.
- Tokita D, Mazariegos GV, Zahorchak AF, Chien N, Abe M, Raimondi G, et al. High PD-L1/CD86 ratio on plasmacytoid dendritic cells correlates with elevated T-regulatory cells in liver transplant tolerance. *Transplantation.* 2008 Feb 15;85(3):369-77.
- VanBuskirk AM, Burlingham WJ, Jankowska-Gan E, Chin T, Kusaka S, Geissler F, et al. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest.* 2000 Jul;106(1):145-55.
- Vandekerckhove BA, Datema G, Koning F, Goulmy E, Persijn GG, Van Rood JJ, et al. Analysis of the donor-specific cytotoxic T lymphocyte repertoire in a patient with a long term surviving allograft. Frequency, specificity, and phenotype of donor-reactive T cell receptor (TCR)-alpha beta+ and TCR-gamma delta+ clones. *J Immunol.* 1990 Feb 15;144(4):1288-94.
- Warrens, A. N., Lombardi, G. e Lechler, R. I. Presentation and recognition of major and minor histocompatibility antigens. *Transpl Immunol.* 1994;2(2):103-7.

- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*. 1992 Mar 26;356(6367):314-7.
- Weiser AA, Or-Guil M, Tapia V, Leichsenring A, Schuchhardt J, Frömmel C, Volkmer-Engert R. SPOT synthesis: reliability of array-based measurement of peptide binding affinity. *Anal Biochem*. 2005 Jul 15;342(2):300-11
- Wells, A. D., Li, X. C., Strom, T. B. e Turka, L. A. The role of peripheral T-cell deletion in transplantation tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001; 356(1409):617-23.
- Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2003 Mar;3(3):199-210.
- Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Haas, K. M., Poe, J. C., Fujimoto, M. e Tedder, T. F. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*. 2008;28(5):639-50.
- Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Matsushita, T., Tsubata, T. e Tedder, T. F. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J Immunol*. 2009;182(12):7459-72.
- Yoshitomi M, Koshihara T, Haga H, Li Y, Zhao X, Cheng D, et al. Requirement of protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression after liver transplantation. *Transplantation*. 2009 Feb 27;87(4):606-14. Erratum in: *Transplantation*. 2009 Apr 15;87(7):1104.
- Zanin-Zhorov, A., Tal, G., Shivtiel, S., Cohen, M., Lapidot, T., Nussbaum, G., et al. Heat shock protein 60 activates cytokine-associated negative regulator suppressor of cytokine signaling 3 in T cells: effects on signaling, chemotaxis, and inflammation. *J Immunol*. 2005; 175(1):276-85.
- Zhang XY, Liu XG, Wang W, Wang WC, Gao XM. Anti-T-cell humoral and cellular responses in healthy BALB/c mice following immunization with ovalbumin or ovalbumin-specific T cells. *Immunology*. 2003 Apr;108(4):465-73.

Anexos

“E aí! Pra onde a gente vai agora!”

Autor (quase) desconhecido

Pensador Brasileiro

Anexo I

Termo de consentimento livre esclarecido

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

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

1. NOME DO PACIENTE :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F

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

ENDEREÇO Nº..... APTO:

BAIRRO: CIDADE CEP:.....

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL

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

.....

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

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE: CEP: TELEFONE:

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

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

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

PESQUISADOR: Verônica Coelho (coordenadora e gerente do projeto)

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

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 45907

.....

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO **RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO**

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

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

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos

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

1. justificativa e os objetivos da pesquisa ;

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

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

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

poderemos utilizar um fragmento do material retirado do enxerto para fazer a pesquisa. Mas, a biópsia não será realizada por causa da pesquisa. Caso aceite participar deste estudo, você deverá

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

- Coleta de 20 ml de urina estéril.

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

3. desconfortos e riscos esperados;

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

4. benefícios que poderão ser obtidos;

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

5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Não se aplica.

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

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

2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. O sujeito de pesquisa está livre para retirar o seu consentimento a qualquer momento e desistir de participar desta pesquisa. O fato de não

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

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

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

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

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

1. Coordenação do projeto

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

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, _____ de _____ de 20____.

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador coordenador
(carimbo ou nome Legível)

Anexo II

Aprovação do projeto pelo comitê de
ética.



APROVAÇÃO

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

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

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

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

CAPPesq, 07 de Agosto de 2008


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

COMISSÃO CIENTÍFICA
 RECEBIDO

08 / 08 / 08
Libéria

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

Anexo III

Tabelas com os dados clínicos individuais
dos sujeitos da pesquisa

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

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

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

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

Pacientes	Grupo Clínico	Tempo de Isquemia	Função Retardada do Enxerto	Terapia de Indução	Rejeição Aguda	Rejeição Crônica	Terapia IS Inicial	Terapia IS Atual	Comorbidades	Creatinina Sérica
LTx03	TO	ND	NC	NC	Não	Não	ND	Sem IS desde 2002	Hipertensão arterial; Obesidade	1,15 (04/11/09)
LTx08	TO	16:00	Sim	Basilixmab	Sim	Não	Pred, Tacro, MMF	Sem IS desde 07/2006	HBV e HCV	1,62 (16/04/08)
LTx10	TO	1:00	Não	Não	Não	Não	Cya, Aza, Pred	Sem IS desde 05/2003	Múltiplos abscessos perianal; jan/2004 - Infarto agudo miocárdio com angioplastia; 10/03/08 - Abscesso de mama; 10/08/08 - Infarto agudo miocárdio	0,89
LTx16	TO	NC	Não	Não	Não	Não	Pred, Aza	Sem IS desde 03/2000	HCV	0,74
LTx62	TO	1:00	Não	Não	Não	Não	Cya, Aza, Pred	Sem IS desde 2005	Recidiva de GESF no rim Tx	1,71

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pacientes	Grupo Clínico	Sexo	Idade	Doença de Base	Nº de Gestações	Tempo de Hemodiálise(meses)	Nº de Transfusões	Nº de Transplantes	Tempo de Transplante (anos)	Tipo de Doador	Disparidades HLA
LTx09	EST	M	47	Insuficiência renal sem causa definida	NA	18	ND	1	6	Vivo	3
LTx12	EST	M	55	Nefrosclerose hipertensiva	NA	18	0	1	5	Falecido	6
LTx14	EST	F	45	Nefropatia diabética	2	24	0	1	4	Falecido	3
LTx27	EST	F	47	Glomerulonefrite crônica	ND	60	>5	1	24	Vivo	3
LTx28	EST	M	56	Glomerulonefrite crônica	NA	2	ND	1	36	Falecido	3
LTx30	EST	F	55	InsuficiêNDia renal a esclarecer	3	64	10	1	13	Falecido	5
LTx31	EST	M	56	Insuficiência renal a esclarecer	NA	26	2	1	7	Vivo aparentado	3
LTx33	EST	F	40	Esclerose tuberosa (angiomiolipoma+doença cística adquirida)	1	58	3	1	5	Falecido	5

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

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

Pacientes	Grupo Clínico	Função Retardada do Enxerto	Terapia de Indução	Rejeição Aguda	Rejeição Crônica	Terapia IS Inicial	Terapia IS Atual	(C0) do inibidor de calcineurina	Comorbidades	Creatinina Sérica
LTx09	EST	ND	Basilixmab	Não	Não	Pred, Tacro, MMF	Pred; MMF; Tacro	4,4 ng/ml	Blastocitose	0,89
LTx12	EST	Não	Daclizumab	Não	Não	Pred, Tacro, MPS	Pred; MPS; Tacro	4,3 ng/ml	14/07/06 - Candidíase esofágica ; 04/07/08 - Infecções vias aéreas superior; CMV	1,15
LTx14	EST	Não	Basilixmab	Não	Não	Pred, Tacro, MMF	Pred; MMF; Tacro	4,3 ng/ml	ND	0,88
LTx27	EST	NC	Não	Sim	Não	Pred, Aza	Pred; Aza	NA	ND	0,86
LTx28	EST	NC	Não	Não	Não	Pred, Aza	Pred; Aza	NA	22/02/04 - Celulite	1,23
LTx30	EST	Não	Não	Sim	ND	Cya, Aza, Pred	Pred; Cya	78ng/ml	HBV e HCV pós tx; Uveíte por toxoplasmose	0,79
LTx31	EST	Não	Daclizumab	Sim	Não	Pred, Tacro, MMF	Pred; MPS; Tacro	ND	Candidíase , 30/04/08 - Adenocarcinoma de próstata	1,28
LTx33	EST	Não	Daclizumab	Não	Não	Pred, Tacro, MPS	Pred; MMF; Tacro	6 ng/ml	Não	0,85

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

Anexo IV

Script PERL usado para o processamento
das sequências

SCRIPT PERL USADO PARA O PROCESSAMENTO DAS SEQUENCIAS OBTIDAS A PARTIR DOS FAGOS SELECIONADOS.

Para a obtenção das sequencias peptídicas o DNA dos fagos selecionados foi sequenciado utilizando o primer fornecido pelo kit Ph.D.TM Phage Display Libraries (-96 gIII sequencing primer: 5'-^HOCCC TCA TAG TTA GCG TAA CG -3')

O script então foi utilizado para e traduzir as sequências (complemento reverso) e localiza-las entre os espaçadores, VPFYSHS e GGGSA

Exemplo de sequencia obtida: VPFYSHS(**x₁₂**)GGGSA, onde **x₁₂** representa o peptidio de 12 aminoácidos obtido.

Após a conversão para FASTA o script `traduzKpnEag.pl` foi utilizado em cada arquivo para achar a sequência de interesse, para isso foi utilizado um comando para rodar o mesmo em batelada na pasta contendo os FASTAs:

```
forarq in *.fasta;
do ./traduzKpnEag.pl -n ${arq} -q `echo ${arq} | sed 's/.fasta//'`.qual -p `echo ${arq} | sed 's/.fasta//'`.out -l `echo ${arq} | sed 's/.fasta//'`.list;
done;
```

O código do script segue na página seguinte:

```

1      #!/usr/bin/perl -w
2      # Título: traduzKpnEag.pl
3      # Descrição: Script para tradução de sequencias estre os sítios KpnI (GGTACC) e EagI (CGGCCG).
4      #
5      # Entrada: Fasta (nucleotídeos)
6      # Saída: Fasta (pepetídeos)
7      #
8      #
9      #Autor: Halian Vilela e Paulo Antônio Alvarez
10     #Data:30/07/2010
11
12     use strict;
13     use Getopt::Std;
14
15
16     # Sequencia KpnI => GGTACC
17     # Sequencia EagI => CGGCCG
18
19
20     ##Essa função faz o complemento reverso da sequencia em questão
21     sub compReverso($){
22         my ($seq) = @_ ;
23         my $rev;
24
25         chomp($seq);                #Retira a nova linha (q atrapalha na montagem final)
26         $rev = reverse($seq);        #inverte
27         $rev=~tr/[A,C,T,G]/[T,G,A,C]/; #gera os complementos
28         return $rev;
29     }
30
31     ## Essa função traduz pra proteína a sequencia selecionada
32     sub traduz($$){
33         my ($nome,$seq,$qualRef) = @_ ;
34         my ($i,$codon,$ptn,$mediaQuals,@qual,$quals,$ptnSemEspaco);
35
36     my(%aa)=( 'TCA'=>'S', 'TCC'=>'S', 'TCG'=>'S', 'TCT'=>'S', 'TTC'=>'F', 'TTT'=>'F', 'TTA'=>'L', 'TTG'=>'L', 'TAC'
=>'Y', 'TAT'=>'Y', 'TAA'=>'*', 'TAG'=>'*', 'TGC'=>'C', 'TGT'=>'C', 'TGA'=>'*', 'TGG'=>'W', 'CTA'=>'L', 'CTC'=>'
L', 'CTG'=>'L', 'CTT'=>'L', 'CCA'=>'P', 'CCC'=>'P', 'CCG'=>'P', 'CCT'=>'P', 'CAC'=>'H', 'CAT'=>'H', 'CAA'=>'Q',
' CAG'=>'Q', 'CGA'=>'R', 'CGC'=>'R', 'CGG'=>'R', 'CGT'=>'R', 'ATA'=>'I', 'ATC'=>'I', 'ATT'=>'I', 'ATG'=>'M', 'AC
A'=>'T', 'ACC'=>'T', 'ACG'=>'T', 'ACT'=>'T', 'AAC'=>'N', 'AAT'=>'N', 'AAA'=>'K', 'AAG'=>'K', 'AGC'=>'S', 'AGT'=>'
S', 'AGA'=>'R', 'AGG'=>'R', 'GTA'=>'V', 'GTC'=>'V', 'GTG'=>'V', 'GTT'=>'V', 'GCA'=>'A', 'GCC'=>'A', 'GCG'=>'A'
', 'GCT'=>'A', 'GAC'=>'D', 'GAT'=>'D', 'GAA'=>'E', 'GAG'=>'E', 'GGA'=>'G', 'GGC'=>'G', 'GGG'=>'G', 'GGT'=>'G');
36
37         @qual = @$qualRef;
38         $seq= uc($seq);
39         $quals = "";
40
41         print OUT "Sequencia de interesse:\n$seq \n\n";
42         print OUT "Sequencia de interesse nao-reversa:\n".compReverso($seq)."\n\n";
43
44         for ($i=1;$i < (length $seq) ;$i+=3){
45
46             $codon = substr($seq,$i,3);
47             if ((length($codon) < 3)) { last; }
48             $mediaQuals = ($qual[$i]+$qual[$i+1]+$qual[$i+2])/3; # Qualidade média do codon
49             $mediaQuals = sprintf("%.0f",$mediaQuals);
50             if ($codon=~m/[^atcg]/i){$ptn .=sprintf('%3c',ord('X'));next;}
51             $ptn .=sprintf('%3c',ord($aa{$codon}));
52             $quals.=sprintf('%3d',$mediaQuals);
53         }
54
55         print OUT "$nome" . "$ptn\n$quals\n\n";
56         $ptnSemEspaco=$ptn;
57         $ptnSemEspaco=~s/ //g;
58         print OUT "Sem espacos:\n" . "$ptnSemEspaco\n\n";
59         $ptnSemEspaco=~s/VPFYSHS.(+)GGGSA/VPFYSHS_$1_GGGSA/;
60         print OUT "Separado:\n" . "$ptnSemEspaco\n\n";
61         my $id=substr $nome,1,3;
62         print LIS "$id" . "\t$ptnSemEspaco\n";
63         print OUT
64     "#####\n\n";
64     }

```

```

65
66
67
68
69  ##Essa função processa a sequencia, gerando o complemento reverso procurando as sequencias alvo
e traduzindo-as jogando diretamente no arquivo de saída.
70  sub processa($$){
71      my ($nome,$seq) = @_ ;
72      my $seqDef = ""; #Sequencia entre os sitios de interesse
73      my $posIni = -1;
74      my $posFim = -1;
75      my $kpnI = 'GGTACC';
76      my $eagI = 'CGGCCG';
77      my $qual = "";
78      my (@qualTemp,$i,@qualDef,$valorMinQual,@qualAux);
79
80
81      $seq=compReverso($seq); #Gera todo o complemento reverso da sequencia
82      $posIni = index ($seq,$kpnI);
83      $posFim = index ($seq,$eagI,$posIni);
84
85      # Efetuamos a leitura das qualidades das bases
86      if ($seq ne ""){
87          my($linha,$temp);
88          $qual="";
89          while($linha=){
90              # Verificamos se a sequência é diferente daquela sendo tratada
91              if($linha=~m/^>/){
92                  if($linha ne $nome){
93                      last;
94                  }
95              }
96              else{
97                  $linha=~s/\n$//g;
98                  $qual.= $linha;
99              }
100         }
101     }
102
103
104
105     if(($posIni!=-1) && ($posFim!=-1)){
106         # A sequência de DNA é revertida, logo temos que reverter as qualidades também
107         $qual=~s/\s$//;
108         @qualTemp = split(/\s/, $qual);
109         @qualTemp = reverse(@qualTemp);
110         $seqDef = substr ($seq,$posIni,((length($eagI)+$posFim)-$posIni));
111         # Obtemos as qualidades da sequência de interesse
112         for($i=$posIni;$i<$posIni+((length($eagI)+$posFim)-$posIni);$i++){
113             $qualDef[$i-$posIni] = $qualTemp[$i];
114         }
115         $seqDef = traduz($nome,$seqDef,\@qualDef);
116     }
117 }
118}
119
120
121
122my %hash = ();
123getopts(":n:p:q:l:",\%hash);
124
125open(IN,"<$hash{n}") or die "Erro ao abrir o arquivo $hash{n}:\n!\n "; #Entrada - Nucleotídeos
126
127open(QUAL,"<$hash{q}") or die "Erro ao abrir o arquivo $hash{q}:\n!\n "; #Entrada - Qualidades
128
129open(OUT, ">$hash{p}") or die "Erro ao abrir o arquivo $hash{p}:\n!\n "; #Saída - Proteínas
130
131open(LIS, ">$hash{l}") or die "Erro ao abrir o arquivo $hash{l}:\n!\n "; #Lista Simplificada - ID
+ Seq. Separada
132
133my($data,$nome,$seq);
134

```

```
135$nome="";
136$seq="";
137
138while($data=) { #pega cada linha
139
140     if ($data=~m/^>/) { # se a linha for um início de fasta
141         processa($nome,$seq);
142         $nome=$data;
143         $seq="";
144     }
145
146     else{
147         chomp($data);
148         $seq.=$data;
149     }
150}
151
152processa($nome,$seq);
153
154 close (IN);
155 close (OUT);
156 close (LIS);
157
158print "Script executado com sucesso!!! \n\n";
```

Anexo V

Artigo Científico

Random peptide microarray probing reveals IgM antibody signatures in blood of renal transplant recipients¹

Rafael T. Burtet^{2†}, Victor Greiff^{2*}, Nicole Wittenbrink^{2*}, Juliane Lück^{*}, Hernandez Moura Silva^{δφλ}, Verônica Coelho^{δφ}, Jorge Kalil^{δφ}, Marcelo M. Brigido^{†φ}, Andréa Q. Maranhão^{†φ}, Michal Or-Guil^{3*}

^{*}Systems Immunology Lab, Department of Biology, Humboldt University Berlin and Research Center ImmunoSciences, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Germany

[†]Laboratory of Molecular Immunology, Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil

^δLaboratory of Immunology, Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

^φInstitute for Investigation in Immunology, iii - INCT (National Institute of Science and Technology), Brazil.

^λ Present affiliation: Molecular Pathogenesis Program, Kimmel Center for Biology and Medicine at the Skirball Institute, New York University School of Medicine, New York, NY 10016, USA

Keywords: operational tolerance, renal transplantation, random peptide array, antibody binding profile, machine learning

Abstract

Organ transplantation is a widely used therapy, but allograft rejection is still a limiting factor for this type of intervention. However, a rare group of transplanted individuals spontaneously develops a state of operational tolerance (OT), characterized by a stable graft function without use of immunosuppressors. This tolerogenic state may be associated with specific humoral determinants, where the reactivity allows us to "see" the antigens world, and the set of responsive antigens could be used as a "sorter" to the immune status. We aim to evaluate whether the OT state involves differential antibody repertoire reactivity in relation to other clinical status. For this purpose we used a random peptide array microchip to search for antibody repertoires among the clinical study groups. Each microarray was split into three subarrays displaying the same library of 1,000 random peptides (942 15-mers). Median spot signal intensity (SI) were read into R using the function readData and the mean SI across subarrays (n=3) was calculated for each peptide (n=942). Supervised data classification, was carried out using an R implementation of the Potential Support Vector Machine (P-SVM) algorithm. Comparison of sorted group mean peptide SI revealed that OT samples SI tend to be higher than those in CR but lower than those in HE samples; OT and ST samples do not separate. The variance of peptide SI is tendentially lower for study groups under immunosuppression (ST and CR). The estimated average variance within the ST and CR groups is about three times lower compared to OT or HE. Principal Component Analysis (PCA) indicates reduced biological variability within study groups under immunosuppression. Although the first two principal components were found to explain 77.2% of the data set's variance, PCA failed to separate individual study groups. However, samples from subjects under immunosuppression (ST, CR) form a very tight cluster while OT and HE samples are widespread in the biplot. This is in line with the reduced peptide SI variance observed for CR and ST. In leave-one-out cross-validation, the classifier discriminated three pairs of study groups (OT vs. CR, ST+CR vs. HE+OT, CR vs. HE) with a balanced accuracy (BACC) of more or equal to 66.0% . The P-SVM algorithm extracted 16 unique features for the subproblem OT vs. CR (BACC=73.8), that is, selective peptides that occurred in each fold.

Introduction

The immunobiology of allograft transplantation involves the initial inflammation triggered by surgical injury, activation of the innate immune response, alloantigen recognition and activation of alloantigen-specific lymphocytes, mostly in peripheral lymphoid organs, and immune cell migration to the graft which will cause rejection, if no immunosuppression is provided [1]. Rejection leads to functional and structural deterioration of the graft and, in renal transplantation, it is usually classified as either antibody or T-cell mediated rejection (acute or chronic) [1]. Though current immunosuppression (IS) therapy regimens are capable of restraining the inflammatory immune response to the graft, rejection persists as an important problem, limiting allograft survival in the long run. In fact, kidney graft loss due to chronic rejection in individuals under conventional immunosuppression remains a critical issue following renal transplantation (Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med.* 2002;346:580–90. 3.) and antibody mediated rejection reemerges as a challenging clinical problem. In addition, life-long immunosuppressive medication impacts on morbidity and life quality; increasing the susceptibility to infections, malignancies as well as cardio- and nephrotoxicity [2-6].

In this scenario, a most desirable post-transplantation treatment would be to stimulate endogenous immunoregulatory mechanisms to control intragraft inflammation, minimizing the need for immunosuppressors, and eventually achieving transplantation tolerance. Although transplantation tolerance has been successfully induced in various animal models [7-10], the translation into the clinical context remains a great challenge. Nevertheless, the clinics hold a unique opportunity to study transplantation tolerance: a rare group of individuals who are able of efficiently controlling allograft inflammation after immunosuppression withdrawal, achieving a state called operational tolerance (OT). Several research groups worldwide have been investing on understanding the immunoregulatory pathways activated in OT individuals, as a promising new strategy to understanding allograft tolerance in human transplantation [11-14]. [15, 16].

Recent studies on OT kidney transplant recipients have revealed a peripheral blood B cell signature, of B cell transcripts being enriched compared to immunosuppressed transplant recipients [17-19]. Nevertheless, the functional significance of this putative OT B cell signature awaits elucidation. Still regarding the B cell compartment, our group has recently reported the capacity of OT subjects to keep normal numbers of regulatory B cells (Bregs), while chronic rejection recipients displayed significantly lower numbers [16], suggesting that Breg maintenance may be involved in graft survival and operational tolerance.

Despite the potential importance of cellular B cells activity in renal OT, little is known about the role of B cell different products in this context. Indeed, alloantibodies have been considered the major B cell effector molecules in transplantation. As a matter of fact, alloantibodies have long been reported to mediate acute and chronic rejection, and more recently autoantibodies, including tissue specific autoantibodies, have also been implicated in allograft rejection. Beyond transplantation, it appears that the profile of circulating antibodies offers a snapshot of one of the 's immune system's perception of the antigenic universe (both foreign and self) at any one time, but also reflecting an individual's immunologic state of health or disease [20, 21]. Accordingly, blood serum/plasma antibody profiling has been shown to provide a diagnostic tool, which has been previously applied for the classification of various pathological conditions such as Alzheimer's disease [22], diabetes [23], as well as influenza [24] and nematode infections [25]. It is still unknown however, whether such a global antibody profiling can provide more than a diagnostic tool, also reflect the individual's immunologic activity - historical and ongoing.

In this study, we used blood plasma antibody profiling on high-density random peptide microarrays to determine whether the state of tolerance, in human renal transplantation, displays an antibody signatures, in comparison to the clinical outcomes, including individuals under long-term immunosuppressive treatment showing either stable graft function (ST) or chronic rejection (CR), operational tolerant recipients (OT) and nontransplanted healthy volunteers (HE). We found that neither long-term immunosuppressive medication nor operational tolerance affect overall blood plasma IgM or IgG levels. However, our results indicate that the biological variability among IgM binding profiles of immunosuppressed recipients is restricted. Notably, supervised classification of IgM binding profiles identified small feature sets (≤ 20 peptides) that discriminate CR from OT and HE samples, respectively.

Materials and Methods

Study design

Study subjects

Plasma samples from 21 adult kidney transplant recipients and 9 healthy volunteers were used in this study. Study subjects were recruited at the Transplantation Unit of the Hospital of Clinics (São Paulo), University of de São Paulo, and the Nephrology Unit of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul and were all part of the Brazilian Multicenter Study on Operational Tolerance coordinated by the Heart Institute, School of Medicine, University of São Paulo. Informed consent was obtained from all participants and the study was approved by the ethics committee of both institutions (CAPESQ/Comissão de Ética para Projetos de Pesquisa – 0476/08).

Both male and female kidney graft recipients were from 28 to 64 years old. Study subjects' demographic and clinical features are summarized in Table 1. Participants were enrolled in four study groups: OT (n=5), defined as individuals with stable renal graft function for at least one year after immunosuppression withdrawal (mean serum creatinine level: 1.2 mg/dL; ST (n=8), individuals with stable renal function (mean serum creatinine level: 1.1 mg/dL) under conventional immunosuppressive regimens (azathioprine or mycophenolatemofetil/sodium and/or steroids and/or calcineurin

inhibitor); CR (n=8), individuals under conventional immunosuppressive regimens showing cellular-mediated chronic rejection and progressive renal failure (mean serum creatinine level: 1.7 mg/dL); and HE (n=9) nontransplanted healthy kidney-donor individuals with no history of renal disease. Renal function was rated by the estimated glomerular filtration rate (eGFR) according to Cockcroft-Gaul formula[26]. Stable renal function was defined by an eGFR \geq 40 mL/min and less than 10% variation in serum creatinine levels over a period of six months. Chronic rejection was confirmed by histologic scoring of biopsies according to Banff classification [1, 27]. Blood samples were collected in heparinized vacutainers. Blood plasma was separated from whole blood by Ficoll-Hypaque density-gradient centrifugation (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). After the centrifugation the gradient upper phase containing the plasma diluted 1:2 in a 0.9% saline solution of sodium chloride was collected and stored at -80°C.

Enzyme-linked immunosorbence assay (ELISA)

Plasma IgM and IgG levels were measured using human IgM or human IgG ELISA quantitation sets (BethylLabs, Montgomery, TX) according to the manufacturer's instructions. Briefly, Corning 96-well EIA plates (Sigma, Munich, Germany) were coated with 10 μ g/ml goat anti-human IgM or goat anti-human IgG-Fc and blocked in Tris-buffered saline (TBS) with 1% BSA. Prediluted standard, control and plasma samples were incubated at 4°C overnight. Bound plasma antibodies were detected after extensive washing, using 10 μ g/ml horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-human IgM or IgG-Fc. Assays were developed with TMB substrate and read on a TecanInfinite 200 Pro Microplate Reader at 450 nm. Standard curves were established from human reference serum. All samples were measured in duplicate and assays included a control human serum pool (Lonza, Verviers, Belgium). The R² of 4-parameter standard curve fits was equal to or greater than 0.996 and the mean blank ODs was less than 0.15 for all EIA plates. Where the percent coefficient of variation of duplicate measurements exceeded 10, the sample was re-assayed.

BCA total protein assay

Total plasma protein was determined by Pierce's BCA protein assay (Fisher Scientific, Schwerte, Germany) according to the manufacturer's instructions and using bovine serum albumin (BSA) as a standard. Prediluted standard, control and plasma samples were mixed with the BCA working solution in Corning 96-well EIA plates in a ratio of 1:8 and then incubated at 37°C for 30 minutes. After cooling, the absorbance was measured at 560 nm on a Tecan Infinite 200 Pro Microplate Reader. All samples were measured in duplicate.

Peptide microarray probing

Peptide-microarrays were purchased from Pepscan Presto (RC Lelystad, The Netherlands). Each microarray was split into three subarrays displaying the same library of 1,000 peptides (942 random sequence 15-mers, 16x YGGFL, 2x RRPYIL, 2x RPPGFSAFK and 4x RPPGFSPFR). Random peptides were of uniform amino acid distribution, except for cysteine, which was excluded. All peptide array incubations were automatically performed with a TTEcan Hybridization Station (4800HS Pro, Tecan, Salzburg, Austria). Briefly, slides were blocked in and PBS with 1% (w/v) BSA (PBA) for 30 minutes and washed in PBS containing 0.05% Tween-20 (T-PBS) prior to sample injection. Sample incubations were then performed for 2 hours with a total assay volume of 180 μ l of a 1:20 dilution in PBA. Slides were washed in T-PBS and bound plasma antibodies were detected by injection of 180 μ l Alexa647-labeled anti-human IgM (20 μ g/ml; Invitrogen, Darmstadt, Germany). Following incubation for one hour, slides were consecutively washed in T-PBS (3x), saline-sodium citrate (SSC) buffer (2x) and distilled water (1x). Finally, slides were dried by centrifugation at 1500 rpm for two minutes. All incubations and wash steps were carried out at 30°C. Sample incubations included one blank incubation with incubation buffer and five repeat incubations of the healthy volunteer sample Ltx36 to control the influence of the human IgM detection antibody and the technological variability of the assay, respectively.

Data acquisition and processing

Microarrays were scanned using a GenePix 4200AL microarray scanner (Molecular Devices GmbH, Ismaning, Germany) at an excitation wavelength of 635 nm. The GenePix Pro 6.0 software was used for automated generation of image files at a resolution of 10 μ m and image analysis. Briefly, following semi-automated spot finding and grid positioning, the signal intensity (SI) of each spot was quantified by taking the median intensity of all pixels in the circular regions around its center.

Data analysis and statistics

Median spot SIs were read into R [28] using the function *readData* and the mean SI across subarrays (n=3) was calculated for each peptide (n=942); no data normalization was applied. Quantitative data were tested for normality using the D'Agostino-Pearson omnibus test for normality. Association between variables in the data sets was assessed by Pearson's correlation (r) and linear regression statistics or Spearman's rank correlation (ρ). Significant differences among study groups were determined by Kruskal-Wallis test ANOVA with Dunn's post-test or Mann-Whitney U test. Significance levels were set at $P \leq 0.05^*$, $P \leq 0.01^{**}$, $P \leq 0.001^{***}$ and $P \leq 0.0001^{****}$. Unsupervised principal component analysis (PCA) was done in the statistics environment R using the *pca Methods* package [28].

Supervised classification

Supervised data classification, was carried out using an R implementation of the Potential Support Vector Machine (P-SVM) algorithm [29]. Briefly, sensitivity and specificity were estimated by leave-one-out cross-validation and classification performance was rated by balanced accuracy measure: $BACC = \frac{1}{2(sensitivity + specificity)}$. Feature and hyperparameter selection were performed in an inner cross-validation loop, independent of the test sample of the outer cross-validation loop. The inner loop was used to identify the optimal combination of the cost parameter C and the regularization parameter ϵ for a given classification task. While C was varied from one to 17 in five equally spaced steps, ϵ was chosen as 2^i with $i = -3, -2, \dots, 3, 4$. Parameter combinations for which more than three models exceeded the upper limit of ten features were rejected. The total of all features selected in each leave-one-out cross-validation fold is taken as the selected feature set for the classification problem. The statistical significance of supervised classification was assessed by sample label-permutation testing. Cross-validation was run on 1,000 independent random shuffles of the group identity label vector with the parameters set as $C=x$, $\epsilon=y$. The proportion of outcomes where the BACC equals or betters the BACC of unshuffled data gives an unbiased estimate of the true p-value. That is, the p-value reflects the probability to achieve a given BACC by chance (under the null hypothesis that labels and input data are independent).

Results

Blood plasma IgM and IgG levels are preserved among study groups

To assess differences in blood plasma protein composition between study groups, we performed isotype-specific IgM and IgG ELISA and measured total BCA protein. Mann-Whitney U tests revealed no significant differences among groups with respect to mean IgM (0.5-0.7 mg/mL), mean IgG (5.8-7.8 mg/mL) or mean total protein (39.3-43.4 mg/mL) ($p > 0.05$) (Fig. 1A-C). Intragroup variation was comparable for all three analyses (20-50 percent coefficient of variation, CV) with the exception of the IgM levels in the group of stable transplant subjects (ST) (93% CV). The latter is explained by the presence of one blood plasma sample showing a fourfold higher IgM titer (subject Ltx28). However, since IgG and total protein levels of the same sample were normal, this subject was not classified as an outlier. The inclusion of this subject result did not affect any of the conclusions presented in this paper. There was a good correlation of plasma IgM and IgG levels across plasma samples (Pearson $r=0.663$; $p < 0.001$) (Supplemental Fig. 1C). Likewise, total plasma protein showed a high degree of correlation with IgG ($r > 0.702$; $p < 0.001$) (Supplemental Fig. 1B) but not IgM ($r=0.145$; $p > 0.05$) (Supplemental Fig. 1A).

The repertoire of IgM antibodies present similar peptide binding capacity among study groups

To investigate differences among study groups in binding capacity of plasma IgM antibodies to peptides, plasma samples (n=30) were incubated on microarrays containing a library of 942 random peptides. As an internal control for the assay, five additional microarrays were incubated with the same healthy (HE) volunteer sample (subject Ltx36; repeats n=4) or with buffer alone (n=1, blank). IgM signal intensity (SI) profiles were obtained after secondary detection with a fluorescence-labeled anti-human IgM antibody. The distribution of signal intensities across 942 random peptides was of similar shape for all samples, most likely following a log-normal distribution (Fig. 2A). However, SI distributions differed by location (mean, μ) and scale (SD, σ). Blank SIs were significantly lower (Fig. 2B) and did not correlate with plasma sample SIs (Spearman $\rho_{\text{mean}}=0.471$; $p < 0.0001$), indicating that sample SI profiles are not biased by the applied IgM detection antibody. The technological variability of the microarray probing assay was found to be low, as Spearman correlation between Ltx36 repeats was strong and significant ($\rho_{\text{mean}}=0.900$; $p < 0.0001$). Correlation of SI profiles within study groups was lower ($\rho_{\text{mean}}=0.755$ to 0.780 ; $p < 0.0001$ for all groups) and the standard deviation of mean peptide SIs was higher for study groups compared with the Ltx36 repeat group (Fig. 2C). Thus, the biological variability of blood plasma samples

exceeded the technological variability of the assay. A heatmap of all individual inter-array Spearman ρ correlation coefficients is shown in Supplemental Fig. 5.

When plotted as cumulative frequency curves, the SI distributions of the individual blood plasma samples from the four study groups overlapped (Fig. 2B). A Kruskal-Wallis test identified significant differences among all samples ($p < 0.0001$); however, the post hoc test revealed that both intra-group and inter-group variations contributed to the significance. Comparison of sorted group mean peptide SIs revealed that SIs in CR samples tended to be lower than those in OT and HE samples; CR and ST samples do not separate (Supplemental Figure 2).

Finally, pairwise Mann-Whitney U tests showed no significant differences in mean sample SI values among groups ($p > 0.05$), except for healthy volunteers (HE) and individuals in chronic rejection (CR) ($p = 0.021$) (Fig. 2D). Taken together, study groups do not separate solely on the basis of mean SI values; albeit there is a tendency in the data for CR samples to yield lower SIs than OT and HE samples (Fig. 2B, D and Supplemental Figure 2). Importantly, OT samples are indistinguishable from HE samples by mean SI only.

Mean IgM signal intensity correlates with IgM titer

To evaluate the influence of blood plasma protein composition on IgM SI profiles, we ran Pearson correlation analyses between IgM, IgG or total protein levels and mean sample SIs. While good correlation was observed for the IgM concentration of a sample and its mean SI ($r = 0.800$; $p < 0.001$) (Fig. 3A), no significant relationship was observed for IgG/mean SI or total protein/mean SI (Supplemental Fig. 3). Interestingly, the correlation between IgM titer and mean sample SI was strongest when subject groups received immunosuppressive treatment (ST+CR, $r = 0.970$; $p < 0.001$) (Fig. 3A).

PCA indicates reduced biological variability within study groups under immunosuppression

In the present study, 30 blood plasma samples were each probed on 942 random peptides. Thus, the complete data set can be considered as a set of 30 points in a 942-dimensional space. To explore whether the four study groups cluster in this high-dimensional room, we performed principal component analysis (PCA). Although the first two principal components were found to explain 77.2% of the data set's variance, individual study groups did not differentiate (Fig. 4A). However, samples from subjects under immunosuppression (ST, CR) form a very tight cluster while OT and HE samples are widespread in the PCA biplot. In line with this, the total variance of ST and CR samples (158.2×10^6 or 82.2×10^6 if Ltx28 is excluded) turned out to be reduced compared to HE and OT samples (190.0×10^6).

Supervised classification of IgM signal intensity profiles

In order to investigate whether operational tolerance and different clinical outcomes presented a differential profile of the biological variability in blood plasma IgM binding profiles we employed a P-SVM classifier with feature selection to the SI data set. In leave-one-out cross-validation, the classifier discriminated three pairs of study groups (OT vs. CR, CR vs. HE, ST+CR vs. HE+OT) with a balanced accuracy (BACC) of more or equal to 66.0% (Table 2). In all three cases, classification was found to be statistically significant ($p < 0.05$) when p-values were estimated in a label-shuffling test (Table 2). For OT vs. CR (BACC=73.8) and CR vs. HE (BACC=66.0), the algorithm selected 16 and 22 features, respectively (Supplemental Table 1). The amino acid compositions of these small feature sets and the overall random peptide library are fairly equivalent (Supplemental Figure 4) and amino acid sequence comparison against the human proteome (RefSeq protein database) using BLAST found no significant homologies to any known proteins. Importantly, PCAs run on the 16 and 22 features conclusively separated OT from CR (Fig. 4B) and HE from CR samples (Fig. 4C). In line with the PCA run on the whole peptide library (Fig. 4A), the total variances of samples from individuals in chronic rejection under immunosuppressive treatment (17.3×10^6 and 39.3×10^6) were found to be markedly reduced compared to non-immunosuppressed OT transplant recipients (158.2×10^6) and healthy controls (119.9×10^6).

Discussion

Despite the limited numbers of kidney transplant individuals in operational tolerance worldwide [30], they provide a unique opportunity to study the immunoregulatory networks of human transplantation tolerance, development and maintenance. While early research on OT primarily focused on the role of (regulatory) T cells, recent studies revealed a strong B cell-centric signature of operational tolerance in human renal transplantation [16-18]. However, functional implications of these findings await elucidation. Data from our multicenter study have shown that both operational

tolerance and chronic rejection display differential profile regarding the numbers of Bregs and to the CDR3 B cell receptor repertoire [16].

To further investigate the B cell compartment in operational tolerance, we performed immunoglobulin quantification by ELISA and a high-throughput plasma profiling by random peptide microarray probing. We found that blood plasma samples from transplanted kidney recipients in chronic rejection carry an IgM signature that distinguishes them from operational tolerant subjects and healthy kidney donors. While plasma IgM levels were maintained during chronic rejection, the antibody binding profile against a panel of 942 random peptides showed significant changes relative to OT and HE profiles (Table 2). This finding supports a contribution of B cells, in particular plasma cells, to chronic renal allograft rejection as recently claimed by DiLillo *et al.* [31] who reported prevention of rejection after anti-CD19 mediated depletion of mature B cells and plasma cells in a mouse kidney transplantation model; anti-CD20 depletion of B cells (but not plasma cells) had no such an effect. Importantly, while plasma cells (or their antibodies) are likely to contribute to chronic rejection in renal transplantation, B cells/plasma cells were shown to suppress or not affect rejection in mouse models of skin allograft rejection and acute cardiac allograft rejection [31].

Most standard immunosuppressive drugs for the prevention of graft rejection are not B cell specific and do not specifically target the humoral immune system (REF). Nevertheless, several studies indicate that they have effects on humoral immunity, specially mofetil. The calcineurin inhibitor cyclosporin was shown to suppress the emergence of protective antibodies after influenza vaccination post-transplantation [32]. In addition, *in vitro* culture experiments attest to dose-dependent inhibition of immunoglobulin production by cyclosporin, mycophenolatemofetil and rapamycin [33]. In spite of the fact that the kidney graft recipients in this study received long-term administration of at least one or a combination of these drugs, we found several parameters of *in vivo* ongoing B cell activation. Blood plasma IgM and IgG levels as well as IgM to IgG ratios were conserved among study groups and, more importantly, were retained during long-term immunosuppressive treatment (Fig. 1). Interestingly, we found no effect in purely quantitative terms, the IgM peptide binding profiles suggest that immunosuppression skews the qualitative antibody composition of blood plasma in that profiles of individuals under treatment appear to display lower diversity. The observed tight cluster formation of ST and CR samples in PCA biplots (Fig. 4) suggests that immunosuppression causes a loss in variability of the IgM binding profiles. Recent research by Mumtaz *et al.* [34] in the NZB/W murine model of systemic lupus erythematosus (SLE) provides a clue as to the why of this finding. Their detailed study indicates that the differential plasma cell susceptibility to immunosuppressive drugs (dexamethasone and/or cyclophosphamide) differs by location: while bone marrow plasma cells turned out to be refractory, treatment depleted plasmablasts/short-lived plasma cells in the spleen. Thus, immunosuppression can affect the generation of antibody-secreting cells (ASC) in response to acute immune challenges. Loss of any “acute” antibodies from the blood plasma antibody pool as a consequence of immunosuppression would result in reduced biological variability: with the absence of dominating “acute” antibodies, the antibody binding profiles of individuals tend to match, as previously demonstrated by Greiff *et al.* [35]. Interestingly, Mumtaz *et al.* also report high survival rates (~50%) among plasma cells in the inflamed kidneys of NZB/W mice [34], suggesting that the kidney provides a protective environment. Such protection could be achieved by inflammatory pro-survival signals; but, as discussed in the original publication, might also be based on restricted access of immunosuppressive drugs to kidney plasma cells. The latter, if true, would explain why plasma cells promote chronic renal rejection in mice while having no effect in other murine transplantation models [31].

Although operational tolerance to renal allografts in humans relates to a strong B cell signature [16-18], we were unable to identify a distinguished blood plasma antibody signature. In fact, OT samples closely resembled HE samples in all recorded blood plasma antibody parameters such as titers, mean IgM signal intensities and biological variability of IgM binding profiles, suggesting that operational tolerance involves a health signature regarding the pool of circulating antibodies. This is in line with very low infection prevalence in OT subjects [36] and supports the view of Silva *et al.* who conclude that preservation of the B cell compartment favors operational tolerance[16].

Conclusions:

In conclusion, the findings presented herein revealed that neither long-term immunosuppressive medication nor operational tolerance affect overall blood plasma IgM or IgG levels. Nevertheless, our data shows that the biological variability among IgM binding profiles of immunosuppressed recipients is restricted. Specially, supervised classification of IgM binding profiles identified small feature sets (≤ 20 peptides) that discriminate CR from OT and HE samples, respectively. Despite the possibility of finding a signature of B cells in renal allografts in tolerant individuals operating [1-3],

our findings can not identify the signature on these related subjects (OT), however, the analysis of the individuals with chronic rejection could indicate a possible differential group of peptides when compared with the OT subjects and healthy ones (HE). Actually, both group of samples operational tolerance and healthy closely resemble in all recorded blood plasma antibody parameters such as titers, mean IgM signal intensities and biological variability of IgM binding profiles, indicating that the clinical pictures operational tolerance and healthy involves a signature regarding the pool of circulating antibodies. This may be related with very low infection rates in OT patients [11] and supports the idea that the preservation of the B cell compartment favors operational tolerance [Silva].

Acknowledgements

The authors are indebted to the Brazilian Multicenter Study on Operational Tolerance. We also thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; iii/INCT, 573879-2008-7) for financial support.

Disclosures

The authors have no conflicting financial interests.

References

- Solez, K., R. B. Colvin, L. C. Racusen, B. Sis, P. F. Halloran, P. E. Birk, P. M. Campbell, M. Cascalho, A. B. Collins, A. J. Demetris, C. B. Drachenberg, I. W. Gibson, P. C. Grimm, M. Haas, E. Lerut, H. Liapis, R. B. Mannon, P. B. Marcus, M. Mengel, M. J. Mihatsch, B. J. Nankivell, V. Nickleleit, J. C. Papadimitriou, J. L. Platt, P. Randhawa, I. Roberts, L. Salinas-Madriga, D. R. Salomon, D. Seron, M. Sheaff, and J. J. Weening. 2007. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 7:518-526.
- Dantal, J., M. Hourmant, D. Cantarovich, M. Giral, G. Blanco, B. Dreno, and J. P. Souillou. 1998. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet* 351:623-628.
- Fishman, J. A., and N. C. Issa. 2010. Infection in organ transplantation: risk factors and evolving patterns of infection. *Infect Dis Clin North Am* 24:273-283.
- Hojo, M., T. Morimoto, M. Maluccio, T. Asano, K. Morimoto, M. Lagman, T. Shimbo, and M. Suthanthiran. 1999. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 397:530-534.
- Nankivell, B. J., R. J. Borrows, C. L. Fung, P. J. O'Connell, J. R. Chapman, and R. D. Allen. 2004. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation* 78:557-565.
- Roberts, C. A., D. L. Stern, and S. J. Radio. 2002. Asymmetric cardiac hypertrophy at autopsy in patients who received FK506 (tacrolimus) or cyclosporine A after liver transplant. *Transplantation* 74:817-821.
- Fuchimoto, Y., C. A. Huang, K. Yamada, A. Shimizu, H. Kitamura, R. B. Colvin, V. Ferrara, M. C. Murphy, M. Sykes, M. White-Scharf, D. M. Neville, Jr., and D. H. Sachs. 2000. Mixed chimerism and tolerance without whole body irradiation in a large animal model. *J Clin Invest* 105:1779-1789.
- Golshayan, D., and M. Pascual. 2008. Tolerance-inducing immunosuppressive strategies in clinical transplantation: an overview. *Drugs* 68:2113-2130.
- Kawai, T., H. Sogawa, S. Boskovic, G. Abrahamian, R. N. Smith, S. L. Wee, D. Andrews, O. Nadazdin, I. Koyama, M. Sykes, H. J. Winn, R. B. Colvin, D. H. Sachs, and A. B. Cosimi. 2004. CD154 blockade for induction of mixed chimerism and prolonged renal allograft survival in nonhuman primates. *Am J Transplant* 4:1391-1398.
- Wekerle, T., J. Kurtz, H. Ito, J. V. Ronquillo, V. Dong, G. Zhao, J. Shaffer, M. H. Sayegh, and M. Sykes. 2000. Allogeneic bone marrow transplantation with co-stimulatory blockade induces macrochimerism and tolerance without cytoreductive host treatment. *Nat Med* 6:464-469.
- Ashton-Chess, J., S. Brouard, and J. P. Souillou. 2006. Is clinical tolerance realistic in the next decade? *Transpl Int* 19:539-548.
- Ashton-Chess, J., M. Giral, S. Brouard, and J. P. Souillou. 2007. Spontaneous operational tolerance after immunosuppressive drug withdrawal in clinical renal allotransplantation. *Transplantation* 84:1215-1219.
- Orlando, G., P. Hematti, R. J. Stratta, G. W. Burke, 3rd, P. Di Cocco, F. Pisani, S. Soker, and K. Wood. 2011. Clinical operational tolerance after renal transplantation: current status and future challenges. *Ann Surg* 252:915-928.
- Roussey-Kesler, G., M. Giral, A. Moreau, J. F. Subra, C. Legendre, C. Noel, E. Pillebout, S. Brouard, and J. P. Souillou. 2006. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant* 6:736-746.
- Brouard, S., E. Mansfield, C. Braud, L. Li, M. Giral, S. C. Hsieh, D. Baeten, M. Zhang, J. Ashton-Chess, C. Braudeau, F. Hsieh, A. Dupont, A. Pallier, A. Moreau, S. Louis, C. Ruiz, O. Salvatierra, J. P. Souillou, and M. Sarwal. 2007. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15448-15453.
- Silva, H. M., M. C. Takenaka, P. M. Moraes-Vieira, S. M. Monteiro, M. O. Hernandez, W. Chaara, A. Six, F. Agena, P. Sesterheim, F. M. Barbe-Tuana, D. Saitovitch, F. Lemos, J. Kalil, and V. Coelho. 2012. Preserving the B cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation. *Mol Med* 18:733-743.
- Chong, A. S., and R. Sciammas. 2011. Matchmaking the B-cell signature of tolerance to regulatory B cells. *Am J Transplant* 11:2555-2560.
- Newell, K. A., A. Asare, A. D. Kirk, T. D. Gislis, K. Bourcier, M. Suthanthiran, W. J. Burlingham, W. H. Marks, I. Sanz, R. I. Lechler, M. P. Hernandez-Fuentes, L. A. Turka, and V. L. Seyfert-Margolis. 2010. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 120:1836-1847.
- Sagoo, P., E. Perucha, B. Sawitzki, S. Tomiuk, D. A. Stephens, P. Miqueu, S. Chapman, L. Craciun, R. Sergeant, S. Brouard, F. Rovis, E. Jimenez, A. Ballou, M. Giral, I. Rebollo-Mesa, A. Le Moine, C. Braudeau, R. Hilton, B. Gerstmayr, K. Bourcier, A. Sharif, M. Krajewska, G. M. Lord, I. Roberts, M. Goldman, K. J. Wood, K. Newell, V. Seyfert-Margolis, A. N. Warrens, U. Janssen, H. D. Volk, J. P. Souillou, M. P. Hernandez-Fuentes, and R. I. Lechler. 2010. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 120:1848-1861.
- Nobrega, A., A. Grandien, M. Haury, L. Hecker, E. Malanchere, and A. Coutinho. 1998. Functional diversity and clonal frequencies of reactivity in the available antibody repertoire. *Eur J Immunol* 28:1204-1215.
- Quintana, F. J., Y. Merbl, E. Sahar, E. Domany, and I. R. Cohen. 2006. Antigen-chip technology for accessing global information about the state of the body. *Lupus* 15:428-430.
- Reddy, M. M., R. Wilson, J. Wilson, S. Connell, A. Gocke, L. Hynan, D. German, and T. Kodadek. 2010. Identification of candidate IgG biomarkers for Alzheimer's disease via combinatorial library screening. *Cell* 144:132-142.
- Quintana, F. J., P. H. Hagedorn, G. Elizur, Y. Merbl, E. Domany, and I. R. Cohen. 2004. Functional immunomics: microarray analysis of IgG autoantibody repertoires predicts the future response of mice to induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2:14615-14621.

24. Legutki, J. B., D. M. Magee, P. Stafford, and S. A. Johnston. 2010. A general method for characterization of humoral immunity induced by a vaccine or infection. *Vaccine* 28:4529-4537.
25. Bongartz, J., N. Bruni, and M. Or-Guil. 2009. Epitope mapping using randomly generated peptide libraries. *Methods Mol Biol* 524:237-246.
26. Cockcroft, D. W., and M. H. Gault. 1973. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16:31-41.
27. Solez, K., R. A. Axelsen, H. Benediktsson, J. F. Burdick, A. H. Cohen, R. B. Colvin, B. P. Croker, D. Droz, M. S. Dunnill, P. F. Halloran, and e cols. 1993. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 44:411-422.
28. R-Development-Core-Team. 2011. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org>.
29. Hochreiter, S., and K. Obermayer. 2006. Support vector machines for dyadic data. *Neural Comput* 18:1472-1510.
30. Kirk, A. D., N. A. Turgeon, and N. N. Iwakoshi. 2010. B cells and transplantation tolerance. *Nat Rev Nephrol* 6:584-593.
31. DiLillo, D. J., R. Griffiths, S. V. Seshan, C. M. Magro, P. Ruiz, T. M. Coffman, and T. F. Tedder. 2011. B lymphocytes differentially influence acute and chronic allograft rejection in mice. *J Immunol* 186:2643-2654.
32. Versluis, D. J., W. E. Beyer, N. Masurel, G. J. Wenting, and W. Weimar. 1986. Impairment of the immune response to influenza vaccination in renal transplant recipients by cyclosporine, but not azathioprine. *Transplantation* 42:376-379.
33. Heidt, S., D. L. Roelen, C. Eijnsink, C. van Kooten, F. H. Claas, and A. Mulder. 2008. Effects of immunosuppressive drugs on purified human B cells: evidence supporting the use of MMF and rapamycin. *Transplantation* 86:1292-1300.
34. Mumtaz, I. M., B. F. Hoyer, D. Panne, K. Moser, O. Winter, Q. Y. Cheng, T. Yoshida, G. R. Burmester, A. Radbruch, R. A. Manz, and F. Hiepe. 2012. Bone marrow of NZB/W mice is the major site for plasma cells resistant to dexamethasone and cyclophosphamide: Implications for the treatment of autoimmunity. *J Autoimmun.*
35. Greiff, V., H. Redestig, J. Luck, N. Bruni, A. Valai, S. Hartmann, S. Rausch, J. Schuchhardt, and M. Or-Guil. 2012. A minimal model of peptide binding predicts ensemble properties of serum antibodies. *BMC Genomics* 13:79.
36. Brouard, S., A. Dupont, M. Giral, S. Louis, D. Lair, C. Braudeau, N. Degauque, F. Moizant, A. Pallier, C. Ruiz, M. Guillet, D. Laplaud, and J. P. Souillou. 2005. Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am J Transplant* 5:330-340.

Footnotes

¹This research was supported by the ProFit Grant IBB/EFRES (10142548) and the BMBF Grant Nr. 0315005B. CAPES and CNPq.

²These authors contributed equally to the study.

³Address correspondence to Dr. Michal Or-Guil, Systems Immunology Lab, Research Center ImmunoSciences, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Hessische Str. 3-4, D-10115 Berlin, Germany. E-mail: m.orguil@biologie.hu-berlin.de

³Abbreviations used in this paper:

⁴The online version of this article contains supplemental material.

Tables

Table 1. Demographic and clinical data on study groups^a

Study Group	ST	CR	OT	HE
Size (n)	8	8	5	9
Sex (m, f)	4,4	6, 2	3, 2	4, 5
Age (years)	50 ± 6	46 ± 12	43 ± 9	38 ± 8
Age range (years)	40-56	28-64	31-54	30-52
Time since transplantation	9 ± 7	11 ± 3	16 ± 9	n/a
Donor (living, deceased)	6, 2	3, 5	4, 1	n/a
HLA (A, B, DR) mismatches	3,87 ± 1,24	4,57 ± 1,98 (n=7) n/a = 1	0 (n=2) 3 (n=2) 4 (n=1)	n/a
Blood Transfusion (Y, N)	4, 2	3, 1	2, 2	n/a
Acute rejection episode (Y, N)	3, 5	5, 3	1, 4	n/a
Viral infections (Y,N)	2, 4	4, 2	1, 2	n/a
Drug-free time (years)	n/a	n/a	4,7 (1,5-8)	n/a

^aStudy groups under immunosuppressive treatment (ST, individuals with stable graft function; CR, Individuals in chronic rejection) and no immunosuppressive treatment groups (OT, subjects in operational tolerance; HE, healthy volunteers); m, male; f, female; n/a, does not apply or is not available; Y/N, yes/no. Numeric data are given as mean ± SD.

Table 2. Supervised classification of study groups by P-SVMa

Study Groups	BACC	Sensitivity [%]	Specificity [%]	p-value
OT-CR	73.8	60.0	87.5	0.029
(ST+CR)-(HE+OT)	68.8	50.0	87.5	0.019
CR-HE	66.0	44.4	87.5	0.037
(HE+OT+ST)-CR	49.4	36.4	62.5	0.553
OT-HE	46.7	60.0	33.3	0.461
OT-ST	37.5	75.0	0.0	1.000
CR-ST	37.5	75.0	0.0	1.000

^aStudy groups under immunosuppressive treatment (ST, stable transplant individuals; CR, subjects in chronic rejection) and no-treatment groups (OT, subjects in operational tolerance; HE, healthy volunteers); BACC, balanced accuracy.

Supplemental Table 1. Feature sets of random peptides selected by P-SVM^a

	OT-CR	CR-HE
1	GKILTMKEQEFFDE	MNFMQIAINVTVPHF
2	PTNSSFFRGKQEYIH	YGNRAQNWWISHVRE
3	AWHNP IAMWLTPLYI	PQESSQTYALWPGNI
4	LVMVRGGYKKYEMHR	ADATPQQYLKHYQTT
5	LEINFHQRTNVYPP	WQWESVANIKFLTPR
6	FLFRWPWTRHQIGAG	VRKVTHHSAYWIYYG
7	HTGAPLSKSWGKVPD	GFTGKPGWLPYGWQ
8	RNHDILEIEIEAPKR	PIGMTKSDWWRGQAF
9	QWIWQNGPKLVDHIP	GMLPMNNELGSWWGT
10	LQWKVRGTMWISHWA	IKVNHRYESLPGQSL
11	KVEQMGQERPDETLTY	VDGLQFLTSDMTETH
12	PIGMTKSDWWRGQAF	TMNHIEYMRQAENVH
13	GSVGTPGAHDEFIVI	HPASPSWGIDRPHKI
14	SEIQPSMWMIDADAH	QHNEMRFRWAWNREM
15	WGVIPRPHSLLLFFE	ESNRWLEWGQIYASH
16	EKTVSAEYVIIVMHA	FNPWNEVEFNNTKMA
17		ERFQWGHLETLAQHR
18		IDYVKTKNMMDKDMP
19		SYLWWNSRQYDTMNQ
20		TWEIFNWTGYAEVG
21		GYWTFNGHIRNMWDP
22		YWTKQFVFEVAENYS

^aAmino acid sequences of the peptides that discriminate OT-CR (n=16) or CR-HE (n=22).

Figure Legends

FIGURE 1. Similar levels of plasma IgM, IgG and total protein in all study groups. Plasma protein levels (mg/ml) by ELISA: (A) IgM, (B) IgG, (C) Total BCA protein. Symbols represent mean values of samples evaluated in duplicate; bars indicate means of study groups. Study groups under immunosuppressive treatment (ST, stable transplant individuals; CR, subjects in chronic rejection) are highlighted in red. Individuals free of immunosuppressive drugs (OT, subjects in operational tolerance; HE, healthy volunteers) are shown in black. There were no significant differences among study groups ($p > 0.05$; Mann-Whitney U test).

FIGURE 2. Operational Tolerance display IgM signal intensity profile similar to healthy individuals. Blood plasma samples (n=30) and controls (5 Ltx36 repeats and 1 blank) were probed on microarrays containing a library of 942 random peptides. SI profiles of bound IgM antibodies were obtained after detection with an Alexa647-labeled anti-human IgM secondary antibody. (A) Signal intensity distribution in data aggregated from 5 repeat incubations of the healthy volunteer sample Ltx36. Illustrated are the histogram of log-transformed SIs (bars) and the fitted Gaussian density curve (red line). (B) Cumulative SI distributions of all plasma samples included in the study and one blank incubation. (C) Relationship of peptide mean SI and standard deviation (SD). For each group, the mean SI of each peptide was calculated and plotted against its SD. Correlation analysis revealed strong linear correlation in all study groups (Pearson $r > 0.85$). For clarity reasons, only linear regression curves fitted to the data are shown. (D) Mean sample SI. Symbols represent mean SIs of samples across 942 peptides; bars indicate means of study groups. Statistically significant differences are indicated (* $p \leq 0.05$; Mann-Whitney U test). In all subfigures, study groups under immunosuppressive treatment (ST, stable transplant individuals; CR, subjects in chronic rejection) are highlighted in red; no immunosuppressive treatment groups (OT, individuals in operational tolerance; HE, healthy volunteers) are shown in black.

FIGURE 3. Correlation analysis of IgM mean sample IgM SI. Symbols represent mean values of samples assayed in duplicate. Study groups under immunosuppressive treatment (ST, stable transplant individuals; CR, subjects in chronic rejection) are highlighted in red. No-treatment groups (OT, subjects in operational tolerance; HE, healthy volunteers) are shown in black. Correlations between IgM concentration and mean IgM SI were assessed by Pearson correlation (r); *** $p < 0.001$.

FIGURE 4. Principal component analysis of IgM SI data. Blood plasma samples (n=30) were probed on microarrays containing a library of 942 random peptides. SI profiles of bound plasma IgM antibodies were obtained after detection with an Alexa647-labeled anti-human IgM secondary antibody. (A) PCA run on the 942x30 dimensioned data matrix identified two dominating sources of variance (PC1 and PC2) which together account for 77.2% of the variance in the data. Study groups do not separate in the plane spanned by PC1 and PC2. (B) PCA run on CR and OT IgM SI data of the 16 peptides extracted by P-SVM identified two dominating sources of variance (PC1 and PC2) which together account for 91.7% of the variance in CR and OT data. (C) PCA run on CR and HE IgM SI data of the 22 peptides extracted by P-SVM identified two dominating sources of variance (PC1 and PC2) which together account for 68.3% of the variance in CR and HE data. ST, stable transplant individuals (orange); CR, subjects in chronic rejection (red); OT, subjects in operational tolerance (grey); HE, healthy volunteers (black).

SUPPLEMENTAL FIGURE 1. Correlation of IgM, IgG and total protein levels in blood plasma samples of study groups. (A-C) Symbols represent mean values of samples assayed in duplicate. Study groups under immunosuppressive treatment (ST, stable transplant individuals; CR, subjects in chronic rejection) are highlighted in red. No-treatment groups (OT, subjects in operational tolerance; HE, healthy volunteers) are shown in black. Associations between IgM, IgG and total protein concentrations were assessed by Pearson correlation (ρ); ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Outliers in parentheses were excluded from correlation analysis.

SUPPLEMENTAL FIGURE 2. Comparison of sorted peptide mean SIs between study groups. For the group of CR individuals, the 942 peptide mean SIs were sorted in ascending order. Corresponding peptide mean SIs of the other study groups are shown according to this sorting.

SUPPLEMENTAL FIGURE 3. Correlation analysis of IgG or total protein level and mean sample IgMSI. (A-B) Symbols represent mean values of samples assayed in duplicate. Study groups under immunosuppressive treatment (ST, stable transplant individuals; CR, subjects in chronic rejection) are highlighted in red. No-treatment groups (OT, subjects in operational tolerance; HE, healthy volunteers) are shown in black. Associations between IgG or total protein concentration and mean IgMSI were assessed by Pearson correlation (r).

SUPPLEMENTAL FIGURE 4. Composition of the random peptide library (n=942 peptides) and the P-SVM selected features for classification of OT vs. CR (n=16 peptides) and CR vs. HE (n=22 peptides). (A) Amino acid composition, (B) amino acid property groups composition.

SUPPLEMENTAL FIGURE 5. Global heatmap of Spearman pinter-array correlation coefficients.

Figures

Figure 1

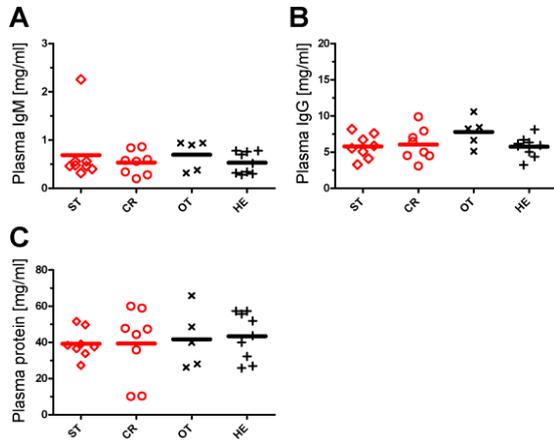


Figure 2

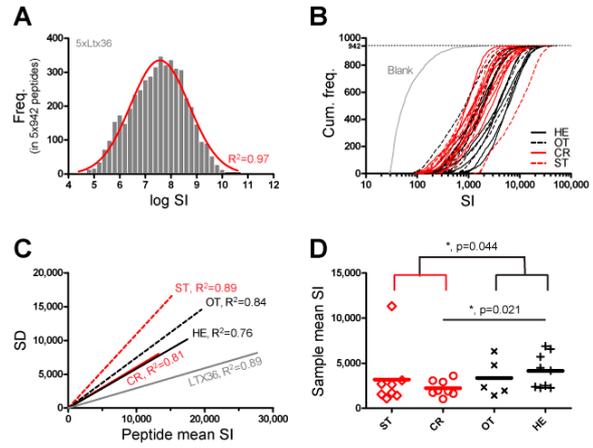


Figure 3

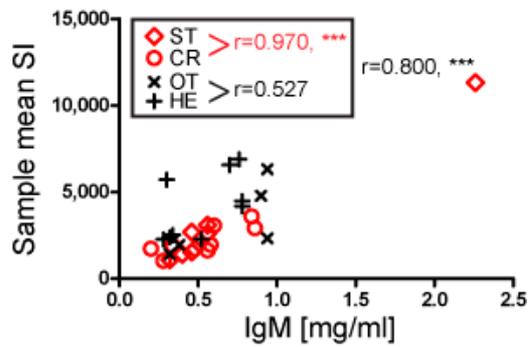
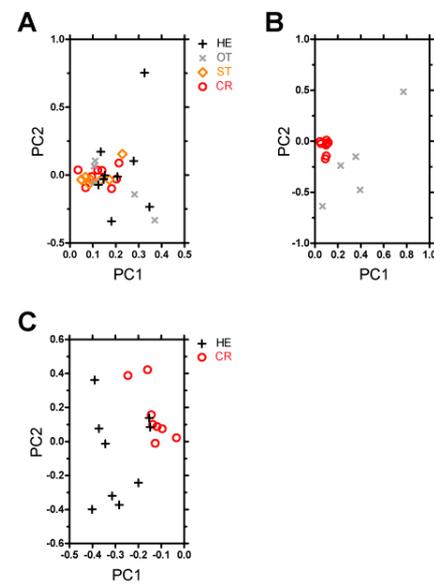
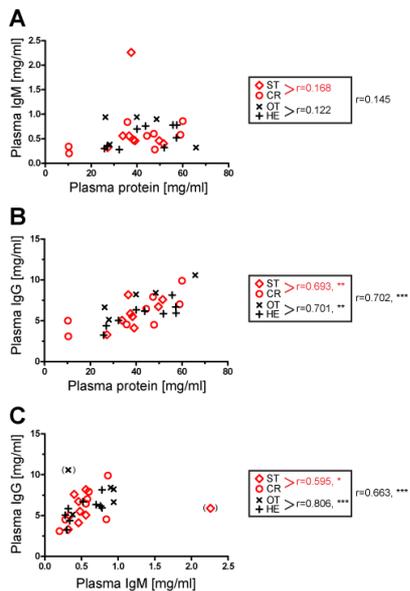


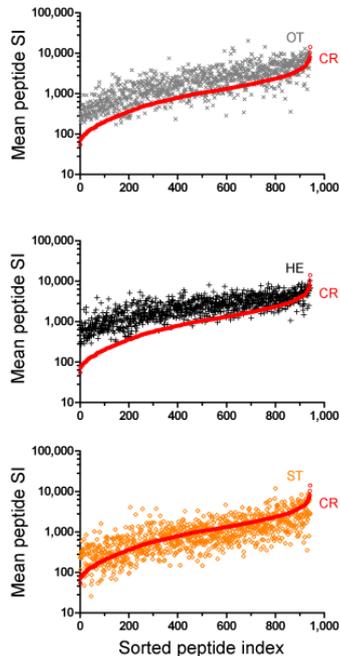
Figure 4



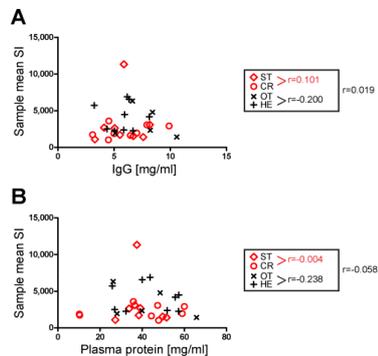
Supplemental Figure 1



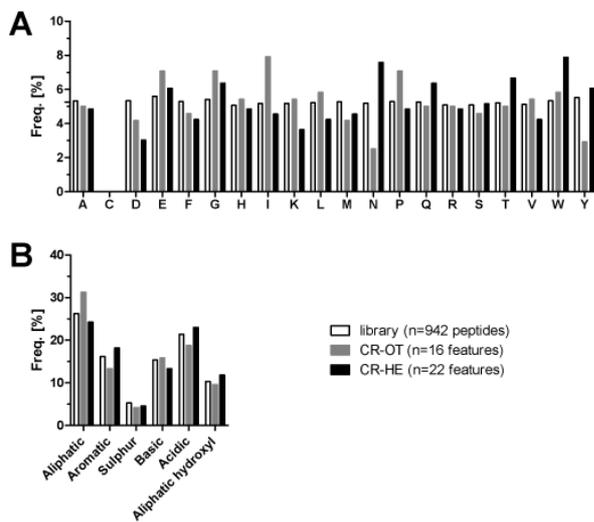
Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 5

