

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia**

Tamires Moreira Gomes

**ANÁLISE DE QUIMERISMO DE CÉLULAS T REGULADORAS EM RECEPTORES  
DE TRANSPLANTE DE RIM OU FÍGADO**

Belo Horizonte

2023

Tamires Moreira Gomes

**ANÁLISE DE QUIMERISMO DE CÉLULAS T REGULADORAS EM RECEPTORES  
DE TRANSPLANTE DE RIM OU FÍGADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Dr. Helton da Costa Santiago

Coorientador: Dr. Cristiano Xavier Lima

Belo Horizonte

2023

043

Gomes, Tamires Moreira.

Análise de quimerismo de células T reguladoras em receptores de transplante de rim ou fígado [manuscrito] / Tamires Moreira Gomes. – 2023. 63 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Helton da Costa Santiago. Coorientador: Dr. Cristiano Xavier Lima.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Quimerismo. 3. Tolerância ao Transplante. 4. Linfócitos T Reguladores. I. Santiago, Helton da Costa. II. Lima, Cristiano Xavier. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE TAMIRES MOREIRA GOMES.** Ao um dia do mês de dezembro de 2023 às 13:30 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “ConferênciaWeb”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Análise de quimerismo de células T reguladoras em receptores de transplante de rim ou fígado", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Helton da Costa Santiago, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Maria de Fátima Martins Horta (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Flávio Almeida Amaral (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Cristiano Xavier Lima - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA  
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 01 de dezembro de 2023.

MARIA DE FATIMA MARTINS HORTA:32696612668  
 Assinado de forma digital por MARIA DE FATIMA MARTINS HORTA:32696612668  
 Dados: 2023.12.03 13:19:27 -03'00'

**Dra. Maria de Fátima Martins Horta (UFMG)**

**Dr. Flávio Almeida Amaral (UFMG)**

**Dr. Cristiano Xavier Lima - Coorientador (UFMG)**

Documento assinado digitalmente

CRISTIANO XAVIER LIMA  
 Data: 04/12/2023 17:00:43-0300  
 Verifique em <https://validar.it.gov.br>



**Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (UFMG)**

## AGRADECIMENTOS

À minha família, por não medir esforços para que eu concluísse a graduação, sem eles essa etapa não havia sequer começado.

Ao meu marido, Robledo, por secar minhas lágrimas de angústia, por me esperar acordado de madrugada diversas vezes, por ser meu ouvinte durante os treinamentos de apresentações e por não poupar esforços para que eu concluísse essa etapa tranquilamente.

À minha amiga, Renata, por ser meu ombro amigo, desde a construção da ideia em iniciar a carreira científica até a concretização dessa primeira etapa, que, em diversos momentos, amenizou minhas angústias e me aconselhou em inúmeros momentos. Obrigada também pela compreensão com minha ausência no laboratório. Não tenho palavras para descrever minha gratidão.

A todos do laboratório Simile, pela compreensão com minha ausência, pelos incentivos em continuar essa jornada e por serem meus ombros amigo nos momentos mais desgastantes. Um agradecimento especial à Amiga, Marina, por segurar a barra nos setores da soroteca e do painel durante minha ausência.

A todos do laboratório Target, por todas as dicas, da bancada à análise da qPCR e pela disponibilidade em me ajudar a conciliar a rotina do equipamento 7500 com meus experimentos. Em especial à Ana Carolina, por me ceder os kits de amplificação.

A todos do laboratório de Imunoparasitologia, por me acolherem de forma tão generosa, pela paciência com minha inexperiência científica e por todos os conselhos científicos, em especial à Marcela.

A todos da Unidade de Transplantes do Hospital Felício Rocho, em especial à Taynan e à Valdinéria, pela contribuição para a realização deste trabalho, disponibilidade e dedicação. À Gilvânia, que, com seu alto-astral e proatividade, tornou o início do processo de coleta de amostras mais leve.

Ao meu coorientador, Cristiano Xavier, eu não tenho palavras para descrever a minha gratidão, por ter acreditado no meu potencial, ter me incentivado e por sempre me aconselhar para que eu me tornasse uma profissional melhor. Foram dias e dias de angústia durante esse período por estar ausente no laboratório e o seu apoio foi crucial para que eu continuasse essa jornada. Você é um ser humano de luz! Muito obrigado!

Ao meu orientador, Helton da Costa, por confiar este trabalho a mim, mesmo sabendo que não poderia me dedicar exclusivamente ao mestrado. Obrigado pelos ensinamentos e discussões, sem a sua persistência eu teria desistido de encontrar o cálculo para o quimerismo

rsrs. Sua perseverança e postura profissional são exemplos a serem seguidos por mim. Aos integrantes da banca, por terem, gentilmente, aceitado o convite de participar da Banca Examinadora e contribuir com suas experiências neste trabalho.

A todas(os), o meu muito obrigada!

## RESUMO

O uso contínuo de medicamentos imunossupressores é um dos fatores que impedem os pacientes transplantados de atingirem tolerância operacional. A literatura mostra a presença de quimerismo de células doadoras em receptores de órgãos e a importância das células T reguladoras (Tregs) na tolerância operacional. Baseado nisso, avaliamos a presença de quimerismo de Tregs do doador em receptores de transplante renal e hepático e sua associação com a evolução clínica dos pacientes. Com esse intuito, trinta e seis pacientes transplantados de rim ou fígado entre 2021 e 2023 foram submetidos à coleta de esfregaço bucal e sangue periférico. O DNA extraído de amostras de swab bucal foi utilizado para a avaliação de marcadores polimórficos usando a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para identificar marcadores negativos no receptor que poderiam ser informativos em identificar células do doador no sangue periférico. Posteriormente, Tregs foram isoladas de amostras de sangue venoso periférico do receptor e o DNA foi extraído para análise de microquimerismo por meio de qPCR. Os resultados obtidos demonstraram que 61% dos pacientes possuíam quimerismo de células T reguladoras em níveis detectáveis por nossa técnica. Observamos também uma associação entre quimerismo de Tregs e menores índices de rejeição, sugerindo que o microquimerismo de Tregs não só parece ser um forte preditor de ausência de episódios de rejeição, mas também que pode indicar melhor sobrevida do enxerto. Diante destes achados, esse trabalho demonstra um potencial marcador de pacientes tolerantes, além de abrir portas para novos estudos sobre a compreensão dos estímulos imunológicos que mantêm a presença dessas células no sangue periférico de receptores de rim e fígado.

Palavras-chave: microquimerismo; tolerância operacional; Tregs

## **ABSTRACT**

The continuous use of immunosuppressive medications is one of the factors that prevent transplant patients from achieving operational tolerance. The literature shows the presence of donor cell chimerism in organ recipients and the importance of regulatory T cells (Tregs) in operational tolerance. Based on this, we evaluated the presence of donor Treg chimerism in kidney and liver transplant recipients and its association with the patient's clinical outcome. For this purpose, thirty-six kidney or liver transplant patients between 2021 and 2023 underwent oral swab and peripheral blood collection. DNA extracted from buccal swab samples was used to evaluate polymorphic markers using Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) to identify negative markers in the recipient that could be informative in identifying donor cells in peripheral blood. Subsequently, Tregs were isolated from recipient's peripheral venous blood samples and DNA was extracted for microchimerism analysis using qPCR. The results obtained demonstrated that 61% of patients had regulatory T cell chimerism at levels detectable by our technique. We also observed an association between Treg chimerism and lower rejection rates, suggesting that Treg microchimerism not only appears to be a strong predictor of the absence of rejection episodes, but also that it may indicate better graft survival. In view of these findings, this work demonstrates a potential marker of tolerant patients in addition to opening doors for novel studies on understanding the immunological stimuli that maintain the presence of these cells in the peripheral blood of kidney and liver recipients.

Keywords: microchimerism; operational tolerance; Tregs

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de alorreconhecimento .....	18
Figura 2: Citotoxicidade celular mediada por anticorpos.....	22
Figura 3: Isolamento de células mononucleares.....	32
Figura 4: Workflow da extração de células TCD4+ a partir de PBMCs.....	33
Figura 5: As reações de qPCR possuem boa eficiência de reação, sensibilidade e linearidade .....	40
Figura 6: As reações de qPCRs são capazes de detectar quimerismos.....	44
Figura 7: Extração de DNA de células T reguladoras .....	47
Figura 8: Quimerismo de células T reguladoras.....	49
Figura 9: A presença de quimerismo de Tregs aumenta em quase 16 vezes as chances de não ter episódios de rejeição.....	50
Figura 10: A imunossupressão não interfere no número de Tregs e nos níveis de quimerismo de Tregs.....	51
Figura 11: Mulheres possuem níveis de quimerismo mais elevados.....	52
Figura 12: Associação entre quimerismo e episódios de rejeição em homens e mulheres....	53
Figura 13: Os níveis de quimerismo não estão relacionados com a idade.....	53
Figura 14: Os níveis de quimerismo não estão relacionados com o número de mismatches	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência de iniciadores e sondas utilizadas para a qPCR.....	35
Tabela 2: Ciclagem da qPCR.....	37
Tabela 3: Marcadores positivos em indivíduos voluntários .....	39
Tabela 4: Eficiência de amplificação.....	42
Tabela 5: Dados clínicos.....	45
Tabela 6: Frequência de marcadores positivos.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABMR *Antibody mediated rejection* (Rejeição mediada por anticorpos)
- ADCC *Antibody-dependent cellular cytotoxicity* (Citotoxicidade dependente de anticorpo)
- APC *Antigen presenting cell* (Célula apresentadora de antígeno)
- Ct *Threshold cycle* (Ciclo de limiar)
- DAMP *Damage-associated molecular patterns* (Padrões moleculares associados a dano)
- DECH Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro
- DSA *Donor specific antibody* (Anticorpos específicos contra o doador)
- FAM 6-carboxifluoresceína
- GAPDH Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- HLA *Human leukocyte antigen* (Antígeno leucocitário humano)
- IRA Insuficiência renal aguda
- ICOS Coestimulador induzível de células T
- InDel Inserção e deleção
- IS Imunossupressores
- MHC *Major histocompatibility complex* (Complexo principal de histocompatibilidade)
- PBMC *Peripheral blood mononuclear cell* (Célula mononuclear do sangue periférico)
- PBS *Phosphate buffered saline* (Solução salina tamponada com fosfato)
- PRR *Pattern recognition receptors* (Receptores de reconhecimento de padrões)
- qPCR Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
- RPMI *Roswell Park Memorial Institute Medium* (Meio Roswell Park Memorial Institute)
- TAMRA 6-carboxi-tetrametil-rodamina
- TCMR *T cell mediated rejection* (Rejeição mediada por células T)
- TCR *T cell receptor* (Receptor de células T)
- TO Tolerância operacional
- Treg Células T reguladoras
- 6-MP 6-mercaptopurina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 Transplantes .....	13
1.1.1 Definições .....	13
1.1.2 Histórico .....	13
1.2 Visão geral da aloimunidade .....	18
1.2.1 Via direta de alorreconhecimento .....	18
1.2.2 Via indireta de alorreconhecimento .....	18
1.2.3 Via semidireta de alorreconhecimento .....	19
1.2.4 Sinais co-estimulatórios .....	20
1.3 Rejeição .....	20
1.3.1 Rejeição mediada por células T .....	21
1.3.2 Rejeição mediada por anticorpos .....	22
1.3.3 Rejeição hiperaguda .....	23
1.3.4 Rejeição aguda .....	24
1.3.5 Rejeição crônica .....	24
1.4 Tolerância imunológica e as células T reguladoras .....	24
1.5 Tolerância Operacional .....	25
1.5.1 Tolerância operacional no transplante renal .....	26
1.5.2 Tolerância operacional no transplante hepático .....	26
1.5.3 Quimerismo e estratégias de indução da tolerância operacional .....	27
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	30
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	31
3.1 Objetivos específicos .....	31
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
4.1 Pacientes .....	32
4.2 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico .....	32
4.3 Extração de células T CD4+ a partir de células mononucleares .....	33
4.4 Extração de células CD25+ a partir de células T CD4+ .....	34
4.5 Extração de DNA de células T CD4+ CD25+ .....	34
4.6 Extração de DNA de swab bucal .....	35
4.7 Quantificação do DNA .....	35

4.8 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) .....	35
4.9 Triagem de marcadores por reação em cadeia da polimerase em tempo real .....	37
4.10 Detecção de microquimerismo por reação em cadeia da polimerase em tempo real .....	38
4.11 Quantificação do microquimerismo .....	38
4.12 Análise estatística .....	38
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
5.1 O conjunto de marcadores consegue diferenciar indivíduos .....	39
5.2 Validação da qPCR .....	40
5.3 Simulação de quimerismo .....	43
5.4 Dados clínicos dos pacientes .....	45
5.5 Extração de DNA de células T reguladoras .....	46
5.6 Triagem de marcadores positivos .....	47
5.7 Análise de quimerismo .....	48
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>58</b>
<b>ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b> .....	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Transplantes

#### 1.1.1 Definições

O transplante é um procedimento cirúrgico que envolve a substituição de um órgão ou tecido disfuncional por outro saudável. Dependendo da origem do órgão ou tecido transplantado, ele pode ser categorizado como: autoenxerto, quando o enxerto é proveniente do próprio paciente; aloenxerto, quando o doador é da mesma espécie do receptor, mas são geneticamente diferentes; e xenoenxerto, quando o enxerto é de um doador de uma espécie diferente do receptor. Respectivamente, esses transplantes são classificados como autotransplante, alotransplante e xenotransplante (BARKER; MARKMANN, 2013; DANGOOR *et al.*, 2014).

#### 1.1.2 Histórico

A história dos transplantes é repleta de desafios, contratempos, triunfos e avanços que muitas vezes não foram reconhecidos na época. Diversas tentativas com autotransplante de pele foram praticadas, mas apenas em 1869, Jacques-Louis Reverdin descobriu que a espessura grossa desses enxertos de pele impedia a revascularização (BARKER; MARKMANN, 2013). Em 1902, o cirurgião Emerich Ullmann da Escola de Medicina de Viena, realizou o primeiro autotransplante de rim no pescoço de um cão (DANGOOR *et al.*, 2014). Novos experimentos com doadores caninos, caprinos e suínos foram praticados por ele, mas, todos malsucedidos, decorrente de complicações anastomóticas vasculares (HATZINGER *et al.*, 2016).

Embora o sucesso com os autoenxertos tenham começado a surgir, a falha de aloenxertos permanecia, até que, estudando aloenxertos de tumores em camundongos, o biólogo Carl Jensen hipotetizou que a falha ocorria em função de uma resposta imunológica. Entretanto, tal hipótese foi descartada por Paul Ehrlich, ao não detectar anticorpos no aloenxerto e em função do conhecimento limitado da época sobre a imunidade humoral e especialmente celular (BARKER; MARKMANN, 2013).

A dificuldade na técnica cirúrgica permanecia, até que o cirurgião francês Alexis Carrel em parceria com o fisiologista Charles Guthrie superaram o problema da anastomose vascular através do uso de uma nova técnica de sutura com agulhas e fios finos, habilidade técnica e medidas rigorosas de assepsia, realizando com sucesso autotransplantes de rim, tireoide, ovário,

coração, pulmão e intestino delgado em diferentes espécies animais (BARKER; MARKMANN, 2013; DANGOOR *et al.*, 2014). Carrel também alcançou um marco em sua carreira ao observar que a refrigeração do enxerto reduzia seu metabolismo e o mantinha preservado até o momento da perfusão. Com sua experiência em transplante de órgãos, também começou a estudar alternativas para evitar a falha dos aloenxertos, como a compatibilidade entre doador e receptor (BARKER; MARKMANN, 2013; HATZINGER *et al.*, 2016).

Os dois primeiros xenotransplantes foram executados por Mathieu Jaboulay, mas ambos trombosaram rapidamente. Ernst Unger persistiu com insucesso em dois xenotransplantes com aloenxerto renal de macaco, que, segundo Unger, a falha ocorreu mediante alguma barreira bioquímica entre humanos e macacos (BARKER; MARKMANN, 2013; HATZINGER *et al.*, 2016).

Ainda intrigados com o insucesso dos aloenxertos, em 1912, no laboratório de Ehrlich, o médico alemão Georg Schöne demonstrou que os aloenxertos de pele falhavam mais rápido após novas tentativas com aloenxertos do mesmo doador, estabelecendo um dos princípios da Imunologia dos Transplantes: “a rejeição é um evento imunológico” (BARKER; MARKMANN, 2013).

No final de 1920, o cirurgião e pesquisador americano James Murphy demonstrou que o sistema linfóide exercia um papel fundamental na tolerância ao aloenxerto tumoral, então, com o intuito de prolongar a sobrevivência do aloenxerto, diversas estratégias para eliminação dos linfócitos do receptor foram realizadas com sucesso. Embora Murphy não tenha descoberto os mecanismos responsáveis pela redução do infiltrado linfocitário observado em relação aos aloenxertos que falharam, tais evidências foram publicadas, mas ignoradas pela maioria dos pesquisadores da época (BARKER; MARKMANN, 2013).

Com o fracasso das tentativas de alotransplante, entre as décadas de 1920 e 1930 o ritmo de pesquisas e descobertas foram reduzidos, mas em 1933, o cirurgião Yurii Voronoy perfundiu o primeiro aloenxerto renal humano de um doador cadáver decorrente de encefalite em uma receptora com insuficiência renal aguda (IRA) por envenenamento com mercúrio. Ele acreditou que o mercúrio iria impedir uma reação imunológica, mas a receptora faleceu dois dias após o transplante ao receber uma transfusão sanguínea com incompatibilidade do grupo sanguíneo ABO (DANGOOR *et al.*, 2014; HATZINGER *et al.*, 2016). Voronoy persistiu no alotransplante em 6 pacientes, mas todos foram a óbito (DANGOOR *et al.*, 2014).

Entre as décadas de 1940 e 1950 foi observado novamente o fenômeno da memória imunológica, mas em nada resultou de prático, pois, mais uma vez, não foram encontrados

anticorpos no aloenxerto. Baseado no conhecimento da relação entre imunologia e rejeição, tentativas de uso da cortisona e irradiação foram aplicadas a pacientes com falha de enxertia mas, novamente, todas sem sucesso. Mesmo com a reprovação da comunidade médica pelo uso de transplantes como tratamento para a falência de órgãos, o urologista Richard Lawler insistiu e despertou otimismo para continuação das pesquisas ao transplantar um rim com sucesso. O feito inspirou a criação do primeiro programa de transplante renal humano na França, liderado pelo cirurgião René Küss (BARKER; MARKMANN, 2013).

Desta vez, convictos de que o transplante renal era a esperança para o tratamento da doença renal crônica, entre 1951 e 1953, dois grupos franceses transplantaram nove pacientes, mas apenas o enxerto advindo de um doador vivo aparentado teve sobrevida em torno de 3 semanas, enquanto aqueles provenientes de doadores falecidos falharam dias após o transplante (BARKER; MARKMANN, 2013). O cirurgião americano David Hume também realizou nove transplantes renais, mas, embora quatro aloenxertos tenham apresentado alguma função renal, apenas um teve sobrevida de quase 6 meses (HATZINGER *et al.*, 2016). Com estes resultados, novamente, o uso de aloenxertos renais em humanos foi desencorajado por médicos da época, que acreditavam ser um tratamento infundado e antiético (BARKER; MARKMANN, 2013).

Frente à incerteza do transplante e aos riscos inerentes a uma nefrectomia de um doador saudável, em 1954, Joseph Edward Murray se deparou com diversas questões médicas, éticas e legais da época, ao transplantar o primeiro rim humano para um irmão gêmeo idêntico. Contudo, o feito foi um sucesso e o enxerto permaneceu funcional por 8 anos, até que uma insuficiência cardíaca levou o receptor a óbito. Esse também foi um marco na história dos transplantes, resultando no prêmio Nobel de Medicina em 1990 (TAN; MERCHANT, 2019).

Ainda assim, o problema da incompatibilidade genética permanecia. Medawar, após uma conversa com seu colega de faculdade Hugh Donald, iniciou experimentos de enxertos de pele em gado gêmeo dizigótico. Contrariando as pessimistas expectativas, a maioria das vacas aceitou o aloenxerto (BARKER; MARKMANN, 2013; FABRE, 2020). Perplexo com o resultado, Medawar retornou a um trabalho de Ray Owen (1945), que demonstrou a presença de quimerismo de eritrócitos e células tronco em gêmeos dizigóticos adultos. Logo, Medawar concluiu que a tolerância dos enxertos de pele ocorreu pelo quimerismo de leucócitos do doador transferidos durante a vida intrauterina (BARKER; MARKMANN, 2013).

Após essa descoberta, Rupert Billingham, Medawar e a estudante de pós-graduação Leslie Brent iniciaram pesquisas em camundongos para indução de quimerismo, inoculando células do baço do doador em fetos intrauterinos. Após o nascimento, eles observaram que

todos os camundongos que tiveram as células do doador injetadas não tiveram rejeição ao aloenxerto e que alguns camundongos quiméricos eram muito pequenos, então, propuseram que era decorrente ao que chamamos hoje de Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH), e, juntamente com outros trabalhos provaram que os linfócitos são móveis, demonstrando a importância da imunidade celular nos transplantes. A descoberta do benefício do quimerismo ao transplante resultou no Prêmio Nobel em 1966 a Medawar e repercutiu até hoje em ensaios clínicos de indução de quimerismo para alcance da tolerância imunológica (BARKER; MARKMANN, 2013).

No ano seguinte após as descobertas de Medawar e colaboradores, Joan Main e Richmond Prehn estabeleceram que o quimerismo de células do doador no receptor promove tolerância ao aloenxerto, após o uso de radiação para enfraquecimento do sistema imune de camundongos e inoculação de células da medula óssea alogênica. Em 1957, Murray aplicou a estratégia em humanos e um dos pacientes sobreviveu 20 anos após receber o rim de seu irmão gêmeo dizigótico, sendo este, um marco em sua carreira (BARKER; MARKMANN, 2013).

Naquela época, drogas imunossupressoras não recebiam a devida atenção por parte dos pesquisadores envolvidos em estudos de transplantes, entretanto, esse cenário mudou após relatos de redução da resposta imune humoral e aumento da sobrevida de aloenxertos de pele em coelhos submetidos ao tratamento com 6-mercaptopurina (6-MP). Em 1960, Roy Calne constatou resultados semelhantes em aloenxertos renais de receptores caninos após a administração da 6-MP e seu derivado, a azatioprina, que se destacava por seu potencial de toxicidade reduzido, estimulando a equipe de Brigham a iniciar o uso em humanos (DANGOOR *et al.*, 2014; SHARMA; SANER; BEZINOVER, 2022).

Posteriormente, Jean Hamburger e René Küss demonstraram que a infusão de medula óssea do doador não era indispensável ao realizarem transplantes bem-sucedidos entre não gêmeos por meio da abordagem de irradiação total associado à 6-MP (BARKER; MARKMANN, 2013). Entretanto, as altas taxas de mortalidade, complicações e graves eventos adversos advindos da irradiação resultaram na suspensão dessa estratégia terapêutica (DANGOOR *et al.*, 2014).

Em 1961, Murray iniciou o pioneirismo no transplante renal com uso de imunossupressão entre indivíduos geneticamente não relacionados. Embora a terapia tenha controlado a rejeição, o paciente faleceu devido à toxicidade da droga. Murray persistiu no transplante associado a menores doses de imunossupressão e somente na terceira tentativa ele obteve sucesso, resultando em uma sobrevida do paciente de um ano. Contudo, foi em 1962

que René Küss e sua equipe alcançaram um marco na história dos transplantes ao realizarem o primeiro transplante renal bem-sucedido entre indivíduos não aparentados. O sucesso ocorreu pelo uso de terapias imunossupressoras, otimização da anastomose vascular e a posição retroperitoneal do aloenxerto renal. Tais descobertas foram primordiais para o avanço científico no campo de imunossupressores (IS), com destaque à descoberta da ciclosporina, em 1976 e do tacrolimus, em 1984. Esses avanços foram cruciais para impulsionar a criação de programas nacionais de transplantes renal e o início de transplantes com outros órgãos, como fígado e coração (DANGOOR *et al.*, 2014; HATZINGER *et al.*, 2016; TAN; MERCHANT, 2019).

Em 1963 Starzl e colaboradores pioneiramente realizaram a primeira tentativa de transplante hepático no mundo em uma criança de 3 anos, que faleceu durante a cirurgia após distúrbios de coagulação (LINDEN, 2009). Apesar do uso da mesma terapia imunossupressora aplicada ao transplante renal, a azatioprina e corticóides, os cinco primeiros pacientes faleceram em menos de 23 dias (MEIRELLES JÚNIOR *et al.*, 2015).

A partir de 1967, Starzl iniciou com êxito o uso da globulina anti-timócito como regime de imunossupressão, porém as taxas de óbito por rejeição crônica e infecções decorrentes da complexidade cirúrgica permaneciam altas, em torno de 70% (MEIRELLES JÚNIOR *et al.*, 2015).

O Brasil também deixou sua marca no cenário do transplante hepático, quando em 1988, Silvano Raia realizou o primeiro transplante hepático com doador vivo no mundo no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com registro de sobrevida do paciente de 6 dias (MEIRELLES JÚNIOR *et al.*, 2015).

Apenas com a introdução do tacrolimus, também iniciado por Starzl em 1990 houve melhora na taxa de sobrevida, em torno de 80-90% (MEIRELLES JÚNIOR *et al.*, 2015). Paralelamente aos avanços nas técnicas cirúrgicas e terapias imunossupressoras, as descobertas no âmbito da histocompatibilidade desempenharam um papel crucial na melhoria da sobrevida dos pacientes transplantados. Um dos pesquisadores mais influentes na época, o médico Jean Dausset, identificou através de estudos de tromboaglutinação e leucoaglutinação o primeiro antígeno leucocitário humano (HLA). Essa descoberta abriu portas para a identificação de diversos antígenos HLA por vários pesquisadores em todo o mundo. Um marco adicional em sua carreira ocorreu quando ele demonstrou que os enxertos de pele entre irmãos com HLA idênticos tinham sobrevida maior do que enxertos de indivíduos com haplótipos diferentes, destacando assim a importância da compatibilidade HLA no contexto da rejeição. Em reconhecimento às suas descobertas, Dausset recebeu o prêmio Nobel em 1980 (TERASAKI,

2009).

Sabendo da relevância dos anticorpos específicos contra o doador (*donor-specific antibodies* ou DSA) no contexto da rejeição de enxertos, em 1964, Terasaki & McClelland desenvolveram um teste *in vitro* para a identificação de DSAs pré-transplante: a prova cruzada por citotoxicidade dependente de complemento (CDC). O teste foi adotado universalmente e as taxas de rejeição hiperaguda reduziram drasticamente. Com o passar do tempo, a prova cruzada por CDC foi continuamente aprimorada e novas técnicas para análise de compatibilidade e detecção de anticorpos foram surgindo. Dentre essas inovações, destaca-se a Prova Cruzada por Citometria de Fluxo, a Tipificação HLA e os Ensaio de Fase Sólida com a plataforma Luminex, permitindo assim a escolha do melhor doador para pacientes sensibilizados imunologicamente (MEHRA; BARANWAL, 2016).

## 1.2 Visão geral da aloimunidade

A ativação da resposta imune no transplante inicia-se no procedimento cirúrgico, ao retirar um órgão de um doador e o implantar em um receptor, desencadeando uma lesão de isquemia e reperfusão, e conseqüentemente, um ambiente de inflamação estéril decorrente da morte celular e da lesão tecidual. Esse ambiente inflamatório expõe padrões moleculares associados a dano (DAMPs) que são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os receptores do tipo Toll e ativam as células apresentadoras de antígeno (APCs) (COZZI; COLPO; DE SILVESTRO, 2017; DUNETON; WINTERBERG; FORD, 2022). As células T do receptor interagem então com essas APCs ativadas e realizam o alorreconhecimento, que pode ser pela via direta, indireta ou semidireta, conforme a figura 1 (DUNETON; WINTERBERG; FORD, 2022).

### 1.2.1 Via direta de alorreconhecimento

Considerada por muitos anos como o principal mecanismo de rejeição ao transplante, a via direta ocorre quando células dendríticas do doador presentes no órgão transplantado, em resposta ao ambiente pró-inflamatório, aumentam a apresentação antigênica através da regulação positiva da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e moléculas coestimuladoras e migram para os gânglios linfáticos para a interação com os linfócitos T do receptor. Nesse momento ocorre interação do complexo MHC-peptídeo presente nas APCs alogênicas com o receptor de células T (TCR) dos linfócitos T, que pode

ativar tantas células T CD4<sup>+</sup> quanto T CD8<sup>+</sup> do receptor (RONCA *et al.*, 2020; DUNETON; WINTERBERG; FORD, 2022). Entretanto, estudos experimentais demonstraram que essa via se restringe apenas às primeiras semanas após o transplante, o que é compreensível, considerando o tempo de sobrevivência das células dendríticas do doador (DUNETON; WINTERBERG; FORD, 2022; TAMARGO; KANT, 2023).

### 1.2.2 Via indireta de alorreconhecimento

Com o passar do tempo, células dendríticas do doador são eliminadas do enxerto e substituídas por células dendríticas do receptor. Esse processo resulta em uma mudança na forma de apresentação dos aloantígenos, que ocorre predominantemente por APCs do receptor (DUNETON; WINTERBERG; FORD, 2022). Neste mecanismo, denominado como alorreconhecimento indireto, células dendríticas do receptor que migraram para o enxerto, capturam, processam e apresentam os aloantígenos às células T do receptor nos órgãos linfoides secundários (COZZI; COLPO; DE SILVESTRO, 2017; DUNETON; WINTERBERG; FORD, 2022).

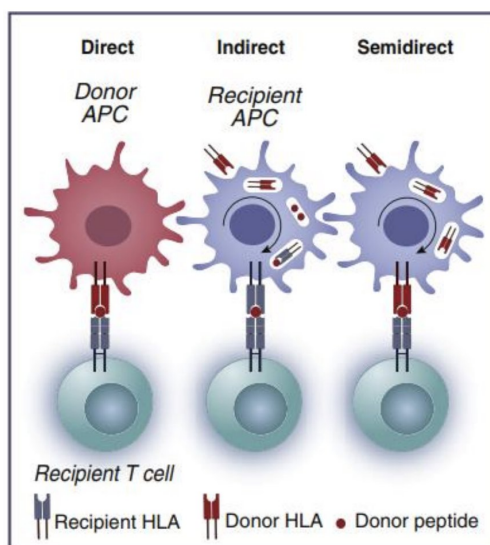
No alorreconhecimento indireto as respostas imunológicas são duradouras e contribuem significativamente para a progressão da rejeição crônica. Apesar de células T CD8<sup>+</sup> ativadas por essa via não serem consideradas relevantes na rejeição a aloenxertos vascularizados, as células T CD4<sup>+</sup> ativadas pela via indireta desempenham um suporte essencial para a aloimunidade de células T CD8<sup>+</sup> humoral e citotóxica (SIU *et al.*, 2018).

### 1.2.3 Via semidireta de alorreconhecimento

No alorreconhecimento semidireto, o aloantígeno do MHC é adquirido por vesículas extracelulares e apresentado por células dendríticas do receptor de maneira intacta (SIU *et al.*, 2018). Vesículas extracelulares derivadas da membrana plasmática, dos endossomos ou do processo de morte celular programada contendo o complexo antígeno-MHC são liberadas por APCs do doador e capturadas por células dendríticas do receptor, que apresenta esse complexo às células T do receptor de maneira intacta. Essas vesículas podem ser produzidas por células parenquimatosas do doador anos após o transplante (DUNETON; WINTERBERG; FORD, 2022).

O alorreconhecimento semidireto também pode atuar em conjunto com a via indireta,

quando células dendríticas do receptor expressam os peptídeos do complexo antígeno-MHC adquirido das células do doador e ativam as células T CD4<sup>+</sup>. Essas células T CD4<sup>+</sup> também podem ativar outras APCs do receptor para a apresentação semidireta às células T CD8<sup>+</sup> do receptor (DUNETON; WINTERBERG; FORD, 2022). Entretanto, os clones de células T decorrentes da ativação da via semidireta são diferentes daqueles ativados pela via indireta, mas são os mesmos que responderiam através do alorreconhecimento da via direta (SIU *et al.*, 2018).



**Figura 1: Mecanismos de alorreconhecimento.** A ativação de células T em órgãos linfoides secundários ocorre através da interação cognata com moléculas HLA do doador em APCs do doador migradas (alorreconhecimento direto), HLA do doador processado exibido pelas APCs receptoras (alorreconhecimento indireto) e moléculas HLA do doador intactas nas APCs receptoras por meio de apresentação cruzada (alorreconhecimento semidireto) (CALLEMEYN *et al.*, 2022).

#### 1.2.4 Sinais co-estimulatórios

Para uma resposta imune funcional ao aloantígeno, além do primeiro sinal, é necessária a ativação dos sinais co-estimulatórios (TAMARGO; KANT, 2023). As vias mais relevantes no cenário do transplante incluem: a via CD28/B7, primordial para a função de células T, que resulta em aumento da produção de citocinas, proliferação celular e indução de proteínas antiapoptóticas e a via CD40/CD154, que amplifica a resposta imune de células T e B ao aloantígeno ao aumentar a expressão de moléculas MHC de classe II, CD80, CD86 e promover a síntese de citocinas por APCs (MARTINEZ; ROSEN, 2005). Além dessas vias, evidências apontam para o envolvimento do coestimulador induzível de células T (ICOS), responsável por promover a síntese de citocinas relacionadas ao fenótipo Th1 e Th2, troca de isotipo e ativação de células B dependente de células T (MARTINEZ; ROSEN, 2005).

### 1.3 Rejeição

Atualmente, a rejeição no transplante renal é dividida principalmente em duas categorias: rejeição mediada por células T (TCMR) e rejeição mediada por anticorpos (ABMR), que pode ser hiperaguda, aguda ou crônica (CALLEMEYN *et al.*, 2022).

#### 1.3.1 Rejeição mediada por células T

Na TCMR, células T CD4<sup>+</sup> desenvolvem resposta contra aloantígenos de classe II e se diferenciam em células T auxiliares com fenótipos Th1, Th2 e/ou Th17 conforme as vias transcricionais ativadas (MARTINEZ; ROSEN, 2005).

O fenótipo Th1 desempenha um papel central na TCMR aguda. Ele promove um ambiente pró-inflamatório mediado por IL-12, TNF e, sobretudo, IL-2 e IFN- $\gamma$ . Essas citocinas amplificam a resposta, estimulando células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas, recrutando monócitos e macrófagos e desencadeando a liberação de mediadores inflamatórios solúveis. Todas essas alterações, em conjunto, intensificam o processo inflamatório e provocam lesão tecidual (MARTINEZ; ROSEN, 2005; COZZI; COLPO; DE SILVESTRO, 2017; RONCA *et al.*, 2020; DUNETON; WINTERBERG; FORD, 2022).

Embora células T CD4<sup>+</sup> com fenótipo Th2 tenham sido descritas como antagônicas ao fenótipo Th1, evidências indicam seu papel ativo na rejeição aguda. As células Th2, diferenciadas pela síntese de IL-4, podem desencadear uma ABMR através da proliferação de células B ativadas pela IL-4, liberada pelas células Th1. Adicionalmente, há um aumento na proliferação de eosinófilos, abundantes no início da TCMR, que secretam IL-13, IL-4 e IL-5, com a IL-4 e IL-5 sendo responsáveis pelo feedback positivo (COZZI; COLPO; DE SILVESTRO, 2017; RONCA *et al.*, 2020).

A diferenciação das células Th17 é provocada por mediadores pró-inflamatórios como IL-1, IL-6, IL-21, IL-23, TGF- $\beta$ , prostaglandina E2 e HMGB-1. A liberação de TGF- $\beta$  induz a formação de fibrose e a IL-17 potencializa o recrutamento de neutrófilos, ocasionando uma inflamação nos túbulos renais (tubulite) (RONCA *et al.*, 2020; TAMARGO; KANT, 2023).

A TCMR também pode envolver as células T CD8<sup>+</sup> que, após serem ativadas via MHC de classe I, diferenciam-se em células T citotóxicas e migram para o enxerto para exercerem atividade citotóxica, induzindo apoptose através da liberação de perforina/granzima B e

ativação da via Fas/FasL. O FasL trimeriza com o Fas expresso em células do enxerto e ativa a caspase 8, resultando na morte celular programada das células do enxerto (MARTINEZ; ROSEN, 2005; COZZI; COLPO; DE SILVESTRO, 2017).

A presença de células T de memória alorreativas antes do transplante é considerada um fator de risco para a rejeição do enxerto. Essas células são geradas após exposição prévia a moléculas alogênicas de MHC, através de gestações, transfusões sanguíneas, transplante prévio ou até por reatividade cruzada a antígenos microbianos. As células T CD4<sup>+</sup> de memória atuam na ABMR por induzirem a síntese de anticorpos por células B, enquanto as células T CD8<sup>+</sup> de memória ocasionam citotoxicidade às células do enxerto. Além da rápida ativação e potente atividade efetora, essas células, de modo geral, apresentam maior resistência aos tratamentos IS (RONCA *et al.*, 2020; DUNETON; WINTERBERG; FORD, 2022).

Clinicamente, no contexto do aloenxerto renal, os achados histológicos característicos da TCMR são compostos por inflamação tubulointersticial e/ou arterite intimal e tubulite (nos casos agudos), inflamação cortical total ou fibrose da íntima arterial com inflamação mononuclear e formação de neoíntima. Essas alterações podem resultar, no caso do transplante renal, em sinais e sintomas como anúria, edema, hipertensão, aumento da creatinina sérica, proteinúria e distúrbios metabólicos (TAMARGO; KANT, 2023). Já a TCMR hepática não apresenta sintomas clínicos específicos, mas a bioquímica hepática é característica de colestase. A histopatologia é vista com um denso infiltrado inflamatório com evidência de danos ao epitélio biliar, aos hepatócitos e ao endotélio da veia porta e hepática (RONCA *et al.*, 2020).

### 1.3.2 Rejeição mediada por anticorpos

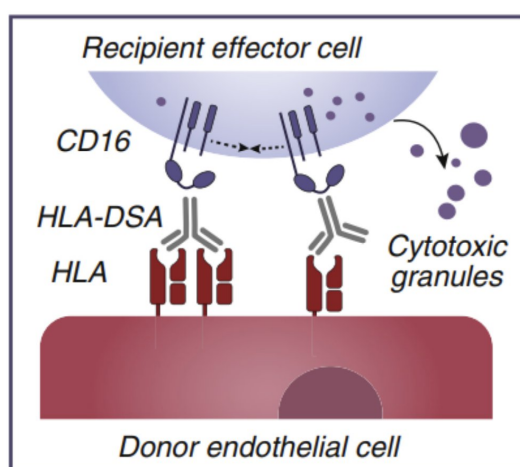
A ABMR é desencadeada principalmente por anticorpos anti-HLA específicos do doador, mas, também pode ocorrer por anticorpos naturais, outros anticorpos contra antígenos do grupo ABO, antígenos da superfície celular endotelial, antígenos de histocompatibilidade menor e autoepítomos, como o receptor tipo I da angiotensina II, receptor de endotelina tipo A e o proteoglicano perlecan (CALLEMEYN *et al.*, 2022).

Na ABMR, células B reconhecem o aloantígeno através de seus receptores de membrana, IgD e IgM. Em seguida, elas internalizam, processam e apresentam esse aloantígeno às células T CD4<sup>+</sup> via MHC de classe II. Após a ativação dessas T CD4<sup>+</sup>, sinais coestimulatórios e citocinas liberadas pelas células T CD4<sup>+</sup> são fornecidos para a proliferação e diferenciação das células B em células plasmáticas e células B de memória (COZZI; COLPO;

DE SILVESTRO, 2017; TAMARGO; KANT, 2023).

Os anticorpos secretados pelas células plasmáticas ativam a via clássica do complemento para a formação do complexo de ataque à membrana nas células endoteliais do enxerto, resultando em morte celular e comprometimento da integridade vascular. Paralelamente, as anafilotoxinas liberadas desencadeiam a degranulação de mastócitos, o recrutamento de macrófagos e neutrófilos e a síntese de moléculas pró-inflamatórias, que irão potencializar a inflamação e ocasionar lesão trombótica e fibrose (COZZI; COLPO; DE SILVESTRO, 2017; TAMARGO; KANT, 2023).

Outra via de lesão tecidual mediada por anticorpos, mas sem o envolvimento da cascata do complemento, é a citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC), conforme figura 2. Nessa via, células NK, macrófagos e neutrófilos se ligam às células revestidas com anticorpos através do receptor Fc $\gamma$ RIIIA. Essa interação, ativa células NK para liberação de granzimas, perforinas e moléculas potencialmente citotóxicas, enquanto os macrófagos ativados liberam espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e TNF, contribuindo para a lesão tecidual (COZZI; COLPO; DE SILVESTRO, 2017).



**Figura 2: Citotoxicidade celular mediada por anticorpos.** Células NK, monócitos e macrófagos ligam-se à fração constante de anticorpos anti-HLA específicos do doador que se envolvem com moléculas HLA do doador, resultando na ativação celular e liberação de grânulos citotóxicos (CALLEMEYN *et al.*, 2022).

Do ponto de vista clínico, a ABMR renal aguda é caracterizada histopatologicamente por inflamação microvascular, arterite intimal ou transmural, microangiopatia trombótica aguda ou lesão tubular aguda e inflamação microvascular, além da presença de DSA circulante. Adicionalmente a esses achados, na ABMR crônica, observa-se glomerulopatia de transplante, multicamadas graves da membrana basal dos capilares peritubulares ou fibrose íntimo-arterial de início recente (TAMARGO; KANT, 2023).

No fígado a ABMR aguda é caracterizada por hipertrofia de células endoteliais,

dilatação capilar portal, microvasculite com monócitos, eosinófilos e neutrófilos e edema portal/periportal, colestase e DSAs elevados, enquanto na ABMR crônica observa-se uma leve inflamação portal, periportal e perivenular, hepatite leve, fibrose portal densa com colagenização, venopatia portal obliterante, fibrose periductal e ductopenia (LEE; FIEL; SCHIANO, 2021).

### 1.3.3 Rejeição hiperaguda

A rejeição hiperaguda ocorre logo após as anastomoses vasculares e é diagnosticada no momento do transplante. Ela ocorre pela presença de anticorpos pré-formados contra moléculas HLA ou antígenos ABO, mas sua incidência atualmente é rara, mediante aos testes de histocompatibilidade realizados antes do transplante (TAMARGO; KANT, 2023).

### 1.3.4 Rejeição aguda

Com a evolução de medicamentos imunossupressores, os índices de rejeição aguda também reduziram com o passar do tempo. Caracterizada pela piora aguda da função do enxerto e alterações histopatológicas agudas, a rejeição aguda inicia-se principalmente através do alorreconhecimento direto e indireto de células TCD4<sup>+</sup>, e pode ser mediada por células T ou por anticorpos (SIL *et al.*, 2018; TAMARGO; KANT, 2023).

### 1.3.5 Rejeição crônica

Caracterizada pelo declínio progressivo e lento da função do enxerto e alterações histopatológicas crônicas, esse tipo de rejeição ocorre normalmente após um ano de transplante. A disfunção do enxerto pode ser desencadeada por células T, aloanticorpos ou a junção dos dois, referida como rejeição mista, e a presença de DSA eleva o risco para a perda do enxerto (TAMARGO; KANT, 2023).

## 1.4 Tolerância imunológica e as células T reguladoras

A manutenção da tolerância imunológica a aloantígenos ocorre principalmente pela tolerância periférica. Os mecanismos subjacentes a essa tolerância, envolvem a exclusão ou anergia de células T reativas aos aloantígenos, deleção clonal de células alorreativas e a

supressão da resposta imune, exercida por células T reguladoras (Tregs). As Tregs são o principal componente da tolerância periférica, e podem se originar de células precursoras da medula óssea, desenvolvendo-se no timo (Tregs naturais), ou se originarem na periferia, a partir de células TCD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup> (Tregs induzidas) após estímulo antigênico, em um ambiente composto por citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e o TGF- $\beta$ , responsáveis por induzir a expressão de FoxP3 (JUNEJA *et al.*, 2022).

A supressão da resposta imune exercida por Tregs pode ocorrer por diversas vias que interagem entre si. A regulação negativa das moléculas coestimuladoras, CD80 e CD86, presentes nas APCs, e a interação dessas moléculas com receptor inibitório, CTLA-4, presente nas Tregs, dificultam a ativação do segundo sinal e aumentam a expressão de enzimas imuno reguladoras, como a indoleamina 2,3-dioxigenase, que cataboliza o L-triptofano e esgota um dos aminoácidos essenciais da ativação de linfócitos, inibindo assim a sua proliferação celular (ELLIAS *et al.*, 2021). A proliferação de células alorreativas também é inibida através da alta expressão de CD25<sup>+</sup> pelas Tregs, um dos componentes do receptor de IL-2, sendo a IL-2 a principal citocina necessária para a proliferação/manutenção das Tregs e estabilização da expressão de FoxP3. A capacidade supressora das Tregs também é caracterizada pela secreção de moléculas como TGF- $\beta$ , IL-10, IL-35, adenosina monofosfato cíclico, granzimas citolíticas e perforinas, que resultarão em anergia e apoptose das células T alorreativas (BAROJA-MAZO *et al.*, 2016; CVETKOVSKI; HEXHAM; BERGLUND, 2021; ELLIAS *et al.*, 2021).

### 1.5 Tolerância Operacional

Os regimes de IS possuem boa eficácia no controle da rejeição aguda, entretanto, a supressão do sistema imunológico é sistêmica e a capacidade em diferenciar agentes infecciosos e o próprio/enxerto é extremamente prejudicada, resultando em risco elevado de infecções oportunistas, malignidades, toxicidade e danos à vasculatura, quando utilizados a longo prazo. Esses pacientes possuem risco mais elevado de desenvolvimento de câncer de pulmão, rim, fígado, linfoma não-Hodgkin, complicações por vírus oncogênicos, como Epstein-Barr e hepatite B, além de distúrbios metabólicos como diabetes, hiperlipidemia, hipertensão, obesidade e doenças cardiovasculares (JUNEJA *et al.*, 2022).

Por isso, alcançar a tolerância imunológica do enxerto têm sido um dos grandes objetivos no campo dos transplantes. Denominada como tolerância operacional (TO), ela é caracterizada pela ausência de rejeição ao aloenxerto sem o uso de IS por no mínimo um ano,

e permanência da capacidade em responder a outros antígenos (ASHTON-CHESS *et al.*, 2007).

A prevalência da TO é dependente do órgão transplantado. O fígado, considerado um órgão tolerogênico, há relatos de que até 20% dos transplantados hepáticos podem alcançar essa tolerância. Por outro lado, em transplantados renais esses casos são mais raros, enquanto nos transplantes pulmonares, cardíacos e pancreáticos a TO nunca foi relatada (ASHTON-CHESS *et al.*, 2007; BONTHA *et al.*, 2018). Essas observações foram possíveis principalmente por pacientes que não aderiram à IS adequadamente e por casos de toxicidade medicamentosa em que a IS foi suspensa, visto que a retirada intencional da IS é raramente adotada por clínicos (ASHTON-CHESS *et al.*, 2007).

Um estudo longitudinal associou episódios de rejeição à baixa frequência de Tregs pré e pós transplante, mas a associação entre o número de Tregs e a tolerância ainda é bem controversa. Enquanto alguns grupos têm encontrado uma correlação positiva entre pacientes tolerantes e a frequência de Tregs no sangue periférico e no enxerto, outros não observaram diferença significativa. Ademais, é bem estabelecido na literatura que a capacidade supressora das Tregs se mantém estável em pacientes tolerantes, mesmo frente ao desenvolvimento da TO (ASHTON-CHESS *et al.*, 2007; CVETKOVSKI; HEXHAM; BERGLUND, 2021).

O estado tolerante é altamente diverso. Assim como a tolerância pode ser transferida e levar à proliferação de uma população de Tregs específicos do antígeno, esse estado tolerante também pode ser perdido, mediante a reativação imunológica ou acúmulo de lesões no enxerto, decorrentes da lesão de isquemia e reperfusão, episódios agudos de rejeição, idade do doador e toxicidade medicamentosa, que levam a cicatrização do enxerto e a longo prazo à perda do enxerto (ASHTON-CHESS *et al.*, 2007; ELLIAS *et al.*, 2021).

### 1.5.1 Tolerância operacional no transplante renal

A variabilidade do estado tolerante associado à variabilidade clínica e dos grupos de pacientes estudados, dificulta a descoberta de um biomarcador preditivo de TO. Trabalhos de análise de expressão gênica em transplantados renal tolerantes demonstraram uma regulação positiva de genes associados à regulação do ciclo celular, aos marcadores de proliferação, aos principais fatores de transcrição e principalmente ao TGF- $\beta$ , enquanto os genes regulados negativamente estavam associados à ativação precoce e tardia de células T, à citotoxicidade e à atividade pró-inflamatória (BONTHA *et al.*, 2018).

Em comparação com pacientes com rejeição crônica e com função do enxerto estável

sob uso de IS, os pacientes tolerantes apresentaram uma regulação positiva dos genes GITR e CD39, associados a Tregs de memória ( $CD4^+ CD45RA^- FoxP3^{high}$ ) e do gene GATA3, associado a um perfil anti-inflamatório. Entretanto, um estudo posterior não encontrou diferença na expressão de GATA3 (BONTHA *et al.*, 2018).

A hiporresponsividade imunológica também é explicada por células B, decorrente do aumento da expressão de BANK1 e redução da expressão do receptor CD32a (FcγRIIa), resultando em uma menor ativação de linfócitos B. Além disso, genes como IRF4 e PRDM1, envolvidos na diferenciação em células plasmáticas, também são regulados negativamente em células B (BONTHA *et al.*, 2018).

### 1.5.2 Tolerância operacional no transplante hepático

O equilíbrio entre a eliminação de patógenos transmitidos pelo sangue e a tolerância a antígenos alimentares derivados do intestino é resultado da resposta imune hepática extremamente controlada (BONTHA *et al.*, 2018). Em condições de homeostase, células dendríticas do fígado possuem baixa expressão de MHC e de moléculas coestimuladoras, além do elevado número de células do sistema imune envolvidas na homeostase e na regulação imunológica hepática, como células NK, células NK T, células de Kupffer, células endoteliais sinusoidais hepáticas, linfócitos intra-hepáticos e células dendríticas com perfil tolerogênico (induzem números mais elevados de Tregs) (BONTHA *et al.*, 2018; ELLIAS *et al.*, 2021).

Essas características imunológicas podem contribuir para a deleção clonal e controle regulatório de células T alorreativas periféricas, resultando no uso de baixas doses de IS de indução e manutenção, menor risco de rejeição crônica e aumento das chances de desenvolvimento da TO, principalmente após 5-7 anos do transplante, um período em que os danos no aloenxerto ocasionados pela IS estão bem estabelecidos (CVETKOVSKI; HEXHAM; BERGLUND, 2021; ELLIAS *et al.*, 2021).

Diversos pesquisadores têm buscado marcadores que possam predizer os pacientes que podem alcançar a TO. No contexto do transplante de fígado, os principais biomarcadores que já foram associados ao estado tolerante são: aumento da razão de células dendríticas plasmocitárias/mieloide, aumento da expressão de PD-L1/CD86, aumento da expressão de HLA-G em células dendríticas mieloides, aumento de células T  $CD4^+ CD25^{high}$  e da expressão de RNA FoxP3 ao longo do desmame da IS, aumento de Tregs intra enxerto, baixa produção de TNF e aumento de IL-10 (BAROJA-MAZO *et al.*, 2016).

Estudos de expressão gênica em pacientes hepáticos tolerantes ao enxerto demonstraram uma regulação negativa de genes pró-inflamatórios, genes enriquecidos em células T $\gamma\delta$ , células NK e seus receptores NKG2D e CD160 e genes que regulam a mitose e proliferação celular, sendo a maioria desses genes regulados pelo TGF- $\beta$  (BONTHA *et al.*, 2018; CVETKOVSKI; HEXHAM; BERGLUND, 2021). Curiosamente, alterações em transcritos relacionados às células B, como observado em pacientes tolerantes ao aloenxerto renal, não foram relatadas em transplantados hepáticos tolerantes, sugerindo que os mecanismos imunológicos de tolerância podem ser dependentes do tipo de órgão transplantado (BONTHA *et al.*, 2018).

### 1.5.3 Quimerismo e estratégias de indução da tolerância operacional

O quimerismo é caracterizado pela presença de células ou DNA de outro indivíduo geneticamente diferente presentes no sangue ou em tecidos. Quando a porcentagem desse quimerismo é inferior a 1%, ele é denominado como microquimerismo (GAMMILL; NELSON, 2010). O quimerismo pode ser misto, onde coexistem células autólogas e alogênicas ou completo, quando todas as células hematopoiéticas são derivadas do doador (MESSNER *et al.*, 2019).

A associação positiva entre a presença de quimerismo e a tolerância é bem estabelecida na literatura. Um estudo de indução de tolerância imunológica em macacos, induziu quimerismo misto das linhagens linfóide e mieloide antes do transplante renal através de um protocolo baseado em um regime não mieloablativo, seguido de transplante de medula óssea ou infusão de esplenócitos do doador associado a administração do anticorpo monoclonal anti-CD154. Eles observaram que os grupos que não desenvolveram quimerismo misto, rejeitaram o enxerto renal de forma aguda ou crônica, reforçando a importância do quimerismo na indução da TO (KAWAI *et al.*, 2004).

Na estratégia de indução de TO ao enxerto com o transplante de medula óssea seguido de transplante com o aloenxerto do mesmo doador, presume-se que o quimerismo de medula óssea induz tolerância através da deleção clonal de células T alorreativas decorrente da apresentação do “próprio” por células dendríticas do doador que migram para os linfonodos (MESSNER *et al.*, 2019). A hipótese de deleção clonal nessa abordagem de indução de TO foi reforçada através de um trabalho que identificou uma redução nos clones de células T reativas a antígenos do doador em receptores tolerantes ao sequenciar a região hipervariável TCR $\beta$

CDR3 de células T. Uma limitação dessa abordagem são os efeitos colaterais ao paciente, com elevado risco de DECH, toxicidade e problemas de absorção intestinal, fazendo com que essa prática não avançasse para a clínica (ASHTON-CHESS *et al.*, 2007; MORRIS *et al.*, 2015; KWON *et al.*, 2021).

Uma alternativa para eliminar esses riscos é a indução de quimerismo misto, na qual o estabelecimento e manutenção a longo prazo da TO é dependente de mecanismos reguladores periféricos, como a proliferação de Tregs FoxP3<sup>+</sup> (MESSNER *et al.*, 2019). A estratégia de indução de TO de Stanford em receptores de rim com HLA idêntico é baseada na depleção linfóide total após o transplante, seguida injeções intravenosas pós transplante de células progenitoras hematopoiéticas CD34<sup>+</sup> do doador altamente enriquecidas e células T CD3<sup>+</sup>. A descontinuação da IS foi aplicada apenas em pacientes que alcançaram quimerismo misto e apenas um paciente desenvolveu rejeição aguda 4 anos após o transplante. Entretanto, ao aplicar essa abordagem em pacientes com HLA incompatível, todos os receptores em que a IS foi retirada desenvolveram rejeição aguda e a IS foi retomada (MESSNER *et al.*, 2019).

Os protocolos de indução de TO baseados em células, até o momento não demonstraram efeitos colaterais graves e se mostraram seguros. Diversos tipos celulares estão sendo investigados em relação a capacidade de indução da TO, como células dendríticas, macrófagos M2, células estromais mesenquimais ou células-tronco, Tregs e até mesmo a entrega de aloantígenos via exossomos/fagossomos (BONTHA *et al.*, 2018).

Um estudo clínico realizado em 2014 pela Northwestern University infundiu 60 dias após o transplante Tregs autólogas policlonais associada ao uso contínuo de sirolimus e micofenolato em 9 receptores de rim de doadores vivos. Os pacientes não apresentaram infecções oportunistas e apenas um paciente desenvolveu rejeição subclínica (MATHEW *et al.*, 2018). Este e muitos outros estudos clínicos demonstraram bons resultados com a infusão de Tregs policlonais autólogas, mas a correlação entre o protocolo adotado e a evolução clínica dos pacientes não pode ser diretamente relacionada ao uso das Tregs autólogas, visto que a maioria das abordagens utilizaram IS de manutenção (DAI *et al.*, 2020).

## 2 JUSTIFICATIVA

O transplante de órgãos é o único tratamento disponível para a falência de órgãos e, para minimizar a resposta imunológica do receptor ao enxerto, os pacientes necessitam fazer o uso contínuo de medicamentos imunossupressores. Embora esses medicamentos sejam eficazes no controle da rejeição aguda, eles são subótimos no que diz respeito à rejeição crônica. Além disso, seu uso prolongado pode ser altamente tóxico e elevar o risco para malignidades, infecções e outras comorbidades.

No entanto, relatos de pacientes que desenvolveram tolerância ao enxerto após não aderirem adequadamente aos imunossupressores e casos de suspensão do medicamento por toxicidade, lançaram luz sobre o campo da tolerância ao enxerto. Baseado nisso e nas estratégias de indução de quimerismo para alcance da tolerância operacional, hipotetizamos que a presença de células T reguladoras do doador pudessem estar associadas a melhor tolerância do enxerto. Isso poderia servir como um marcador para predizer pacientes potencialmente tolerantes, indicando candidatos para retirada da imunossupressão e eliminando assim os efeitos colaterais desse tratamento.

### **3 OBJETIVOS**

Analisar o grau de quimerismo de células T reguladoras por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) e associar com a evolução clínica de pacientes transplantados com fígado e rim.

#### 3.1 Objetivos específicos

1. Estratificar os dados clínicos dos receptores de fígado e rim (idade, sexo, doença de base, tipo de doador, número de gestações, incompatibilidade HLA, tempo pós transplante, imunossupressão utilizada, histórico de rejeição e complicações infecciosas)
2. Validar marcadores genéticos de regiões polimórficas do DNA por qPCR singleplex;
3. Validar a qPCR para análise de microquimerismo de células T regulatórias alogênicas após o transplante;
4. Associar o grau de microquimerismo com a evolução clínica após o transplante.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

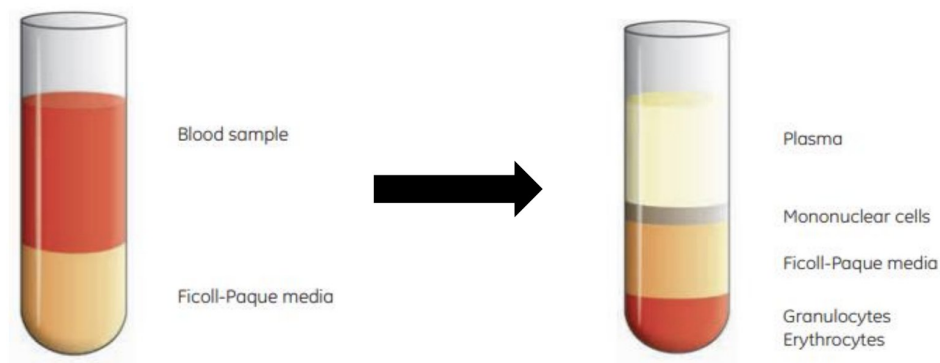
### 4.1 Pacientes

Foram selecionados, retrospectivamente, 21 receptores de rim e 15 receptores de fígado, maiores de 18 anos, transplantados no Hospital Felício Rocho entre 2021 e 2023. Para o grupo de pacientes sem histórico de rejeição, foram selecionados apenas pacientes sem histórico de complicações clínicas após o transplante. Dentre os pacientes renais com histórico de rejeição, foram selecionados apenas os indivíduos cuja rejeição foi confirmada por biópsia do enxerto. Por outro lado, para os pacientes hepáticos, a inclusão para o grupo com histórico de rejeição baseou-se na avaliação clínica e laboratorial realizada previamente pelo médico responsável. Foram excluídos do estudo, pacientes transplantados com doador 100% compatível do mesmo sexo do receptor, pacientes com graves complicações clínicas e pacientes com histórico de retransplante ou transplante prévio de medula óssea alogênica. O termo de consentimento livre e esclarecido (anexo) foi aplicado conforme o estudo aprovado pelo comitê de ética do Hospital Felício Rocho (CAAE 77877417.9.1001.5125) a todos os indivíduos participantes antes da coleta de sangue e swab bucal. As amostras de sangue periférico de voluntários saudáveis foram coletadas de participantes da comunidade.

### 4.2 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico

A extração das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foi baseada na separação por gradiente de densidade com ficoll, onde 40 ml de sangue venoso coletados em tubos EDTA foram diluídos em 40 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1x e adicionados a 3 tubos de 50 ml contendo 10 ml de ficoll para centrifugação de 30 minutos a 400g, sem frenagem. Após a separação dos tipos celulares por migração diferencial, conforme figura 3, o *buffy coat*, contendo PBMCs e plaquetas, foram coletadas, lavadas com PBS 1x e centrifugadas a 400g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas novamente com PBS 1x e centrifugadas por 10 minutos a 400g. Após essa etapa, as PBMCs foram ressuspensas em 1 ml de PBS 1x para a contagem das células em câmara de Neubauer com solução de turk. Em seguida, a concentração das células foi ajustada para  $1.10^8$  células/ml utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração inicial} \times \text{volume inicial} = \text{concentração final} \times \text{volume final}$$

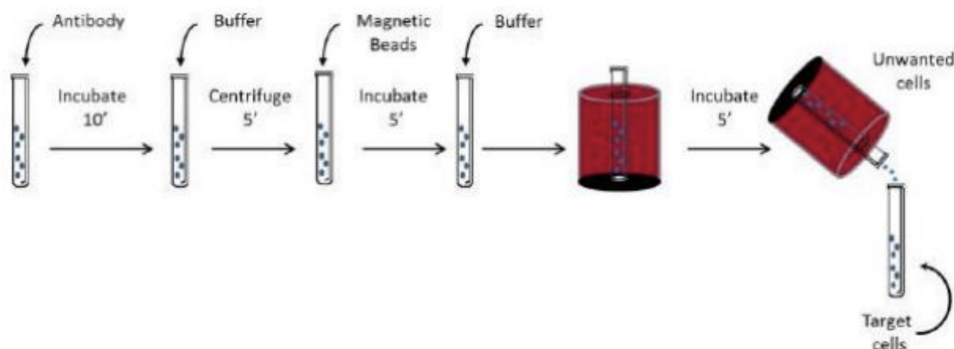


**Figura 3: Isolamento de células mononucleares**

<https://pt.vwr.com/store/product/8060007/ficoll-paque-plus-and-ficoll-paque-premium-centrifugation-media-cytiva>

#### 4.3 Extração de células T CD4<sup>+</sup> a partir de células mononucleares

A extração das células T CD4<sup>+</sup> foi realizada com o kit MagniSort™ Human CD4 T cell Enrichment Kit, baseado na separação magnética por seleção negativa (conforme figura 4). Com as PBMCs extraídas e ajustadas para  $1.10^8$  células/ml foram adicionadas 20 ul de um coquetel de anticorpos biotinizados para cada 100 ul de células, ou seja, a cada  $1.10^7$  células e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos para que os anticorpos se liguem às células inespecíficas. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1x e centrifugadas por 5 min a 300g para descartar o sobrenadante. Com as células ressuspendidas em PBS 1x em seu volume inicial, foram adicionados 20ul de beads magnéticas revestidas com estreptavidina a cada 100ul de células e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, o tubo de 5 ml foi completado com PBS 1x e adicionado ao magneto por 5 minutos. Nesse momento, as beads magnéticas se ligaram aos anticorpos ligados às células inespecíficas pela interação não covalente da biotina com a estreptavidina e as células TCD4<sup>+</sup> ficaram intocáveis e prontas para serem transferidas para um novo tubo de 5ml.



**Figura 4: Workflow da extração de células TCD4<sup>+</sup> a partir de PBMCs**

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/8804-6811-74?SID=srch-srp-8804-6811-74>

Após a extração das células TCD4<sup>+</sup>, foi realizada a contagem das células em câmara de

Neubauer com solução de turk e a concentração celular foi ajustada para  $1,5 \cdot 10^7$  células/ml utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração inicial} \times \text{volume inicial} = \text{concentração final} \times \text{volume final}$$

#### 4.4 Extração de células CD25<sup>+</sup> a partir de células T CD4<sup>+</sup>

O isolamento de células Tregs, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, foi realizado com o Dynabeads® Regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T Cell Kit. Para isso, 100ul de beads magnéticas revestidas com anticorpos monoclonais de camundongo anti-CD25 humano foram adicionadas à  $1,5 \cdot 10^7$  células CD4<sup>+</sup> e incubadas por 25 minutos com inclinação e rotação. Após a incubação, foi realizada a separação magnética para remoção das células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>. Para otimização da purificação das células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> ligadas às beads foram realizadas duas lavagens com PBS 1x. Após as lavagens, 40ul de DETACHaBEAD foram adicionados e incubados por 45 minutos com inclinação e rotação para a remoção das beads ligadas às células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>. Novamente as células foram submetidas a separação magnética para obtenção do sobrenadante (com as células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) e lavadas duas vezes com o Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) para coleta das células residuais. Em seguida, foi realizada uma centrifugação de 350g por 8 minutos e as Tregs foram ressuspensas em 200ul de RPMI para realização da contagem celular em câmara de Neubauer com solução de turk e extração do DNA das Tregs.

#### 4.5 Extração de DNA de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>

A extração de DNA das células T reguladores foi realizada com o Kit Extração Mini Spin Plus da BIOPUR. Para isso, 25ul de proteinase K e 200ul de tampão de lise foram adicionados a 200ul de Tregs e incubadas por 15 minutos a 56°C para que ocorresse a digestão de proteínas, contaminantes e lise celular. Após a incubação, 210ul de etanol foram adicionados à amostra. Posteriormente, a amostra foi transferida para uma coluna com membrana de sílica e centrifugada a 10.000 g por 1 minuto e 30 segundos para que o DNA se ligasse à membrana. Para a remoção dos contaminantes, foram realizadas duas lavagens com tampões fornecidos pelo kit e o DNA foi eluído com 100ul de tampão de eluição previamente aquecido a 56°C.

#### 4.6 Extração de DNA de swab bucal

Para a extração de DNA de swab bucal também foi utilizado o Kit Extração Mini Spin Plus da BIOPUR. Em um tubo de 1,5 ml, foi adicionado 200ul de PBS 1x no swab bucal e incubado por 10 minutos a 56°C, seguida da mesma incubação com 25ul de proteinase K para digestão proteica. Posteriormente, para ocorrer a lise celular, foi adicionado 200ul de tampão de lise e incubado por 2 horas a 56°C. Com o material proteico degradado e o DNA exposto, 210ul de etanol foram adicionados à amostra, seguido de uma centrifugação de 10.000 g por 1 minuto e 30 segundos em uma coluna com membrana de sílica para a ligação do DNA à membrana. Na sequência, para remoção dos contaminantes, foram realizadas duas lavagens com tampões fornecidos pelo kit e o DNA foi eluído com 200ul de tampão de eluição previamente aquecido a 56°C.

#### 4.7 Quantificação do DNA

As amostras de DNA do swab bucal e das Tregs foram quantificadas no equipamento Fluorômetro Quantus com o kit da Promega QuantiFluor™ ONE dsDNA. Para a quantificação foi adicionado 2ul do DNA e 198ul do QuantiFluor® ONE dsDNA Dye e incubado por 5 minutos sob o abrigo de luz. A concentração foi expressa em ng/ul e a concentração do DNA do swab bucal foi ajustada para a mesma concentração do DNA das células Tregs conforme a fórmula:

$$\text{Concentração inicial} \times \text{volume inicial} = \text{concentração final} \times \text{volume final}$$

#### 4.8 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

As qPCRs foram realizadas através da tecnologia de sondas Taqman, caracterizada pela clivagem de uma sonda específica durante a etapa de extensão da fita de DNA e liberação do corante repórter fluorescente detectado pelo equipamento de qPCR. As sondas Taqman eram compostas pelos corantes repórter 5' 6-carboxifluoresceína (FAM) e pelo corante quencher 3' 6-carboxi-tetrametil-rodamina (TAMRA). Os marcadores foram amplificados com iniciadores e sondas descritos por ALIZADEH et al. (2002), conforme descrito na Tabela 1 e sintetizados pela empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

#### **Tabela 1: Sequência de iniciadores e sondas utilizadas para a qPCR**

<b>Nome</b>	<b>Localização</b>	<b>Iniciadores e sondas (5' para 3')</b>	<b>Amplicon (pb)</b>
S01a	17q21.31	F: GGTACCGGGTCTCCACATGA R: GGGAAAGTCACTCACCCAAGG S: CTGGGCCAGAATCTTGGTCCTCACA	132
S01b		F: GTACCGGGTCTCCACCAGG	131
S02	Yp11.2	F: GCTTCTCTGGTTGGAGTCACG R: GCTTGCTGGCGGACCCT S: CTGCACCACCAAATCATCCCCGTG	210
S03	6q25.3	F: CTTTTGCTTTCTGTTTCTTAAGGGC R: TCAATCTTTGGGCAGGTTGAA S: CATACGTGCACAGGGTCCCCGAGT	226
S04a	9q34.2	F: CTGGTGCCCACAGTTACGCT R: AAGGATGCGTGACTGCTATGG S: TCCTGGCAGTGTGGTCCCTTCAGAA	168
S04b		R: AGGATGCGTGACTGCTCCTC	167
S05a	20	F: AAAGTAGACACGGCCAGACTTAGG R: CATCCCCACATACGAAAAGA S: CCCTGGACACTGAAAACAGGCAATCCT	
S05b	20q11.22	F: AGTTAAAGTAGACACGGCCTCCC	
S06	1p	F: CAGTCACCCCGTGAAGTCCT R: TTTCCCCATCTGCCTATTG S: CCCATCCATCTTCCCTACCAGACCAGG	
S07a	Xp11.21	F: TGGTATTGGCTTTAAAATACTGGG R: TGTACCCAAAACCTCAGCTGCA S: TCCTCACTTCTCCACCCCTAGTTAAACAG	107
S07b		F: GGTATTGGCTTTAAAATACTCAACC R: CAGCTGCAACAGTTATCAACGTT	93
S08a	1q24.1-24.3	F: CTGGATGCCTCACTGATCCA R: TGGGAAGGATGCATATGATCTG S: CTCCAACCCCCATTTCTGCCTG	138
S08b		F: GCTGGATGCCTCACTGATGTT	
S09a	17p11.2	F: GGGCACCCGTGTGAGTTTT R: TCAGCTTGTCTGCTTTCTGGAA S: TGGAGGATTTCTCCCCTGCTTCAGACAG	
S09b		R: CAGCTTGTCTGCTTTCTGCTG	

S10a	18	F: GCCACAAGAGACTCAG R: TGGCTTCCTTGAGGTGGAAT S: CAGTGTCCCCTCAAGTACTCCTTTGGA	
S10b		F: TTAGAGCCACAAGAGACAACCAG	
S11a	11q14.1	F: TAGGATTCAACCCTGGAAGC R: CCAGCATGCACCTGACTAACA S: CAAGGCTTCCTCAATTCTCCACCCTTCC	188
S11b		F: CCCTGGATCGCCGTGAA	178
GAPDH	12p13.31	F: GGACTGAGGCTCCCACCTTT R: GCATGGACTGTGGTCTGCAA S: CATCCAAGACTGGCTCCTCCCTGC	

F: iniciador direto; R: iniciador reverso; S: sonda

As reações de PCR foram realizadas com 10ul de DNA (na mesma concentração da quantificação do DNA das células Tregs), 600nM de iniciador direto, 600nM de iniciador reverso, 200nM de sonda e 10ul de master mix 2x (Promega GoTaq™ Probe qPCR Master Mix) para um volume final de 22,8ul. Em todas as reações foram utilizados água para biologia molecular, um pool de DNAs e o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como controle negativo, controle positivo para o marcador e controle positivo interno, respectivamente. A ciclagem da PCR foi definida conforme descrito na tabela 2 e a amplificação foi realizada pelo equipamento Applied Biosystems® 7500.

**Tabela 2: Ciclagem da qPCR**

Número de ciclos	Tempo	Temperatura
1	2 minutos	50°C
1	10 minutos	95°C
45	45 segundos	95°C
	60 segundos	60°C

#### 4.9 Triagem de marcadores por reação em cadeia da polimerase em tempo real

Para a etapa de triagem dos marcadores positivos do receptor, foram testados os marcadores S01a, S01b, S02, S03, S04a, S04b, S05a, S05b, S06, S07a, S07b, S08a, S08b, S09a, S09b, S10a, S10b, S11a, S11b, GAPDH no DNA do swab bucal, o qual, assim como o controle positivo, foram ajustados previamente para a mesma concentração encontrada no

DNA das Tregs.

#### 4.10 Detecção de microquimerismo por reação em cadeia da polimerase em tempo real

Após a triagem de marcadores, quando possível, um mínimo de três marcadores negativos no swab bucal e o GAPDH foram testados utilizando o DNA das Tregs extraídas a partir do sangue periférico.

#### 4.11 Quantificação do microquimerismo

Para quantificar a porcentagem de microquimerismo, os *threshold cycles* (Cts) encontrados nas reações de qPCR de todos os marcadores foram interpolados em uma curva de diluição de DNA para identificar a concentração relativa de DNA encontrada. A porcentagem de quimerismo em cada marcador foi determinada pela razão entre a concentração de DNA encontrada no GAPDH e a concentração de DNA encontrada no marcador testado. O resultado foi expresso como a porcentagem média de quimerismo encontrada nos marcadores testados.

#### 4.12 Análise estatística

Os dados obtidos nos testes foram analisados pelo programa GraphPrism 8.0.1. Foram realizados os Testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, considerando  $p > 0,05$  sem significância estatística,  $*p < 0,05$  e  $**p < 0,005$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 O conjunto de marcadores consegue diferenciar indivíduos

Para avaliarmos o quimerismo de células sanguíneas, desenvolvemos um teste baseado em qPCR que utiliza 19 polimorfismos bialélicos, conforme descrito anteriormente Alizadeh e colaboradores (2002). Para avaliar a capacidade desse conjunto de marcadores em diferenciar os indivíduos, foram realizadas reações de qPCR, em duplicata, com sangue periférico de 11 voluntários saudáveis. A partir da tabela 3 é possível observar que o conjunto de marcadores conseguiu diferenciar todos os voluntários, entretanto, os marcadores S01a, S05a e S11b foram positivos em todos os indivíduos testados. Além disso, também foi possível verificar a especificidade do marcador S02, presente no cromossomo Y. Apenas voluntários do sexo masculino foram positivos para esse marcador.

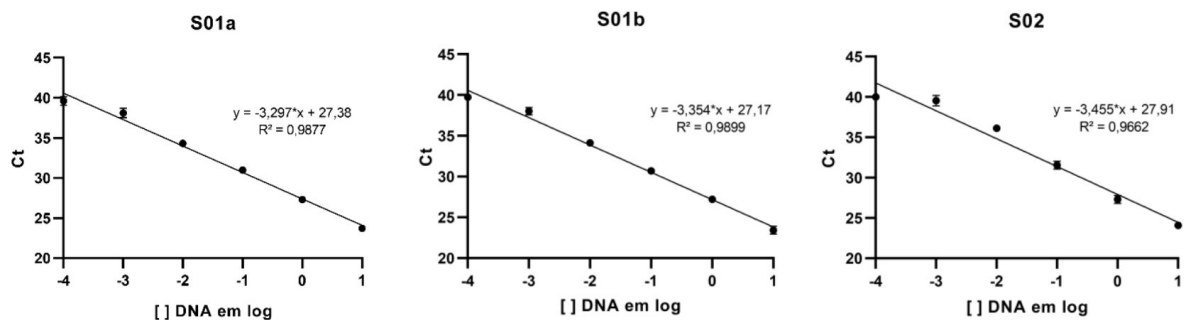
**Tabela 3:** Marcadores positivos em indivíduos voluntários

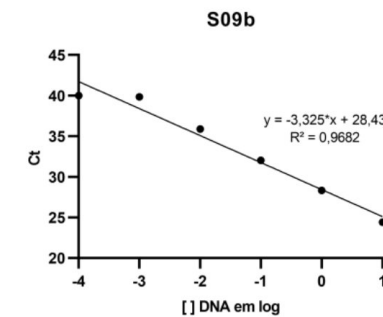
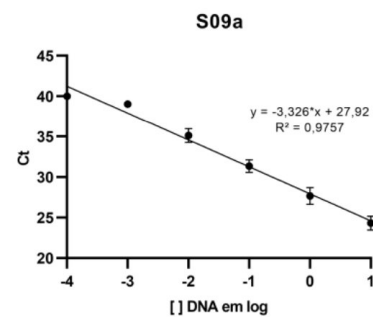
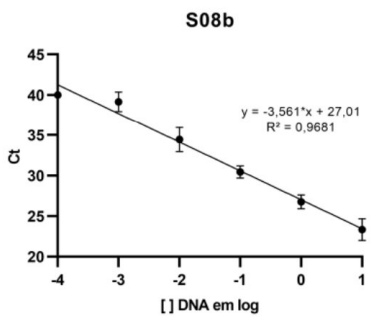
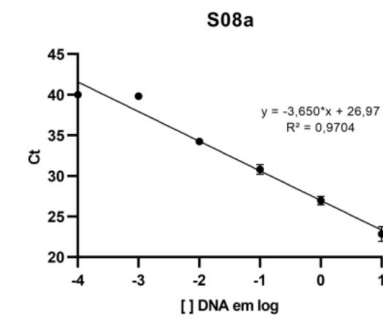
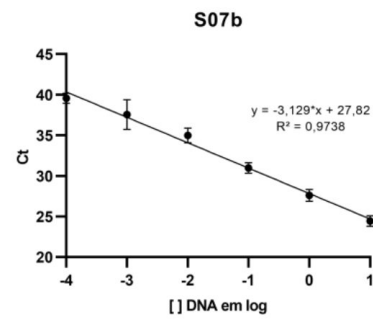
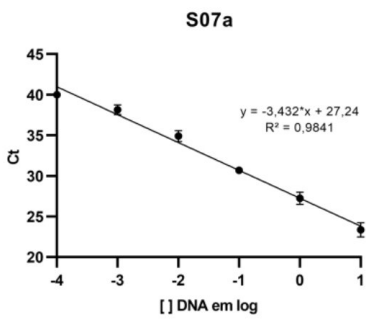
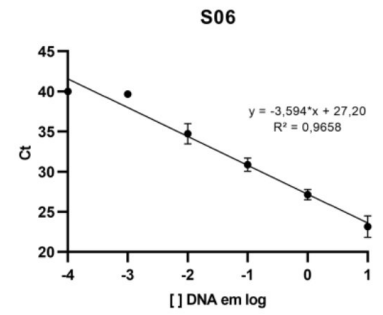
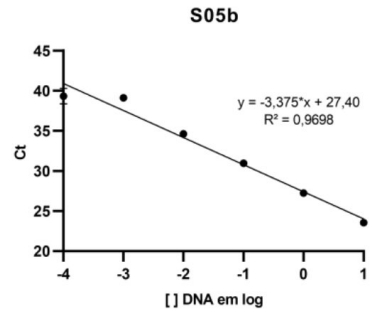
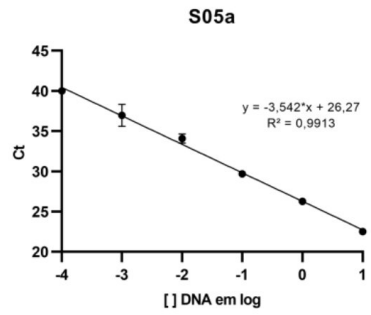
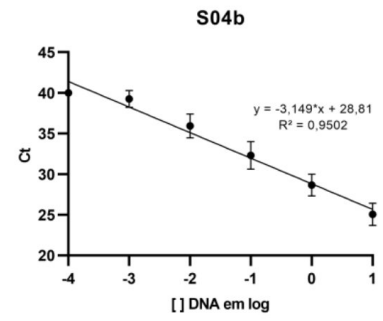
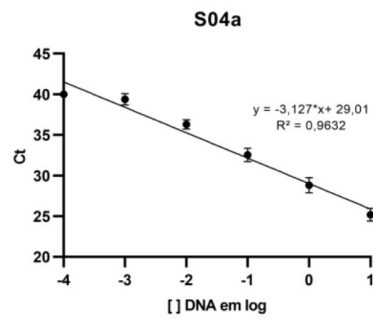
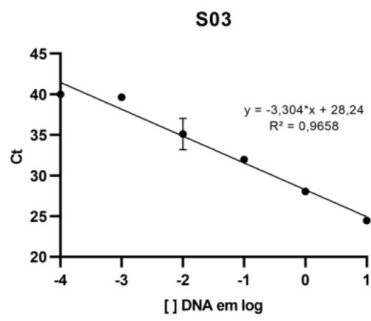
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
S01a	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
S01b	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
S02	□	□	□	□	□	■	□	□	■	■	□
S03	■	■	■	■	■	■	□	■	□	■	□
S04a	■	■	■	■	■	□	□	□	□	■	□
S04b	□	■	■	□	□	■	■	■	■	■	□
S05a	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
S05b	■	■	□	■	■	■	■	□	■	■	□
S06	■	■	□	■	□	□	■	□	■	□	■
S07a	■	■	■	■	■	□	■	■	□	□	■
S07b	■	■	□	■	■	■	■	□	■	■	■
S08a	■	□	■	□	■	■	■	■	■	■	■

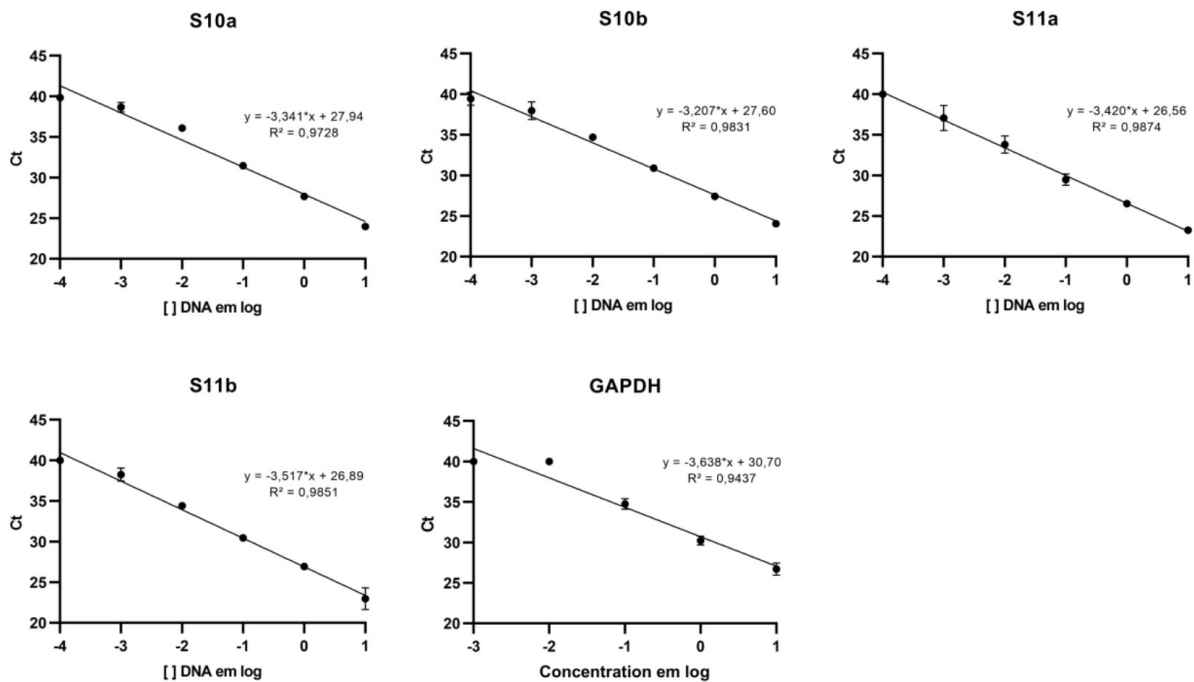
S08b											
S09a											
S09b											
S10a											
S10b											
S11a											
S11b											

## 5.2 Validação da qPCR

Para validar o teste padronizado, foram realizadas qPCRs em duplicata técnica e biológica com todos os marcadores. Com o DNA de cinco voluntários saudáveis na concentração de 10ng/ul, foram testadas seis diluições seriadas de amostras de DNA com água ultrapura. A partir disso, realizamos a correlação dos valores médios de Cts de cada diluição para todos os marcadores, até a diluição onde o marcador foi indetectável (Figura 5). Assim, foi possível determinar uma equação da reta para cada marcador, para que as eficiências das reações de qPCR fossem avaliadas pelo valor de *slope*. Segundo a literatura, uma reação com eficiência de 100% possui valor de *slope* de -3,32. Nossos resultados demonstraram um *slope* médio de -3,387 para todos os marcadores (Figura 5), indicando reações com alta eficiência e boa precisão para determinação da concentração de amostras por meio dessas curvas, apoiada pelos coeficientes de correlação ( $R^2$ ) obtidos, que variaram de 0,95 a 0,99. A sensibilidade e a linearidade dos primers encontradas, foram de 0,1ng/ul, ambas com variação de 0,1ng/ul a 0,001ng/ul (Figura 5), demonstrando limite de detecção e precisão satisfatórios.







**Figura 5: As reações de qPCR possuem resultados satisfatórios para a eficiência, sensibilidade e linearidade.** Representação gráfica das concentrações de 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001 e 0,0001 ng/ul de DNA em escala logarítmica e sua correlação com o Ct médio encontrado nas duplicatas de cada diluição. Todos os marcadores foram testados por qPCR (S01a, S01b, S02, S03, S04a, S04b, S05a, S05b, S06, S07a, S07b, S08a, S08b, S09a, S09b, S10a, S10b, S11a, S11b e GAPDH). Os valores de  $R^2$  e as equações da reta foram analisadas por regressão linear.

As eficiências de amplificação dos marcadores foram calculadas a partir dos valores de *slope*. A eficiência média foi de 0,97, com variação de 0,88 a 1,09. Esses resultados, apresentados detalhadamente na tabela 5, indicam boa eficiência de amplificação, reforçando a confiabilidade e precisão do teste.

**Tabela 4: Eficiência de amplificação**

Marcador	Eficiência
S01a	1,03
S01b	0,98
S02	0,95
S03	1,01
S04a	1,09

S04b	1,07
S05a	0,92
S05b	0,98
S06	0,90
S07a	0,95
S07b	0,98
S08a	0,88
S08b	0,91
S09a	1,00
S09b	1,00
S10a	0,99
S10b	1,05
S11a	0,96
S11b	0,92
GAPDH	0,88

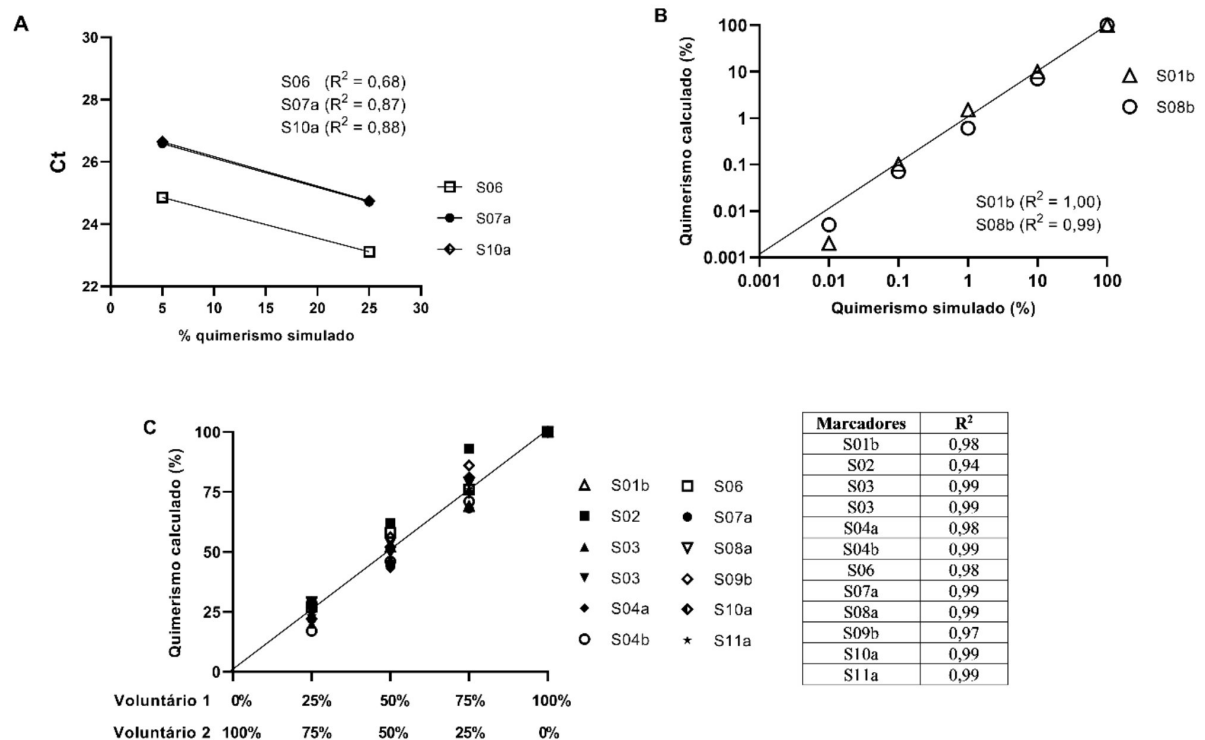
### 5.3 Simulação de quimerismo

Para avaliar a capacidade do teste em detectar a presença de quimerismo foram realizadas duas quimeras artificiais de sangue periférico com proporções de 5% e 25% para os marcadores S06, S07a e S10a. A correlação entre as quimeras e os valores de Ct está demonstrada na figura 6A. Todas as reações de qPCR detectaram a presença de quimerismo em todas as amostras testadas, com  $R^2$  variando de 0,68 a 0,88, uma diferença que pode atribuída à variação da eficiência no processo de extração de DNA.

Para simular a ocorrência de quimerismo, onde há a presença de duas células

geneticamente diferentes no sangue periférico, e avaliar a acurácia da quantificação, foram simuladas quimeras artificiais em concentrações de 10%, 1%, 0,1%, 0,01% e 0,001% de PBMCs de dois indivíduos distintos. Foi observado uma excelente correlação entre o quimerismo simulado e o quimerismo calculado para os marcadores S01b e S08b, com  $R^2$  de 1,00 e 0,99, respectivamente, além de uma capacidade de detecção de até 0,1% de quimerismo, conforme ilustrado na figura 6B.

Por fim, quimeras artificiais de DNA em frações de 25%, 50% e 75% também foram simuladas para os marcadores S01b, S02, S03, S04a, S04b, S06, S07a, S08a, S09b, S10a, S11a. A relação entre o quimerismo simulado e o quimerismo calculado foram satisfatórias, com  $R^2$  oscilando de 0,94 a 0,99, detalhado na figura 6C, ressaltando a acurácia e eficácia da qPCR em quantificar diferentes níveis de quimerismo.



**Figura 6: As reações de qPCRs são capazes de detectar quimerismos.** A. Associação do Ct das reações de qPCR dos marcadores S06, S07a e S10a com quimeras de sangue de 5% e 25% simuladas artificialmente. B. Quimeras de PBMC simuladas artificialmente de 10%, 1%, 0,1%, 0,01% e 0,001% testadas em dois marcadores informativos (S01b e S08b). C. Esquerda: Quimeras de DNA de 25%, 50% e 75% simuladas artificialmente, testadas em duplicata, em onze marcadores informativos (S01b, S02, S03, S04a, S04b, S06, S07a, S08a, S09b, S10a, S11a). C. Direita: Valores de  $R^2$ . Todos os valores de  $R^2$  foram analisados por regressão linear.

#### 5.4 Dados clínicos dos pacientes

Para aplicar nossa hipótese, foi realizada um recrutamento de participantes de uma coorte retrospectiva de pacientes transplantados renais e hepáticos. Dentre os pacientes renais, a mediana da idade foi de 53 anos e as principais causas de perda do enxerto foram glomerulonefrite crônica, causa desconhecida e doença renal policística autossômica dominante. O tempo médio pós transplante foi de 11 meses. 42% dos pacientes tiveram algum episódio de rejeição sendo a rejeição celular aguda como maioria dos casos. Em relação aos episódios de infecção, as mais prevalentes foram infecção por citomegalovírus (CMV) (72,7%) e infecção do trato urinário (36,3%).

A mediana de idade dos pacientes hepáticos foi de 62 anos, sendo a maioria indivíduos do sexo masculino. O principal motivo de perda da função hepática ocorreu por hepatite alcoólica, associada ou não ao carcinoma hepatocelular e à doença hepática gordurosa não alcoólica. O tempo médio de coleta das amostras após o transplante foi de 16 meses. Todos os casos de rejeição (20%) foram decorrentes de rejeição celular aguda e 33,3% dos pacientes tiveram algum episódio de infecção com causas variadas: CMV, herpes labial e genital, tuberculose, candidíase e pneumonia.

Na tabela 4 são apresentados detalhadamente os dados clínicos dos pacientes coletados.

**Tabela 5: Dados clínicos**

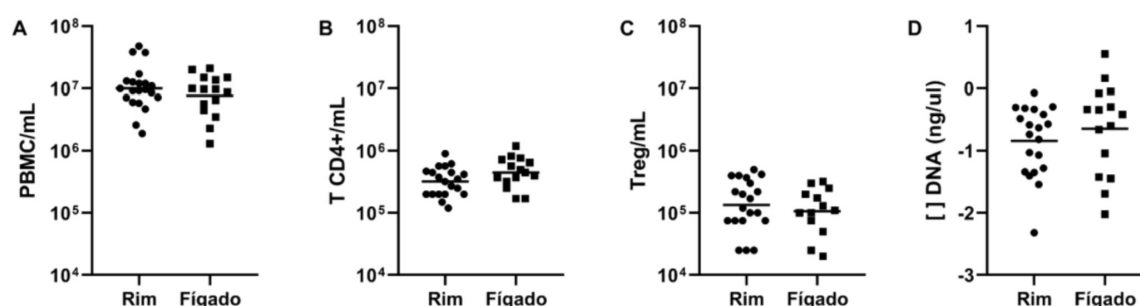
	<b>Renal (n = 21)</b>	<b>Hepático (n = 15)</b>
<b>Idade dos participantes (anos)</b>		
Média (SD)	50,95 (10,64)	60,93 (6,19)
Mediana (intervalo)	53 (38)	62 (24)
<b>Sexo, n (%)</b>		
Masculino	11 (52,4)	14 (93,4)
Feminino	10 (47,6)	1 (6,6)
<b>Gestação antes do transplante, n (%)</b>	9 (42,8)	1 (6,6)
<b>Doença de base, n (%)</b>		
Glomerulonefrite crônica	6 (28,7)	0
DRPAD	3 (14,4)	0
Glomeruloesclerose segmentar focal	1 (4,7)	0
Nefropatia por IgA	1 (4,7)	0
Diabetes tipo I + hipertensão	1 (4,7)	0
Displasia renal + hipertensão	1 (4,7)	0
Diabetes	1 (4,7)	0
Intoxicação por dietilenoglicol	1 (4,7)	0
Hipertensão	1 (4,7)	0

Desconhecida	5 (23,9)	1 (6,6)
Etanólica	0	6 (40)
Etanólica + CHC	0	3 (20)
Etanólica + DHGNA	0	2 (13)
Etanólica + Hepatite C + CHC	0	1 (6,6)
CHC + Hepatite C	0	1 (6,6)
DHGNA + diabetes	0	1 (6,6)
<b>Tempo pós transplante (meses)</b>		
Média (SD)	10,67 (5,32)	15,77 (7,37)
Mediana (intervalo)	10,30 (26,2)	15,3 (24,4)
<b>Número de mismatches HLA</b>		
Média (SD)	3,52 (1,57)	NSA
Mediana (intervalo)	4 (6)	NSA
<b>Rejeição, n (%)</b>		
Humoral aguda	1 (11,1)	0
Celular aguda	7 (77,8)	3 (100)
Celular crônica	1 (11,1)	0
<b>Imunossupressão de indução, n (%)</b>		
Timoglobulina + solumedrol	17 (80,9)	0
Basiliximabe + solumedrol	3 (14,3)	2 (13,3)
Solumedrol	1 (4,8)	13 (86,7)
<b>Imunossupressão de manutenção, n (%)</b>		
Micofenolato	1 (4,7)	0
Tacrolimus + sirolimus	3 (14,3)	0
Tacrolimus + sirolimus + prednisona	2 (9,5)	0
Tacrolimus	0	6 (40)
Tacrolimus + micofenolato + prednisona	15 (71,4)	8 (53,3)
Tacrolimus + everolimus	0	1 (6,6)
<b>Episódios de infecção, n (%)</b>		
CMV	8 (72,7)	1 (20)
Herpes labial	0	1 (20)
Herpes genital	1 (9,1)	1 (20)
Herpes Zóster	1 (9,1)	0
Infecção do trato urinário	4 (36,3)	0
Pneumonia	0	1 (20)
Tuberculose	0	1 (20)
Ferida operatória	1 (9,1)	0
Sepse	1 (9,1)	0
Candidíase	0	1 (20)

CHC: carcinoma hepatocelular; DRPAD: doença renal policística autossômica dominante; DHGNA: doença hepática gordurosa não alcoólica; CMV: citomegalovírus

### 5.5 Extração de DNA de células T reguladoras

Para realizar a análise de quimerismo, o DNA de Tregs foi extraído a partir de amostras de sangue periférico coletadas dos pacientes. As concentrações de PBMCs, células T CD4<sup>+</sup> e Tregs foram semelhantes em pacientes renais e hepáticos (Figuras 7 A, B e C). Conforme esperado, a medida em que a extração de cada tipo celular era realizada, a concentração celular reduzia. Após a extração de Tregs, o DNA dessas células foi extraído e obtivemos uma concentração média de 0,4 ng/ul, com mediana de 0,253ng/ul, sem diferença estatística entre os dois grupos (Figura 7D).



**Figura 7: Extração de DNA de células T reguladoras de transplantados renal e hepático.** A. Quantificação de PBMC/mL. B. Quantificação de células T CD4<sup>+</sup>/mL. C. Quantificação de células T reguladoras (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>)/mL. D. Concentração de DNA de células T reguladoras em escala logarítmica. Os valores da figura 7D foram analisados pelo Teste de Mann-Whitney ( $p > 0,05$ ).

### 5.6 Triagem de marcadores positivos

A frequência de marcadores positivos nas amostras de swab bucal dos pacientes variou de 36 a 97%, com exceção do marcador S05a, positivo em todos os pacientes testados (tabela 6). Todos os pacientes possuíam de 1 a 8 marcadores que poderiam ser informativos, isto é, marcadores negativos no receptor (amostras de swab bucal) que poderiam ser positivos no doador, com exceção de um paciente, positivo em todos os marcadores testados.

**Tabela 6: Frequência de marcadores positivos**

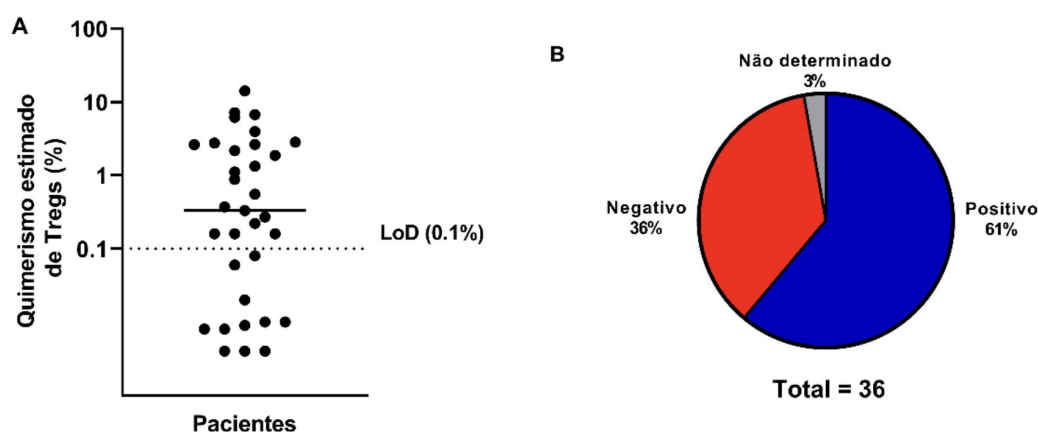
Marcador	Pacientes, n (%)
S01a	30 (83)
S01b	35 (97)

S02	25 (69)
S03	13 (36)
S04a	29 (81)
S04b	29 (81)
S05a	36 (100)
S05b	27 (75)
S06	28 (78)
S07a	23 (64)
S07b	24 (67)
S08a	33 (92)
S08b	31 (86)
S09a	34 (94)
S09b	25 (69)
S10a	32 (89)
S10b	31 (86)
S11a	22 (61)
S11b	29 (81)

### 5.7 Análise de quimerismo

Realizamos a análise de quimerismo no DNA extraído de células Tregs através de reações de qPCR em 3 marcadores negativos no swab bucal. Dentre os 35 pacientes com potenciais marcadores informativos (i.e., negativo no swab bucal), 33 pacientes

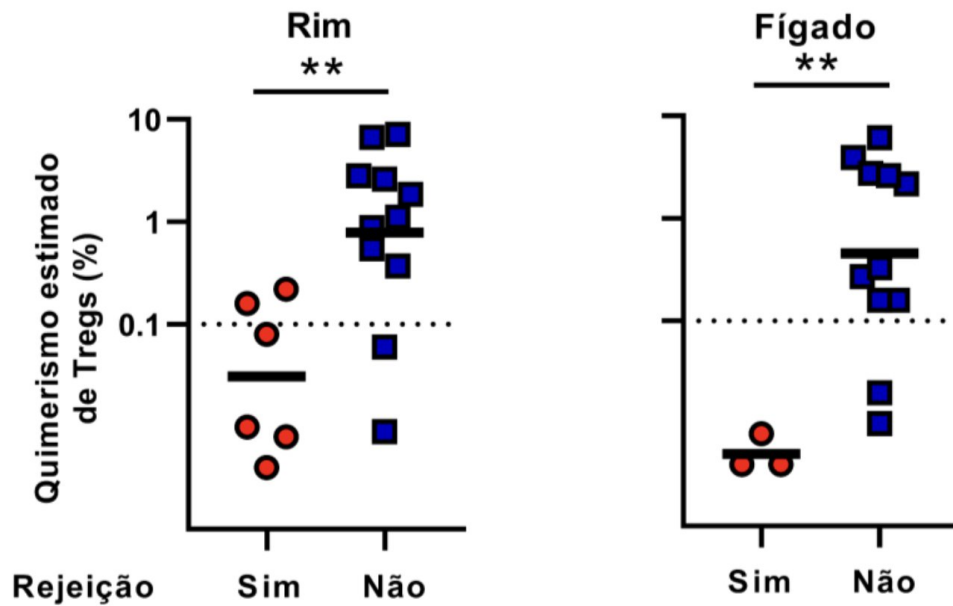
apresentaram marcadores informativos, isto é, positivos apenas no sangue periférico. 17 pacientes possuíam 1 marcador informativo, 14 pacientes possuíam 2 marcadores informativos e um paciente tinha 3 marcadores informativos. Considerando nosso limite de detecção de 0,1%, identificamos quimerismo de Tregs em 61% dos pacientes, variando de um a três marcadores detectáveis apenas no DNA de Tregs do sangue periférico e ausentes no swab bucal. Por outro lado, 31% dos pacientes foram considerados negativos, seja pela ausência de marcadores positivos no sangue periférico ou por estarem abaixo do limite de detecção. Além disso, não foi possível avaliar a presença de quimerismo de Tregs em 11% dos pacientes devido à ausência de marcadores com potencialmente informativos. Esses resultados estão detalhados nas figuras 8A e B.



**Figura 8: Quimerismo de células T reguladoras em transplantados renais e hepáticos.** A. Quantificação de quimerismo de Tregs (n = 33). A linha tracejada indica o limite de detecção do teste. Quantificações de quimerismo de Tregs abaixo de 0,1% foram consideradas negativas. B. Representação gráfica de pacientes positivos, negativos e indeterminados para o quimerismo de Tregs.

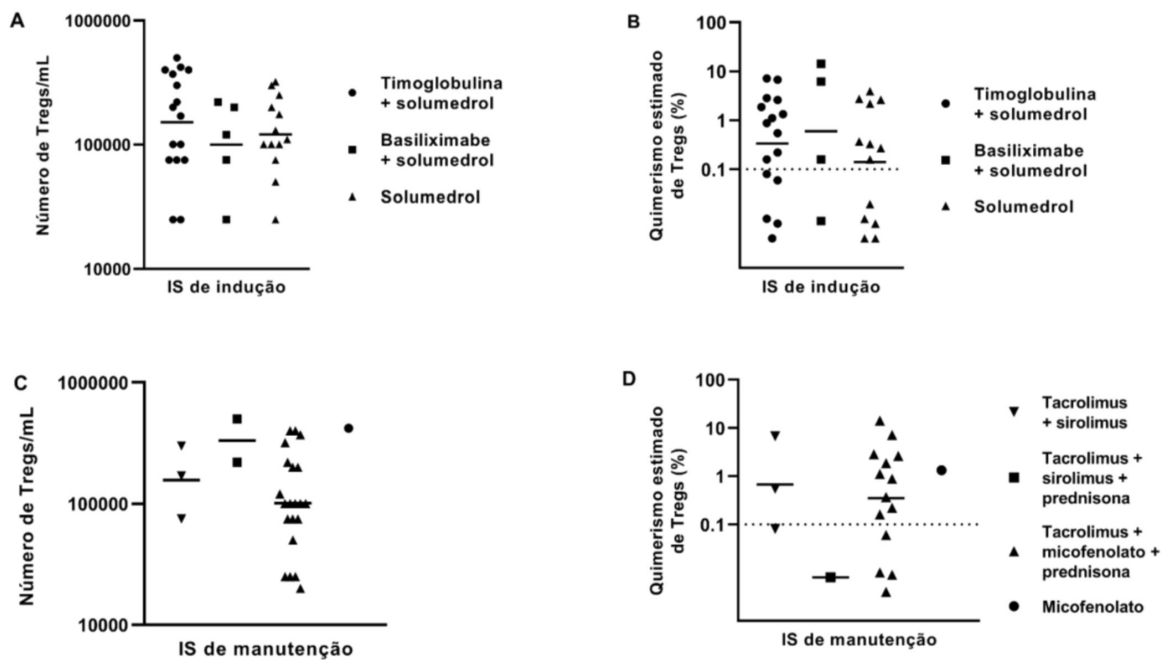
Avaliamos a associação entre os dados de quimerismo de Tregs e a ocorrência de episódios de rejeição. Observamos que pacientes transplantados sem episódios de rejeição apresentam níveis maiores de quimerismo de Tregs que pacientes com episódios de rejeição (Figura 9). Enquanto pacientes transplantados renais com episódios de rejeição apresentou níveis médios de 0,08%, pacientes sem rejeição apresentaram níveis de quimerismo de 2,01% (Figura 9). Perfil semelhante foi observado para transplantados hepáticos que apresentaram quimerismo de 0,005% e 1,55% para pacientes com e sem rejeição, respectivamente. Apenas 22,2% dos pacientes com histórico de rejeição apresentavam quimerismo de Tregs, enquanto essa porcentagem foi de 81,8% nos pacientes sem episódios de rejeição. Além disso, a presença de quimerismo esteve associada a um aumento de quase 16 vezes de chances de não ter algum episódio de rejeição de forma geral, considerando

transplante de rim e fígado, calculada pelo Teste Exato de Fisher (Odds ratio = 15,75,  $p = 0,003$ ).



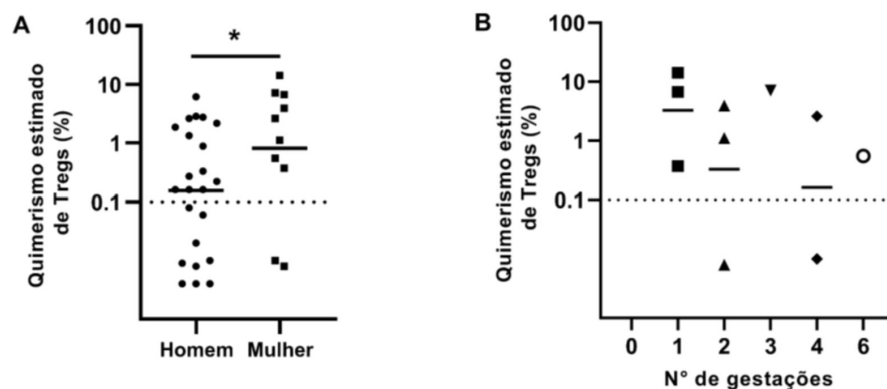
**Figura 9: A presença de quimerismo de Tregs aumenta em quase 16 vezes as chances de não ter episódios de rejeição.** A. Quantificação de quimerismo de Tregs em transplantados renais com e sem histórico de rejeição ( $n = 6$  e  $11$ , respectivamente) ( $p = 0,007$ ). B. Quantificação de quimerismo de Tregs em transplantados hepáticos com e sem histórico de rejeição ( $n = 3$  e  $11$ , respectivamente) ( $p = 0,005$ ). Os dados foram analisados pelo Teste de Mann-Whitney.

Para avaliar a influência do tratamento com o número de Tregs e os níveis de quimerismo, estratificamos esses dados com os protocolos de imunossupressão de indução (Figuras 10 A e B) e manutenção (Figuras 10 C e D) de cada paciente. Não foi observada nenhuma associação entre o regime de imunossupressão adotado com o número de Tregs e os níveis de quimerismo de Tregs, demonstrando que os tratamentos adotados aos pacientes estudados não são fatores determinantes no número de Tregs, bem como nos níveis de quimerismo de Tregs.



**Figura 10: A imunossupressão não interfere no número de Tregs e nos níveis de quimerismo de Tregs.** A. Associação entre o número de Tregs e a imunossupressão de indução. B. Associação entre os níveis de quimerismo de Tregs e a imunossupressão de indução. C. Associação entre o número de Tregs e a imunossupressão de manutenção. D. Associação entre os níveis de quimerismo de Tregs e a imunossupressão de manutenção. A linha tracejada das figuras A e D indicam o limite de detecção do teste. Os dados foram analisados através do Teste de Kruskal-Wallis.

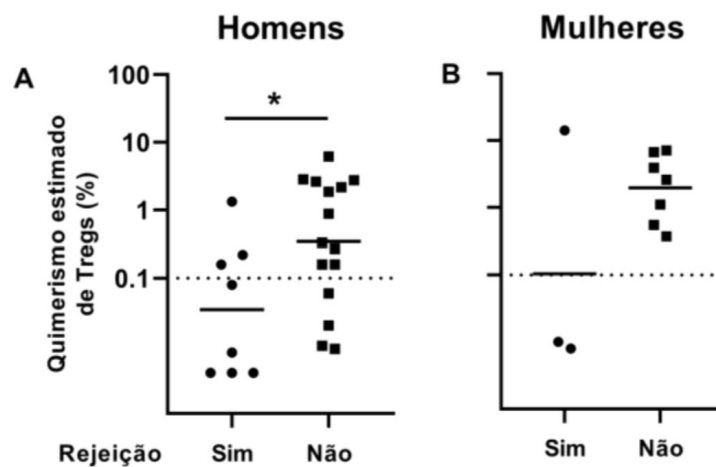
Baseado na premissa da presença de quimerismo fetal em mulheres com histórico de gestação, avaliamos os níveis de quimerismo de Tregs entre homens e mulheres (Figura 11A). Observamos que as mulheres apresentam níveis mais elevados de quimerismo de Tregs, independentemente da quantidade de gestações, conforme detalhado na figura 11B. Contudo, a ausência de quimerismo na única mulher sem histórico de gestação presente em nossa coorte de mulheres sugere uma possível correlação com a gestação, mas o tamanho limitado do número de participantes não permite estabelecer uma conclusão.



**Figura 11: Mulheres possuem níveis de quimerismo mais elevados.** A. Associação entre os níveis de quimerismo com pacientes do sexo masculino (n = 25) e feminino (n = 11) (p = 0,05). B. Associação entre os níveis de quimerismo de Tregs com o número de gestações. As linhas tracejadas representam o limite de

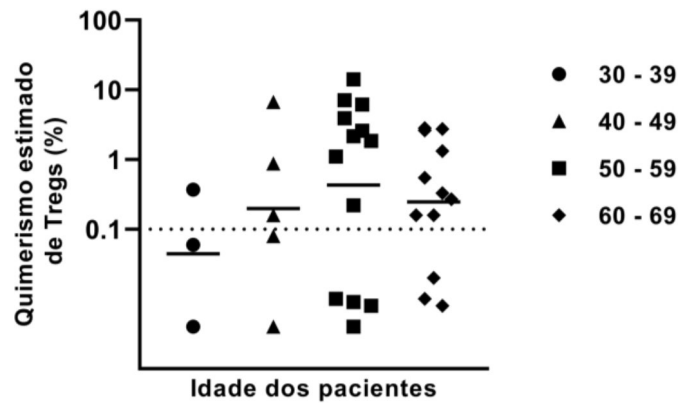
detecção do teste. Os dados foram analisados através dos Testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis.

Curiosamente, comparando presença e ausência de histórico de rejeição com os níveis de quimerismo em homens e mulheres, foi encontrada diferença estatística apenas no grupo de indivíduos do sexo masculino (Figura 12), provavelmente pelo número reduzido de mulheres com rejeição em nossa coorte. Entretanto, ao realizar o Teste Exato de Fisher, foi observado que a presença de quimerismo de Tregs em mulheres aumenta em 14 vezes as chances de não ter episódios de rejeição (Odds ratio = 14), enquanto em indivíduos do sexo masculino essa chance é de 4 vezes (Odds ratio = 4,4).



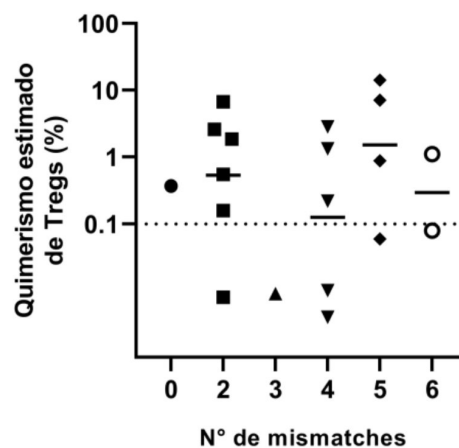
**Figura 12: Associação entre quimerismo e episódios de rejeição em homens e mulheres.** A. Quantificação de quimerismo de Tregs em homens com e sem histórico de rejeição (n = 7 e 15, respectivamente) (p = 0,01). B. Quantificação de quimerismo de Tregs em mulheres com e sem histórico de rejeição (n = 3 e 7, respectivamente). Os dados foram analisados através do Teste de Mann-Whitney.

Sabendo do impacto da idade dos indivíduos no número de células do sistema imune, avaliamos a influência da senescência nos níveis de quimerismo de Tregs (Figura 13), mas não foi encontrada nenhuma associação, demonstrando que a idade do receptor não é um fator determinante para a variação nos níveis de quimerismo de Tregs.



**Figura 13: Os níveis de quimerismo não estão relacionados com a idade.** Estratificação dos níveis de quimerismo de Tregs pela idade dos pacientes. Os dados foram analisados através do Teste de Kruskal-Wallis.

Baseado no impacto do número de mismatches com o risco de episódios de rejeição em transplantados renais e na associação entre quimerismo de Tregs e ausência de episódios de rejeição observada neste trabalho, investigamos a relação entre o número de incompatibilidades HLA nos loci HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1 com os níveis de quimerismo de Tregs (Figura 14) em transplantados renais. No entanto, não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa, sugerindo que estes fatores são independentes na predição do risco de rejeição após o transplante.



**Figura 14: Os níveis de quimerismo não estão relacionados com o número de mismatches.** Análise entre a correlação dos níveis de quimerismo de Tregs com o número de mismatches nos loci HLA-A, HLA-B e HLA-DRB. A linha tracejada indica o limite de detecção do teste. Os dados foram analisados através do Teste de Kruskal-Wallis.

## 6 DISCUSSÃO

A análise de quimerismo é uma técnica importante para avaliar a evolução em transplantes de medula óssea e é baseada na detecção e quantificação da proporção de células alogênicas em relação ao número de células sanguíneas do receptor. Para isso, é necessário a identificação de marcadores informativos, isto é, marcadores polimórficos negativos no receptor e positivos no doador (BLOUIN *et al.*, 2021).

A detecção de quimerismo pode ser realizada pela análise de cariótipo ou hibridização *in situ* fluorescente (FISH), mas tais técnicas apresentam limitação técnica e com frequência limitam-se apenas aos marcadores sexuais. Dentre os métodos moleculares, a detecção de quimerismo pode ser realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), número variável de repetições em tandem (VNTR) ou testes de repetições em tandem curtas (STR) seguida de análise dos fragmentos. Atualmente, a análise por STR é o padrão ouro, mas sua sensibilidade subótima de 1-5% limita a detecção de baixos níveis de quimerismo. Técnicas como a qPCR, PCR digital de gotículas (ddPCR) e o sequenciamento de nova geração (NGS), superaram essa limitação, com sensibilidade de até 0,01%, mas do ponto de vista prático o NGS e a ddPCR são onerosos, dificultando a aplicação na rotina laboratorial (BLOUIN *et al.*, 2021).

Baseado nisso, a qPCR com a tecnologia TaqMan foi escolhida como metodologia para análise de quimerismo, uma técnica com boa sensibilidade, econômica e rápida. O princípio da qPCR é baseado no uso de sondas fluorescentes específicas ao alvo, que, quando intactas, o corante repórter (FAM) emite uma fluorescência que é rapidamente absorvida pelo supressor (TAMRA). Quando ocorre a hibridização da sonda ao alvo, ela é clivada durante a amplificação pela Taq polimerase e a fluorescência é detectada em tempo real a cada ciclo de amplificação, permitindo a avaliação quantitativa através do valor de Ct, que é inversamente proporcional à quantidade de DNA na amostra (ANDRIKOVICS *et al.*, 2019; BLOUIN *et al.*, 2021).

Descritos anteriormente por Alizadeh e colaboradores (2002), os marcadores que utilizamos foram polimorfismos bialélicos, de inserção e deleção (InDel), localizados cromossomicamente distantes, presentes em 9 cromossomos diferentes, conforme sugere a literatura (ANDRIKOVICS *et al.*, 2019; BLOUIN *et al.*, 2021). Recomenda-se também que o número de marcadores InDel seja superior a 16 marcadores para que a informatividade seja maior que 95%, e nosso teste utilizou 19 marcadores, alcançando uma informatividade

de 89% (ANDRIKOVICS *et al.*, 2019). A análise InDel possui uma sensibilidade que varia de 0,1 a 0,01%, corroborando com nossos achados de sensibilidade e limite de detecção (LoD) de 0,1% (BLOUIN *et al.*, 2021).

O marcador AMELY, é uma variante ligada ao cromossomo Y do gene da amelogenina e a diferença encontrada entre essa variante e a variante ligada ao X é uma deleção de 6 pares de base. Esse marcador possui aplicabilidade limitada a receptores do sexo feminino e doadores do sexo masculino. Nosso marcador do gene AMELY, S02, demonstrou especificidade ao cromossomo Y, visto que ele foi detectado apenas em indivíduos do sexo masculino (ANDRIKOVICS *et al.*, 2019).

Além de marcadores polimórficos, a amostra do receptor pré transplante deve ser incluída para determinar possíveis marcadores informativos (BLOUIN *et al.*, 2021), mas como isso não foi possível para nossos pacientes, analisamos o DNA de células do epitélio bucal para identificar marcadores potencialmente informativos.

Para a análise de quimerismo de Tregs foi utilizado sangue periférico. As Tregs humanas, de maneira geral, são classificadas fenotipicamente como  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$  (BAROJA-MAZO *et al.*, 2016). A extração de células  $TCD4^+$  foi realizada por seleção negativa, uma metodologia interessante quando a proporção de células indesejadas é maior que a proporção da célula alvo, enquanto a seleção de células  $CD25^+$  foi baseada na seleção positiva, que além de permitir uma rápida recuperação, possui pureza elevada (BLOUIN *et al.*, 2021).

Para minimizar o risco de resultados falso negativos em análises de quimerismo, recomenda-se utilizar mais de um marcador informativo na qPCR. Em nosso grupo de pacientes, apenas um possuía um único marcador potencialmente informativo, entretanto, como esse marcador foi positivo no sangue periférico a possibilidade de resultados falso negativos foi reduzida (ANDRIKOVICS *et al.*, 2019).

Neste trabalho, padronizamos a qPCR para análise quantitativa de quimerismo de Tregs alogênicas e identificamos 61% dos pacientes com quimerismo superior a 0,1%. Ao estratificar esses dados entre transplantados de rim e fígado com e sem histórico de rejeição observamos a presença de quimerismo de Tregs alogênicas aumentava em quase 16 vezes as chances de não desenvolver algum episódio de rejeição, demonstrando um possível marcador para prever a evolução do aloenxerto. Esse resultado foi concordante com um trabalho realizado na Universidade do Cairo em 2019, que identificou que altos níveis de microquimerismo de células do doador estavam associados à melhor função do enxerto um

mês após o transplante em receptores de rim (EL-ANSARY *et al.*, 2020). Entretanto, embora outros trabalhos tenham encontrado microquimerismo de células do doador no sangue periférico de pacientes transplantados com órgãos sólidos, sua relação com a TO e o impacto clínico aos pacientes foi controversa entre os estudos, discrepância essa, talvez explicada pela busca de quimerismo de tipos celulares inespecíficos (EL-ANSARY *et al.*, 2020).

Em nossa coorte, os níveis de quimerismo de Tregs foram mais elevados em mulheres e as chances de não desenvolver algum episódio de rejeição foi de 14 vezes, enquanto em homens essas chances foram de quase 4,5 vezes. Entretanto, como havia poucas mulheres com episódio de rejeição em nossa coorte, os testes estatísticos podem ter sofrido vieses nesse grupo. Embora não tenha sido encontrada associação com o número de gestações, a presença do quimerismo de Tregs em 80% das mulheres com histórico de gestação e a ausência de quimerismo na única mulher sem histórico de gestação ou aborto nos faz pensar que o fenômeno da gestação em tolerar o que não é próprio possa ter aumentado a capacidade em tolerar outros antígenos estranhos persistentes, entretanto, um número maior de participantes do sexo feminino e testes adicionais seriam necessários para explorar essa hipótese.

Curiosamente, a incompatibilidade HLA, considerada como fator de risco para a rejeição no transplante renal, não foi associada à presença ou ausência de quimerismo, tampouco aos níveis de quimerismo encontrados nesses pacientes.

Sabemos que a presença de Tregs alogênicas pode não ser o único regulador imunológico na manutenção do aloenxerto. Em certos ambientes, macrófagos M2 também podem exercer um papel supressor através da secreção de citocinas anti-inflamatórias, como TGF- $\beta$  e IL-10, além de células dendríticas imaturas com perfil tolerogênico, que promovem a expansão de Tregs, ajudando assim na manutenção da tolerância periférica. Os mecanismos pelos quais certos pacientes possuem uma proporção mais elevada de Tregs alogênicas e como elas se mantêm, ainda precisam ser elucidados (BAROJA-MAZO *et al.*, 2016).

## 7 CONCLUSÃO

Alcançar a tolerância ao enxerto sem depender do uso de imunossupressores é o principal objetivo no campo dos transplantes. Portanto, a identificação de marcadores e dos mecanismos imunológicos inerentes à tolerância operacional são cruciais para a retirada segura desses medicamentos. Neste estudo, foi demonstrado pela primeira vez, a presença de quimerismo de células Tregs alogênicas em transplantados renais e hepáticos. Essa descoberta, está fortemente associada à menor ocorrência de rejeição ao enxerto, sendo um possível preditor para se identificar pacientes atingindo tolerância operacional. Esse efeito parece ser independente do sexo, pois se manteve tanto para homens quanto para mulheres. Esses achados abrem portas para novos estudos sobre a compreensão dos estímulos imunológicos que mantêm a presença dessas células no sangue periférico de receptores de rim e fígado.

## REFERÊNCIAS

ALIZADEH, Mehdi et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 99, n. 12, p. 4618-4625, 2002.

ANDRIKOVICS, Hajnalka et al. Current trends in applications of circulatory microchimerism detection in transplantation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4450, 2019.

ASHTON-CHESS, Joanna et al. Spontaneous operational tolerance after immunosuppressive drug withdrawal in clinical renal allotransplantation. **Transplantation**, v. 84, n. 10, p. 1215-1219, 2007.

BARKER, Clyde F.; MARKMANN, James F. Historical overview of transplantation. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 4, p. a014977, 2013.

BAROJA-MAZO, Alberto et al. Tolerance in liver transplantation: Biomarkers and clinical relevance. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 34, p. 7676, 2016.

BLOUIN, Amanda G. et al. A practical guide to chimerism analysis: Review of the literature and testing practices worldwide. **Human immunology**, v. 82, n. 11, p. 838-849, 2021.

BONTHA, Sai Vineela et al. Messengers of tolerance. **Human Immunology**, v. 79, n. 5, p. 362-372, 2018.

CALLEMEYN, Jasper et al. Allorecognition and the spectrum of kidney transplant rejection. **Kidney International**, v. 101, n. 4, p. 692-710, 2022.

COZZI, Emanuele; COLPO, Anna; DE SILVESTRO, Giustina. The mechanisms of rejection in solid organ transplantation. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 56, n. 4, p. 498-505, 2017.

CVETKOVSKI, Filip; HEXHAM, J. Mark; BERGLUND, Erik. Strategies for liver transplantation tolerance. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 5, p. 2253, 2021.

DAI, Helong et al. Transplant tolerance induction: insights from the liver. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1044, 2020.

DANGOOR, Joseph Yoav et al. Transplantation: a brief history. **Experimental and Clinical Transplantation: Official Journal of the Middle East Society for Organ Transplantation**, v. 13, n. 1, p. 1-5, 2014.

DUNETON, Charlotte; WINTERBERG, Pamela D.; FORD, Mandy L. Activation and regulation of alloreactive T cell immunity in solid organ transplantation. **Nature Reviews Nephrology**, v. 18, n. 10, p. 663-676, 2022.

ELLIAS, Samia D. et al. Cell-mediated therapies to facilitate operational tolerance in liver transplantation. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 8, p. 4016, 2021.

EL-ANSARY, Mervat et al. Donor cell microchimerism in kidney transplantation: Implications for graft function. **International Journal of Immunogenetics**, v. 47, n. 6, p. 494- 500, 2020.

FABRE, John. The birth of transplant immunology. **Transplantation**, v. 104, n. 5, p. 902-903, 2020.

GAMMILL, Hilary S.; NELSON, J. Lee. Naturally acquired microchimerism. **The International journal of developmental biology**, v. 54, n. 2-3, p. 531, 2010.

HATZINGER, M. et al. Die Geschichte der Nierentransplantation. **Der Urologe**, v. 55, n. 10, p. 1353-1359, 2016.

JUNEJA, Tanya et al. Utilization of Treg cells in solid organ transplantation. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 746889, 2022.

KAWAI, Tatsuo et al. CD154 blockade for induction of mixed chimerism and prolonged renal allograft survival in nonhuman primates. **American Journal of Transplantation**, v. 4, n. 9, p. 1391-1398, 2004.

KWON, Yeongbeen et al. Expansion of CD45RA– FOXP3+ regulatory T cells is associated with immune tolerance in patients with combined kidney and bone marrow transplantation. **Clinical & Translational Immunology**, v. 10, n. 8, p. e1325, 2021.

LEE, Brian T.; FIEL, M. Isabel; SCHIANO, Thomas D. Antibody-mediated rejection of the liver allograft: An update and a clinico-pathological perspective. **Journal of Hepatology**, v. 75, n. 5, p. 1203-1216, 2021.

LEVENTHAL, Joseph R.; ILDSTAD, Suzanne T. Tolerance induction in HLA disparate living donor kidney transplantation by facilitating cell-enriched donor stem cell Infusion: the importance of durable chimerism. **Human Immunology**, v. 79, n. 5, p. 272-276, 2018.

LINDEN, Peter K. History of solid organ transplantation and organ donation. **Critical care clinics**, v. 25, n. 1, p. 165-184, 2009.

MARTINEZ, Olivia M.; ROSEN, Hugo R. Basic concepts in transplant immunology. **Liver transplantation**, v. 11, n. 4, p. 370-381, 2005.

MATHEW, James M. et al. A phase I clinical trial with ex vivo expanded recipient regulatory T cells in living donor kidney transplants. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 7428, 2018.

MEHRA, N. K.; BARANWAL, A. K. Clinical and immunological relevance of antibodies in solid organ transplantation. **International journal of immunogenetics**, v. 43, n. 6, p. 351-368, 2016.

MEIRELLES JÚNIOR, Roberto Ferreira et al. Liver transplantation: history, outcomes and perspectives. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, p. 149-152, 2015.

MESSNER, Franka et al. Chimerism, transplant tolerance, and beyond. **Transplantation**,

v. 103, n. 8, p. 1556-1567, 2019.

MORRIS, Heather et al. Tracking donor-reactive T cells: Evidence for clonal deletion in tolerant kidney transplant patients. **Science translational medicine**, v. 7, n. 272, p. 272ra10-272ra10, 2015.

RONCA, Vincenzo et al. The immunological basis of liver allograft rejection. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 2155, 2020.

SCANDLING, John D. et al. Induced immune tolerance for kidney transplantation. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 14, p. 1359-1360, 2011.

SHARMA, Sonal; SANER, Fuat H.; BEZINOVER, Dmitri. A brief history of liver transplantation and transplant anesthesia. **BMC anesthesiology**, v. 22, n. 1, p. 1-12, 2022.

SIU, Jacqueline HY et al. T cell allorecognition pathways in solid organ transplantation. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2548, 2018.

TAMARGO, Christina L.; KANT, Sam. Pathophysiology of Rejection in Kidney Transplantation. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 12, p. 4130, 2023.

TAN, Siang Yong; MERCHANT, Jason. Joseph Murray (1919–2012): First transplant surgeon. **Singapore medical journal**, v. 60, n. 4, p. 162, 2019.

TERASAKI, Paul. Jean Dausset (1916–2009). **American Journal of Transplantation**, v. 9, n. 10, p. 2441-2442, 2009.

## ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo das alterações do sistema imunológico após o transplante de órgãos sólidos.

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Adultos)

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Desde logo fica garantido o sigilo das informações que iremos coletar de você. Quando apresentarmos os resultados dessa pesquisa, garantimos que sua identidade não será relevada. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. Salientamos que sua participação (ou não-participação) nesse projeto não poderá acarretar em qualquer prejuízo seja para você, seja financeiro ou qualquer outro tipo de prejuízo. Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, mesmo se tiver concordado previamente. Solicitamos que caso sinta-se prejudicado de alguma forma, tenha alguma dúvida ética ou deseje qualquer informação extra, comunique-se à equipe do projeto ou ao CEP (telefones abaixo).

#### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

**Título do Projeto:** Estudo das alterações do sistema imunológico em transplante de órgãos sólidos.

**Pesquisador Responsável:** Cristiano Xavier Lima

#### Endereço e telefone do responsável pelo estudo

- Av. do Contorno, 9530
- Telefone: 31 992963578 ou 31 35147000

#### Endereço e telefone institucional do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Hospital Felício Rocho:

- Av. do Contorno, 9530 Bairro Barro Preto, Belo Horizonte, MG
- TeleFax: (31) 3514 7000

O objetivo desse estudo é buscar um melhor entendimento sobre a forma como o sistema imunológico do corpo humano responde à ao transplante de órgãos e ao uso de medicamentos imunossupressores. Os medicamentos para evitar a rejeição do órgão transplantado alteram o sistema imunológico do paciente. Estas alterações, além de proteger contra a rejeição podem mudar a forma como o organismo atua na defesa contra infecções. Os pacientes transplantados em uso de medicamentos imunossupressores apresentam maior risco de infecções do que o paciente não transplantado. Sabe-se pouco sobre a forma como o sistema de defesa do corpo humano (sistema imunológico) do paciente transplantado responde à infecção. O objetivo desse estudo é investigar como o sistema imunológico do paciente transplantado reage ao uso de medicamentos imunossupressores e como podemos evitar a rejeição sem aumentar o risco da infecção. Assim, pretendemos recrutar voluntários saudáveis e pacientes em lista de espera para transplante de fígado ou rim, adultos para participarem do estudo.

Se você aceitar participar desse estudo, vamos colher até 60 mL de sangue antes do seu transplante, 30 dias após o transplante, para a realização de exames e testes de laboratório para verificar como seu organismo está lidando com os medicamentos imunossupressores. A coleta do sangue será realizada usando tubos pequenos através de uma punção na veia do membro superior da sua preferência durante a coleta dos exames pré transplantes de rotina. Dependendo de como você evoluir, poderemos te convidar para coletas futuras entre 1-6 meses em caso de rejeição ou infecção. É importante lembrar que a coleta de sangue pode causar desconforto e hematoma no local de introdução da agulha. Em raros casos, algumas pessoas desmaiam por verem o seu próprio sangue. Seu sangue será utilizado para os exames e suas células poderão ser congeladas para estudos posteriores com novas tecnologias. Também pedimos autorização para avaliar sua ficha médica a fim de caracterizar seu caso. Informamos que sua participação neste estudo não envolve qualquer remuneração.

1/2

Rubrica participante \_\_\_\_\_

Rubrica pesquisado \_\_\_\_\_

Estudo das alterações do sistema imunológico após o transplante de órgãos sólidos.

◆ **CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO**

Eu, \_\_\_\_\_, idade\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo "Estudo das alterações do sistema imunológico após o transplante de órgãos sólidos." como voluntário. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador \_\_\_\_\_ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido o sigilo das informações e que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Nome: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

◆ Nome e Assinatura do pesquisador:

2/2

Rubrica participante \_\_\_\_\_

Rubrica pesquisado \_\_\_\_\_