



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Greiciane Maria da Silva Florim

**Identificação de Biomarcadores Moleculares  
em Rins de Doadores de Critério Estendido**

São José do Rio Preto  
2019

Greiciane Maria da Silva Florim

**Identificação de Biomarcadores Moleculares em  
Rins de Doadores de Critério Estendido**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina de São José do Rio Preto  
para obtenção do Título de Doutor no  
Curso de Pós-graduação em Ciências  
da Saúde, Eixo Temático: Medicina e  
Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Mario Abbud Filho

Coorientadora: Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Heloisa Cristina Caldas

São José do Rio Preto

2019

Florim, Greiciane Maria da Silva

Identificação de Biomarcadores Moleculares em Rins de Doadores  
de Critério Estendido/ Greiciane Maria da Silva Florim

São José do Rio Preto, 2019

50 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto  
– FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Mario Abbud Filho

1. Transplante renal; 2. Biomarcadores; 3. Doador de critério  
estendido; 4. Doença renal crônica.

Greiciane Maria da Silva Florim

**Identificação de Biomarcadores Moleculares  
em Rins de Doadores de Critério Estendido**

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Mario Abbud Filho

2º Examinador: \_\_\_\_\_

3º Examinador: \_\_\_\_\_

4º Examinador: \_\_\_\_\_

5º Examinador: \_\_\_\_\_

Suplentes: \_\_\_\_\_

São José do Rio Preto, 10 de julho de 2019.

## SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	iv
Lista de Tabelas.....	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	vii
Resumo.....	x
Abstract.....	xii
<b>1. Introdução.....</b>	<b>02</b>
<b>2. Casuística e Métodos.....</b>	<b>16</b>
<b>3. Resultados.....</b>	<b>25</b>
<b>4. Discussão.....</b>	<b>34</b>
<b>5. Conclusões.....</b>	<b>39</b>
<b>6. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>41</b>
<b>7. Anexos.....</b>	<b>49</b>

*Ao meu amado filho Guilherme S. Florim,  
Que transformou minha vida e minha forma de enxergar o mundo. Aquele que dá  
sentido a tudo que faço. Meu coração será sempre seu.*

*Ao meu esposo Filipe S. Florim,  
Meu leal companheiro, que me incentiva, compartilha dos meus sonhos e me traz  
segurança e paz. Meu eterno amor.*

*À minha família  
Por sempre acreditar em mim.*

## *Agradecimentos*

### *A Deus*

*Aquele que me direciona, me consola e dá forças, sempre.*

### *Ao meu orientador Prof. Dr. Mário Abbud Filho*

*Pela confiança em meu trabalho, pela sabedoria e por compartilhar humildemente dos seus conhecimentos. Meu sincero respeito e admiração.*

### *À minha coorientadora Dra. Heloisa Cristina Caldas*

*Pela amizade, por todo o apoio e incentivo. Minha eterna gratidão.*

### *Ao Laboratório de Imunologia e Transplante Experimental (LITEX)*

*Glória Elisa F. Mendes, Camila Ravazzi Gauchi, Naiane do Nascimento Gonçalves, Patrícia Carvalho, Filipe S. Florim, Dra. Fernanda Gorayeb Polacchini e Bruna L. Calvo. Pela amizade, entusiasmo, carinho e paciência.*

### *Aos amigos do bloco U-6*

*Pelo convívio, carinho e auxílio em diversos momentos.*

### *À equipe de transplante renal do Hospital de Base, em especial*

*Dra. Ida M. Maximina Fernandes Charpiot e Maria Alice S. Ferreira Baptista  
Pela disponibilidade e pelos ensinamentos.*

### *Aos pacientes que participaram deste estudo*

*Pela colaboração e por me proporcionar aprendizado.*

### *Aos funcionários da Pós-graduação da Famerp*

*Por estarem sempre dispostos a ajudar.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à  
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)*

*Pela concessão da bolsa de doutorado e pelo financiamento do projeto de pesquisa,  
tornando possível a realização desta tese.*

*Bolsa de Doutorado: Processo FAPESP: 2014/22269-4*

*Auxílio Regular ao Orientador: Processo FAPESP: 2014/25831-5*



*“Uma vez que você tenha experimentado voar, você andará pela terra com seus olhos voltados para céu, pois lá você esteve e para lá você desejará voltar”.*

*Leonardo da Vinci*

---

**Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1:</b> Relação de genes avaliados nas reações de q-PCR em tempo real.....	22
<b>Tabela 2:</b> Características clínico-demográficas dos doadores.....	25
<b>Tabela 3:</b> Características clínico-demográficas dos receptores.....	27
<b>Tabela 4:</b> Correlação entre os níveis de expressão gênica e escores de KDPI.....	31

---

**Lista de figuras**

<b>Figura 1.</b> Via de sinalização da molécula <i>toll-like receptor 4</i> (TLR4).....	09
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da estrutura dos receptores do inflamassoma NLRP3.....	10
<b>Figura 3.</b> Ativação do inflamassoma NLRP3.....	12
<b>Figura 4.</b> Expressão gênica avaliada em rins ECD vs. SCD.....	29
<b>Figura 5.</b> Expressão gênica avaliada em rins KDPI > 80 % vs. KDPI ≤ 80%.....	30

**Lista de Abreviaturas e Símbolos**

ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
Bx	Biópsia
CARD	<i>Caspase activation and recruitment domains</i>
CASP-1	Caspase 1
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DAMP	<i>Damage associated molecular pattern</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DGF	Função tardia do enxerto
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DP	Desvio padrão
ECD	Doador de critério estendido
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GUSB	Beta-glucuronidase
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HIF-1	Fator 1 induzível por hipóxia
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA	Antígeno leucocitário humano
HMGB1	Proteína do grupo de alta mobilidade 1
HO-1	Heme oxigenase 1

HPRT	Hipoxantina fosforibosiltransferase
HSP	<i>Heat-shock proteins</i>
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IFN- $\beta$	Interferon beta
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-1 $\beta$	Interleucina 1beta
IRF	Fator regulador de interferon
IRF-3	Fator regulador 3 de interferon
KDPI	<i>Kidney donor profile index</i>
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i>
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito
MyD88	Resposta primária de diferenciação mielóide 88
NACHT	<i>Central nucleotide-binding domain/NOD</i>
NF $\kappa$ -B	Fator nuclear kappa-beta
NLR	<i>Nod-like receptor</i>
NLRP3	<i>Nod-like receptor protein 3</i>
NOD	<i>Nuclear oligomerization domains</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PRR	Receptor de reconhecimento de padrão
PYD	<i>Pyrin domain</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RA	Rejeição aguda
RIP1	Proteína quinase de interação com o receptor 1

---

RNA	Ácido ribonucleico
RQ	Quantificação Relativa
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
S100	Proteína de ligação ao cálcio
SCD	Doador de critério padrão
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TFG	Taxa de filtração glomerular
TGF-beta	Fator de crescimento transformador beta
TIF	Tempo de isquemia fria
TIR	<i>Domain containing adaptor protein</i>
TIRAP	<i>Toll-interleukin 1 receptor</i>
TLR	Receptor do tipo toll
TLR4	Receptor do tipo toll 4
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor inducing interferon-<math>\beta</math></i>
Tx	Transplante renal

## Resumo

**Introdução:** Rins provenientes de doadores falecidos com critérios estendidos (ECD) têm sido cada vez mais usados nos transplantes. Entretanto, os desfechos associados ao uso desses órgãos são controversos. É possível que o ambiente pró-inflamatório gerado pela morte encefálica do doador e a ativação da imunidade inata afetem de forma diferente os rins ECD ou com KDPI (*Kidney Donor Profile Index*) > 80% e os rins de doadores de critério padrão (SCD) ou com KDPI ≤ 80%. **Objetivos:** 1) investigar a ativação das principais vias da imunidade inata responsáveis pela resposta inflamatória estéril em biópsias pré-implantação de rins ECD e com KDPI > 80%; 2) comparar o padrão de expressão gênica relacionado à imunidade inata em biópsias pré-implantação de rins ECD e com KDPI > 80%. **Métodos:** Biópsias renais pré-implantação de doadores falecidos ECD (n= 41) e SCD (n= 39) foram avaliadas quanto à expressão gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando o sistema TaqMan Gene Expression Array Plates para os genes de TLR4, HMGB1, NFκ-B, MyD88, IFN-γ, IL-1β, TNF-α, CASP1, ICAM-1, IL-10, HO-1, HIF-1, MCP-1, TGF-β, TRIF, TRAM, IRF-3, RIP1, IFN-β e NLRP3. A expressão gênica também foi avaliada nos rins classificados pelo KDPI > 80%. **Resultados:** Biópsia pré-implantação de rins ECD mostraram aumento significativo da expressão de IL-10, TLR4, HMGB1, IFN-γ, TRAM, IRF-3, NLRP3, CASP-1, IL-1β e HIF-1 (p < 0,05) comparado aos rins SCD. Rins com KDPI > 80% apresentaram perfil molecular com aumento significativo de IL-10, TLR4, HMGB1, TRAM, NLRP3 e IL-1β quando comparados com rins de KDPI ≤ 80%. TNF-α e MCP-1 foram expressos apenas em rins com KDPI > 80%. Análises de correlação entre expressão gênica e escores de KDPI revelaram correlação positiva significativa entre TLR4, HMGB1, NLRP3, IL-1β, IL-10,

TRAM, CASP1, HIF-1, MCP-1, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ). **Conclusão:** Independente da classificação usada para caracterizar o rim do doador concluímos que rins ECD ou com KDPI  $> 80\%$  apresentam aumento da expressão de genes da imunidade inata comparado com rins SCD ou com KDPI  $\leq 80\%$ .

**Palavras-chave:** Transplante renal; Biomarcadores; Doador de critério estendido; Doença renal crônica.



**Abstract**

**Introduction:** Kidneys from deceased donors with extended criteria (ECD) have been increasingly used, but the outcomes associated with the use of these criteria are still controversial. It is possible that the proinflammatory environment generated by the donor's encephalic death and the activation of innate immunity affect ECD kidneys or with Kidney Donor Profile Index (KDPI) > 80% and the standard donor kidney (SCD) or with KDPI ≤ 80%. **Objectives:** 1) to investigate the activation of the main innate immunity pathways responsible for the sterile inflammatory response in ECD kidney pre-implantation biopsies and with KDPI > 80%; 2) to compare the gene expression pattern related to innate immunity in pre-implantation biopsies of ECD kidneys and with KDPI > 80%. **Methods:** Preimplantation kidney biopsies from ECD (n=41) and SCD (n=39) were evaluated for real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) gene expression using the TaqMan Gene Expression Array Plates system for genes TLR4, HMGB1, NFK-β, MyD-88, INF-γ, IL1-β, TNF-α, CASP1, ICAM-1, IL-10, HO-1, HIF-1, MCP-1, TGF-β, TRIF, TRAM, IRF-3, RIP1, INFβ-1 and NLRP3. Gene expression was also evaluated in kidneys with KDPI ≥80. **Results:** ECD biopsies showed a significant increase in expression of IL-10, TLR4, HMGB1, IFN-γ, TRAM, IRF-3, NLRP3, CASP-1, IL-1β and HIF-1 (p < 0.05) compared to the SCD kidneys. Kidneys with KDPI > 80% presented a molecular profile with significant increase of IL-10, TLR4, HMGB1, TRAM, NLRP3 and IL-1β when compared to KDPI kidneys ≤ 80%. TNF-α and MCP-1 were expressed only in kidneys with KDPI > 80%. Correlation analyzes between gene expression and KDPI scores revealed a significant positive correlation between TLR4, HMGB1, NLRP3, IL-1β, IL-10, TRAM, CASP1, HIF-1, MCP-1, IFN-γ and TNF-α (p < 0.05). **Conclusion:** Regardless of the classification used

to characterize the kidney of the donor we concluded that ECD kidneys and with KDPI > 80% present increased expression of innate immunity genes compared to SCD kidneys or with KDPI  $\leq$  80%.

**Keywords:** Kidney transplantation, Biomarkers, Extended criteria donors, Chronic renal disease.

## ***1.INTRODUÇÃO***

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Transplante renal e tipos de doadores

O transplante renal (Tx) é considerado a terapia de escolha mais eficaz para pacientes com insuficiência renal crônica em estágio terminal, pois oferece melhor qualidade de vida e aumento da sobrevida comparado à pacientes que permanecem em diálise.<sup>(1,2)</sup>

O Brasil tornou-se o maior programa público de transplantes de órgãos e tecidos do mundo e é o segundo em número absoluto de transplantes renais. De acordo com o registro da Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO), no ano de 2018 foram realizados no Brasil 5.923 transplantes de rim, sendo a necessidade estimada de 12.365 transplantes.<sup>(3)</sup> São José do Rio Preto é a terceira cidade do estado de São Paulo em número absoluto de transplantes renais, com aproximadamente 70 transplantes por milhão de população, número que a classificou como centro de alto desempenho em transplantes.<sup>(4)</sup>

O Tx pode ser realizado com 2 tipos de doadores: doador vivo e doador falecido. Entretanto, o principal problema dos transplantes é o número reduzido de doadores, insuficiente para suprir a demanda cada vez maior dos pacientes que aguardam em lista de espera. Por esse motivo os centros transplantadores passaram a buscar formas alternativas de alocação de órgãos, e a utilizar rins de doadores falecidos com critérios diferentes do “padrão” tradicionalmente utilizados (SCD) e por isso denominado rins de Doadores com Critérios Estendidos (ECD).<sup>(5-7)</sup>

Considera-se ECD doadores com idade  $\geq 60$  anos ou com idade entre 50 a 59 anos, que possuem pelo menos dois dos três fatores de risco: história de hipertensão

---

arterial sistêmica (HAS), creatinina sérica maior que 1,5 mg/dL na retirada do órgão ou doença cerebrovascular como a causa do óbito.<sup>(8)</sup>

Com o envelhecimento geral da população mundial, a prática de transplantar pacientes acima de 65 anos difundiu-se entre os diversos centros transplantadores. Nos EUA, rins ECD representam cerca de 10 a 30% dos Tx realizados e estima-se que no Brasil esse número seja semelhante.<sup>(9)</sup> A aceitação de rins ECD resulta em aumento do número de transplantes e as vantagens do uso desses órgãos são a maior sobrevida do receptor e melhor qualidade de vida quando comparada àqueles que se mantêm em terapia dialítica, com aumento na expectativa de vida que varia de 3 a 9 anos.<sup>(10)</sup>

Entretanto, o uso desse tipo de órgão ainda tem gerado controvérsia. Em revisão de literatura Pascual *et al.*<sup>(11)</sup> mostraram que na maioria dos estudos multicêntricos os receptores de rins ECD apresentaram sobrevida inferior do enxerto e do paciente, quando comparados à dos receptores de rins SCD. Porém, alguns estudos relataram sobrevidas do paciente e do enxerto semelhantes para os dois tipos de doadores.<sup>(5,10,12)</sup>

Apesar da controvérsia, o uso de rins ECD tem aumentado em todo o mundo, especialmente quando esses órgãos são alocados preferencialmente para subgrupos de receptores que poderão obter maior benefício com o Tx como, por exemplo, indivíduos com mais de 40 anos, não sensibilizados, diabéticos, ou pacientes com expectativa de vida em lista de espera menor que quatro anos.<sup>(13,14)</sup>

Outro fator que contribuiu para que mais Tx pudessem ser realizados com ECD foi o desenvolvimento de novas drogas imunossupressoras, reduzindo significativamente os episódios de rejeições agudas e melhorando a sobrevida do enxerto no primeiro ano após o Tx.<sup>(15)</sup>

## 1.2 Avaliação da qualidade do órgão de doador falecido

Com o intuito de refinar a classificação binária de ECD e SCD, onde a idade do doador é a base da classificação, foi proposta a classificação do doador pelo *Kidney Donor Profile Index* (KDPI), índice que varia de 0 a 100%, calculado com base em 10 características do doador.<sup>(16)</sup> Usado principalmente nos EUA, cerca de 30-50% dos rins com KDPI > 85% passaram a ser descartados pelas equipes de transplante, preocupadas com a “qualidade” do órgão e possíveis desfechos inferiores aos rins com KDPI < 85%  
(16)

Assim, rins ECD ou com KDPI > 85% passaram a ser uma importante causa de descarte de órgãos, pois estão associados com risco de perda do enxerto e outros desfechos, apesar de que a potencial utilização desses órgãos poderia aumentar a oferta de rins, diminuir o tempo em lista de espera dos candidatos para transplante e melhorar a qualidade de vida se comparado dos pacientes que permanecem em diálise.<sup>(5,8,12,16,17)</sup> A alocação de rins ECD tem propostas com critérios estabelecidos como o programa *Eurotransplant Senior Program*, que destina os rins para receptores também idosos. A alocação apropriada desses rins reduz o tempo de isquemia fria e consequentemente diminui o descarte desses órgãos, que são mais suscetíveis aos efeitos deletérios da isquemia.<sup>(18)</sup>

Outra forma de avaliar a qualidade do rim do doador é a realização da biópsia (Bx) pré-implantação do órgão e que tem como objetivo fornecer informações sobre a “qualidade” do órgão a ser transplantado. Estudos têm mostrado que a presença de lesões pré-existentes na Bx do doador estão associadas com pior função renal, desenvolvimento de lesões subseqüentes e menor sobrevivência do enxerto.<sup>(19,20)</sup>

No entanto, existem limitações da classificação feita apenas com base nos achados histológicos, pois existem diferentes interpretações dos patologistas para uma mesma Bx e dissociação entre a histologia e a função renal observada.<sup>(20)</sup> Para aumentar o valor preditivo positivo da classificação o Comitê de Banff desenvolveu critérios que integram dados histológicos e moleculares em uma classificação única que poderia diagnosticar rejeição e outros desfechos com mais acurácia.<sup>(21)</sup> Porém até hoje, a utilização de Bx pré-implantação como ferramenta para avaliar a qualidade renal e ajudar na decisão de recusar ou aceitar os rins de “qualidade inferior” não conseguiu prever os resultados e passou a ser uma das razões para a crescente taxa de descarte dos órgãos observada.<sup>(20)</sup>

Estudos com biomarcadores não invasivos e que apresentam alta sensibilidade e especificidade poderiam ser uma alternativa para melhorar o uso dos rins de “qualidade inferior”.<sup>(22)</sup> O estudo do transcriptoma poderia complementar a avaliação clínica e patológica e prever o desfecho do Tx detectando modificações sutis na variação da transcrição de genes associados à ativação imunológica.<sup>(23,24)</sup> Assim, mudanças no transcriptoma poderiam refletir alterações pró-inflamatórias ou mesmo sinais de reparação tecidual que não são visíveis pela histopatologia nem identificados pelas variáveis clínicas.<sup>(24)</sup>

A maior parte da literatura que utiliza a avaliação molecular de Bx pré-implante foi direcionada para correlacionar tipos específicos de transcritos moleculares com desfechos precoces ou tardios pós-transplante. A grande maioria utilizou Bx realizadas após a reperusão do rim e comparou transcritos de doadores falecidos e doadores vivos, ocorrência de função tardia do enxerto e rejeição aguda.<sup>(25-27)</sup> Transcritos da imunidade

inata e da inflamação estéril relacionados aos rins ECD (*versus* SCD) ou de rins com KDPI > 80% ainda não foram avaliados em Bx pré-implantação.

As razões pelas quais esses tipos de rim podem ter resultados inferiores não são claras e o entendimento dos mecanismos imunológicos que relacionam a preservação de órgãos com lesão tecidual poderia auxiliar os profissionais de transplante na decisão complexa de aceitar ou recusar o órgão, além de poder melhorar os resultados clínicos.

Independentemente do tipo de métrica utilizada, os rins ECD e com KDPI > 80% continuam com alta taxa de recusa e descarte pelas equipes de transplantes em detrimento de seu benefício potencial para os pacientes em diálise, especialmente os idosos, em lista de espera para Tx.

### **1.3 Imunidade inata no transplante renal**

Órgãos provenientes de doadores falecidos estão sujeitos a vários tipos de lesões causadas pela instabilidade hemodinâmica, desequilíbrio hidroeletrólítico do doador, pela hipóxia causada pela preservação do órgão por longos períodos de tempo e pela manipulação do órgão no pré-operatório.<sup>(28)</sup>

Entre a retirada do órgão do doador até sua reperfusão no receptor, o rim é exposto à isquemia quente e isquemia fria. Onde tempo de isquemia quente é definido pelo período entre o clampeamento da artéria no doador até a perfusão com solução de preservação.<sup>(29,30)</sup> Nesse período ocorrem as principais lesões celulares com interrupção abrupta da oferta de oxigênio para as células, e consequente redução do metabolismo aeróbico o que reduz, de forma significativa, a quantidade de trifosfato de adenosina (ATP) intracelular.<sup>(30)</sup> O tempo de isquemia fria (TIF) é determinado pelo tempo que o órgão recebe a perfusão com solução de preservação até o desclampeamento da



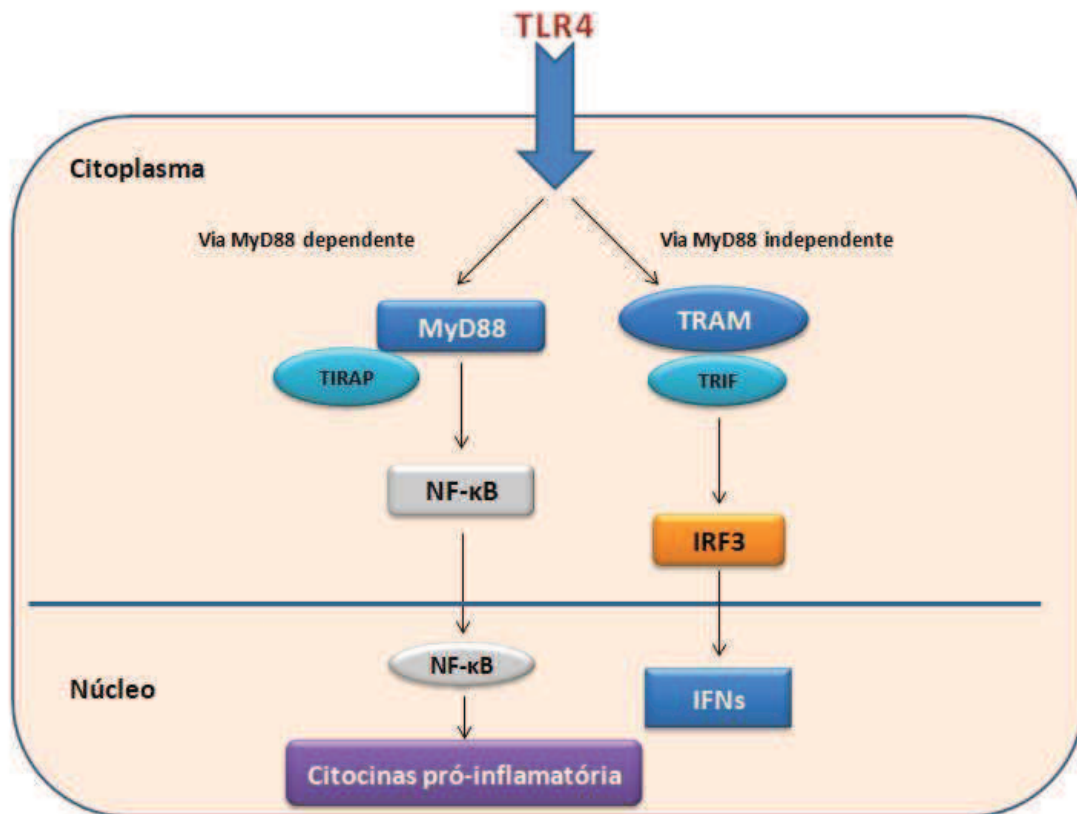
anastomose no receptor passa a desempenhar papel crucial no processo de dano e morte celular e pode ser o gatilho para uma série de reações inflamatórias.<sup>(29,31-33)</sup>

A imunidade inata desempenha um papel relevante durante esse evento e a presença de padrões moleculares associados aos danos endógenos (DAMPs - *damage-associated molecular patterns*) ativa o sistema inato e desencadeia a resposta inflamatória estéril.<sup>(34)</sup> DAMPs podem ser liberados pela célula sob estresse ou em necrose, com a ruptura de organelas e da membrana plasmática que são expostos ao meio extracelular, onde podem estimular uma série de receptores.<sup>(35)</sup> Os DAMPs são moléculas de natureza variada, como a proteína nuclear HMGB1 (*high-motility group box 1*) presentes também em vesículas citoplasmáticas e no meio extracelular, HSPs (*heat-shock proteins*) e proteínas de ligação ao cálcio (S100); há também fragmentos de DNA mitocondrial, ácido úrico citoplasmático, ATP, peptídeos mitocondriais e componentes da matriz extracelular, como hialuronato e sulfato de heparan.<sup>(36)</sup>

O reconhecimento dos DAMPs é realizado por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), como os receptores do tipo TLR (*Toll-like receptor*) e do tipo NLR (*Nod-like receptor*).<sup>(37)</sup> Os receptores TLR 1, 2, 4, 5, 6 estão presentes na membrana plasmática, e contêm domínios intracelular, associados às proteínas do tipo TIR (*domain-containing adaptor protein*): MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), TIRAP (*toll-interleukin 1 receptor*), TRIF (*TIR-domain containing adaptor inducing interferon- $\beta$* ) e TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) e domínio extracelular, onde podem se ligar aos DAMPs ou aos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs). Receptores TLRs 3, 7, 8, 9 e 10 são localizados no meio intracelular, nos endossomos, e não possuem domínio extracelular. Dentre os diversos receptores TLRs, os TLR2 e TLR4 são os mais bem estudados em razão da grande

variedade de células que os expressam em suas superfícies e suas conseqüentes repercussões no organismo humano.<sup>(38)</sup>

A sinalização dos TLRs, exceto do TLR3, acontece através da molécula adaptadora MyD88, sendo esta via denominada resposta MyD88 dependente. Entretanto, se a via de ativação for independente do MyD88, o sinal proveniente do TLR ativa o fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B) através de outras duas moléculas adaptadoras, o TRIF e o TRAM e é denominada via MyD88 independente. Ainda, MyD88 pode se associar ao TIRAP, que é outra proteína adaptadora, para induzir a ativação de NF- $\kappa$ B. A via TRIF também pode atuar por outros fatores de transcrição além do NF- $\kappa$ B, como os membros da família IRF (*interferon regulatory factor*), chamados de IRF3, 5 e 7, que produzem interferon tipo I (IFN- $\beta$  e IFN- $\alpha$ ).<sup>(38-41)</sup> (Figura 1).



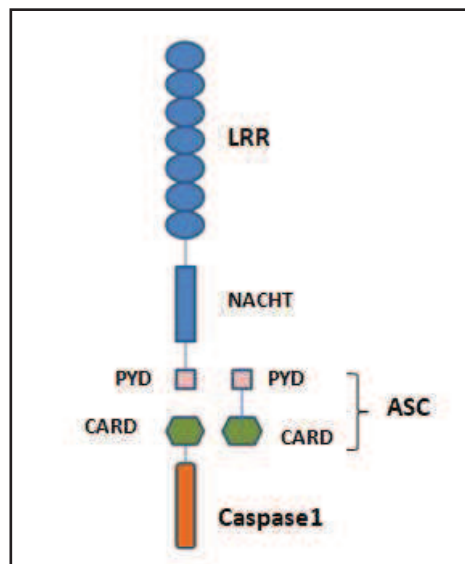
**Figura 1.** Via de sinalização da molécula *toll-like receptor 4* (TLR4).

Fonte: modificado de Chen et al. 2018.<sup>(42)</sup>

Ultimamente, uma nova família de receptores da imunidade inata foi descrita, os receptores do tipo proteína contendo domínio de ligação nucleotídica - NOD (NLRs – *Nod Like Receptors*). Diferente dos receptores TLRs que são receptores transmembrânicos, os NLRs são proteínas solúveis que se encontram no citoplasma e são capazes de reconhecer PAMPs e DAMPs intracelulares desencadeando o recrutamento de outras proteínas, o que culmina na formação de complexos de sinalização intracelulares multiproteicos denominados inflamassomas.<sup>(37,43)</sup>

Os inflamassomas atuam na ativação de enzimas da família cisteína-aspartato proteases (caspases) durante a regulação da imunidade em condições fisiológicas, patogênicas e na presença de sinais de perigo.<sup>(43)</sup>

A estrutura típica de um inflamassoma é formada por um receptor NLR caracterizada por três domínios estruturais: um domínio rico em repetições de leucina (*LRR - leucine-rich repeat*); um domínio central de oligomerização (NACHT) (*central nucleotide-binding domain/NOD*); e um domínio efetor iniciador da sinalização, que pode ser CARD (*caspase activation and recruitment domains*), PYD (*pyrin domain*) ou BIR (*baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat*)<sup>(44,45)</sup> (Figura 2). Dentre as subfamílias de NLRs descritas temos NLRP1, NLRP3 e NLRC4 que podem formar os inflamassomas.<sup>(46)</sup>

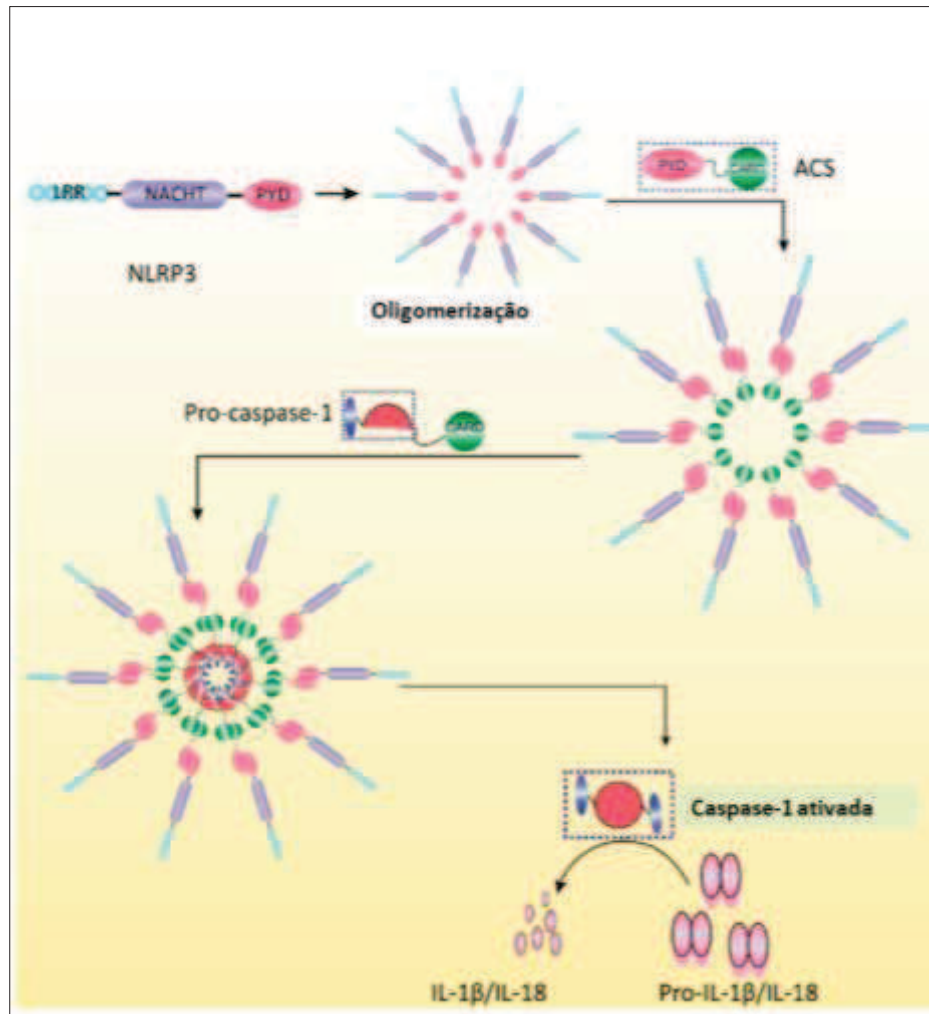


**Figura 2.** Representação esquemática da estrutura dos receptores do inflamassoma NLRP3. O inflamassoma é constituído por uma proteína NLR (*Nod-like receptor*) uma proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) e uma caspase. LRR (*leucine-rich repeat*); um domínio NACHT (*central nucleotide-binding domain/NOD*); e um domínio efetor iniciador da sinalização CARD (*caspase activation and recruitment domains*) contendo PYD (*pyrin domain*).<sup>(47)</sup>

O inflamassoma de NLRP3 é o mais bem estudado e refere-se a uma plataforma de interação de diversas proteínas que são ativadas em resposta a uma grande diversidade de estímulos como os DAMPs. Para a ativação do inflamassoma NLRP3 é necessário o recrutamento da proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) via seu domínio PYD. A ASC contém um domínio CARD que se liga e recruta a pró-caspase 1, via interação CARD-CARD que cliva a pró-1 $\beta$  em sua forma ativa 1- $\beta$ , desencadeando o processo inflamatório.<sup>(47)</sup> (Figura 3).

A ativação do TLR4 leva à ativação do NF- $\kappa$ B via MyD88, que é necessária para induzir a expressão de pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18. Dessa forma, há uma cooperação entre as vias dos TLRs e os inflamassomas.<sup>(48)</sup>

Vários estudos têm sugerido possíveis atuações dos TLRs e NLRs no transplante renal, associadas à liberação de citocinas pró-inflamatórias, através da imunidade inata, portanto com papel crucial no início desse processo.<sup>(35)</sup>



**Figura 3.** Ativação do inflamassoma NLRP3. A estrutura central do inflamassoma é formada pelo receptor NLRP3, a proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) e pró-caspase-1. As interações PYD-PYD (*pyrin domain*) são cruciais para o recrutamento do adaptador ASC e ativação das caspases inflamatórias. As regiões ricas em leucina reconhecem os sinais ativadores levando à oligomerização do domínio NOD (*nuclear oligomerization domains*) e iniciando a formação do inflamassoma em forma de “disco”. Pró-caspase-1 auto ativa-se para se tornar uma caspase-1 ativa, que então cliva as citocinas pró-inflamatórias pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 em suas formas ativas desencadeando o processo inflamatório. Fonte: modificado de Guo et al. 2015.<sup>(49)</sup>

#### 1.4 Mecanismos de resposta à lesão de isquemia renal

O processo de isquemia renal inicia-se com a liberação de catecolaminas e mediadores inflamatórios na morte cerebral antes mesmo da retirada do rim do doador e é acentuada pela ativação da imunidade inata que desencadeia o processo de inflamação estéril. Nessa fase inicial ocorre uma intensa vasoconstrição, acompanhada da diminuição de vasodilatadores, aumento de moléculas de adesão como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), P-selectina e E-selectina endotelial e aumento da expressão de citocinas e quimiocinas. Citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e quimiocinas são produzidas em resposta ao estímulo da hipóxia do órgão que deflagra a imunidade inata e a inflamação estéril. Esses eventos ativam posteriormente a imunidade adaptativa que amplifica a inflamação e a lesão no órgão.<sup>(50)</sup>

A expressão da heme-oxigenase-1 (HO-1) tem papel importante no dano celular, pois durante a lesão isquêmica ela atua na redução de heme livre, considerado tóxico, e na produção de moléculas antioxidantes (biliverdina, monóxido de carbono e ferro) que conferem importantes funções antioxidante, anti-inflamatória e antiapoptótica além de participar do controle do tônus vascular.<sup>(51)</sup>

Em animais, o efeito citoprotetor da HO-1 durante a isquemia e reperfusão foi descrito em alguns modelos de transplante de órgãos. Wagner *et al*, por exemplo, em modelo de transplante renal observaram melhora da função do enxerto e inibição da lesão de isquemia reperfusão através da indução de HO-1.<sup>(52)</sup>

Outra molécula que participa na lesão de isquemia é o fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1), um regulador da resposta homeostática celular e sistêmica à hipóxia que ativa a transcrição de genes envolvidos no metabolismo energético, angiogênese,

apoptose, aumentando a liberação de oxigênio e facilitando a adaptação metabólica à hipóxia.<sup>(53)</sup>

Embora vários autores tenham estudado o mecanismo de isquemia no transplante renal, as alterações moleculares que ocorrem em rins “não ideais” como ECD e com KDPI > 80%, ainda são pouco conhecidas. Portanto, a análise do perfil molecular desses rins poderia ser comparada com a dos rins “ideais” e fornecer informações adicionais das vias metabólicas ativadas na inflamação estéril.

### **1.5 Objetivos**

- 1) Investigar a ativação das principais vias da imunidade inata responsáveis pela resposta inflamatória estéril em biópsias pré-implantação de rins ECD e com KDPI > 80%.
- 2) Comparar o padrão da expressão gênica relacionado à imunidade inata em biópsias pré-implantação de rins ECD e com KDPI > 80% com a dos rins “ideais”.



## ***2.CASUÍSTICA E MÉTODOS***

---

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 2.1 Desenho do estudo e casuística

Trata-se de um estudo prospectivo de centro único, randomizado conforme o tipo de rim (ECD/SCD e a classificação pelo KDPI). Oitenta pacientes foram recrutados pelo Serviço de Transplante Renal do Hospital de Base da Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto entre janeiro de 2015 e dezembro de 2016 com seguimento de um ano.

Os pacientes foram divididos em receptores e doadores SCD (n= 39) ou ECD (n= 41) e conforme o  $KDPI \leq 80\%$  e  $KDPI > 80\%$ .

Todos pacientes receberam terapia de indução com basiliximabe ou timoglobulina e de manutenção com inibidores da calcineurina associados com micofenolato sódico e prednisona, conforme protocolo local.

### 2.2 Definições

- a) Doadores ECD: doadores com  $\geq 60$  anos de idade ou com idade entre 50 a 59 anos, que possuem pelo menos 2 dos 3 fatores de risco: história de HAS, creatinina sérica maior que 1,5 mg/dL na retirada do órgão ou doença cerebrovascular como causa do óbito.<sup>(8)</sup>
- b) Função tardia do enxerto (DGF): necessidade de diálise na primeira semana pós-transplante.<sup>(10)</sup>
- c) Rejeição Aguda: critérios clínicos como disfunção do enxerto e histologia, de acordo com os critérios histológicos de Banff-2007.<sup>(54)</sup>
- d) KDPI: Medida contínua do perfil do doador calculada por uma fórmula, envolvendo 10 características: idade, peso, altura, raça, história de HAS, *Diabetes Mellitus* (DM),

causa da morte cerebrovascular, creatinina sérica, hepatite C e doador com parada cardíaca.<sup>(16)</sup>

e) Tempo de isquemia fria (TIF): período que se estende desde o início da perfusão do enxerto renal com a solução de perfusão (na captação) até o momento em que são liberados os clampeamentos cirúrgicos vasculares no receptor e restabelecida a circulação sanguínea no interior do enxerto.<sup>(29)</sup>

### **2.3 Aprovação em Comissão de Ética em Pesquisa**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (CEP/FAMERP) sob nº 1.021.915 em conformidade com as normas vigentes para pesquisa envolvendo seres humanos (Anexo 1) e está de acordo com os valores éticos declarados na Declaração de Helsinki e na Declaração de Istanbul de 2008.<sup>(55,56)</sup>

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido de todos pacientes antes da inclusão no estudo.

### **2.4 Critérios de inclusão**

- Receptores com idade maior que 18 anos;
- Doença renal terminal com indicação para receber um alotransplante renal primário de um doador falecido.

### **2.5 Critérios de exclusão**

- Retransplantes;

- Pacientes que apresentaram primariamente enxerto não funcionante ou com trombose vascular;
- Pacientes HIV soropositivos.

## **2.6 Coletas das biópsias renais**

As Bx pré-implantação foram realizadas em cunha, imediatamente mergulhadas em solução estabilizadora de RNA, *RNAlater* (Ambion, Applied Biosystems) e congeladas em nitrogênio líquido a  $-195^{\circ}\text{C}$  para a avaliação molecular.

## **2.7 Extração e quantificação do RNA das biópsias renais**

Os fragmentos de enxerto renal foram retirados da solução estabilizadora e processados para a extração de RNA total usando reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen Life Technologies). O tecido congelado foi macerado acrescentando nitrogênio líquido para que a amostra não se descongelasse. Acrescentou-se 1000  $\mu\text{L}$  de Trizol para cada 50 mg da amostra. A mistura foi transferida para um tubo, deixada descansar por 5 minutos à temperatura ambiente e em seguida centrifugada a 12.000g por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio para cada 1000  $\mu\text{L}$  de Trizol, homogeneizando por inversão e mantendo à temperatura ambiente por 5 minutos. Após centrifugação a 12.000g por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , a fase aquosa foi transferida para um tubo novo contendo 0,5 mL de álcool isopropílico e agitado por inversão. A amostra foi armazenada até o dia seguinte em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, centrifugou-se a amostra por 30 minutos a 14.000g à  $4^{\circ}\text{C}$ . Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1mL de etanol 70% gelado, diluído em água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC), e centrifugou-se a amostra por 2 minutos a 14.000g a  $4^{\circ}\text{C}$ ;

realizando esta etapa por duas vezes. Descartou-se novamente o sobrenadante e os tubos foram deixados sobre papel absorvente até secagem do *pellet*. Feito isso, foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de água tratada com DEPC para diluição o *pellet* de RNA.

As amostras foram quantificadas para utilização das concentrações ideais nas reações de transcrição reversa do RNA (*Reverse transcription polymerase chain reaction* – RT-PCR), em equipamento fluorímetro Qubit® (Thermo Fisher Scientific) com a utilização do kit Qubit® RNA *High Sensitivity Assay*, conforme protocolo a seguir:

Identificou-se dois tubos para construção dos padrões calibradores (Padrão 1 e Padrão 2). Para o padrão 1, preparou-se uma mistura contendo 10  $\mu\text{L}$  de Padrão 1 adicionado de 190  $\mu\text{L}$  de solução de trabalho. Para o padrão 2, preparou-se uma mistura contendo 10  $\mu\text{L}$  de Padrão 2 adicionado de 190  $\mu\text{L}$  de solução de trabalho . Ambos com volume final de 200  $\mu\text{L}$ .

A solução de trabalho foi preparada em um tubo de 15 mL contendo: 199  $\mu\text{L}$  de *Buffer* (multiplicado pelo nº de amostras) adicionado a 1  $\mu\text{L}$  do reagente fluoróforo (multiplicado pelo nº de amostras), com volume final de 200  $\mu\text{L}$  para cada reação.

Cada reação foi preparada em tubo de 0,5 mL, onde foi distribuído 199  $\mu\text{L}$  de solução de trabalho, e 1  $\mu\text{L}$  da amostra de RNA (volume total de 200  $\mu\text{L}$ ). Os tubos foram agitados no *vórtex* por cerca de 3 segundos e incubados em temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida, a leitura das amostras foi realizada.

Após a quantificação das amostras seguiu-se o protocolo para síntese de cDNA.

## 2.8 Transcrição reversa do RNA total e síntese do DNA complementar (cDNA)

O RNA total foi submetido à transcrição reversa com o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras tiveram sua concentração de RNA total ajustadas para 1 µg e para cada uma delas foram utilizados na preparação da reação 2 µL de 10x RT *Buffer*; 0,8 µL de dNTPs (100 mM); 2 µL RT *random primers* (10x); 1 µL de MultiScribe™ *Reverse Transcriptase* (50,0 U/µL) e 4 µL de água DEPC, com volume final de 20 µL. As amostras foram submetidas às ciclagens compostas por 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C.

## 2.9 Análise da Expressão Gênica por PCR quantitativa em tempo real

A análise dos níveis de expressão gênica das biópsias renais pré-implante foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (*Quantitative real time polymerase chain reaction – qRT-PCR Array Plate*) com sondas TaqMan®, através da customização de uma placa com genes selecionados relacionados à imunidade inata e inflamação estéril.

Cada reação foi realizada em um volume de 10 uL, contendo 5 uL de TaqMan® Gene Expression Master Mix e 5 uL de solução de cDNA. As condições térmicas da reação foram: 50° C durante 2 minutos, 95° C durante 10 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95° C, seguido de 60° C durante 1 minuto, de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems). Os genes avaliados estão descritos na tabela 1.

O experimento foi realizado utilizando o sistema StepOnePlus™ PCR (Applied Biosystems) e as amostras foram analisadas em duplicata. O painel de ensaios

customizados pelo fabricante (Applied Biosystems) possibilitou a avaliação de quatro genes de referências 18S, GAPDH, HPRT1 e GUSB. Os dados foram normalizados com as expressões dos genes endógenos GAPDH e GUSB. A quantificação relativa (RQ) foi realizada pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Ct - *cicle threshold*).<sup>(57)</sup> A expressão gênica relativa das amostras do grupo ECD foi analisada usando doadores SCD como grupo calibrador (RQ= 1) e as amostras do grupo KDPI > 80% teve como calibrador o grupo KDPI  $\leq$  80 (RQ=1). Para análise dos resultados foi utilizado o programa *Cloud Software* (Thermo Fisher). Os resultados estão expressos em médias de unidades de expressão relativa.

## 2.10 Análise estatística

Os dados são apresentados como números absolutos, médias  $\pm$  DP, e porcentagens. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software StatsDirect versão 3.0.171. Foi realizado o teste de normalidade *D'Agostino & Pearson omnibus normality test* e os marcadores cujos valores de RQ apresentaram distribuição normal foram analisados pelo test T para uma amostra (*One-sample T test*), enquanto que os marcadores cujos valores de RQ não apresentaram distribuição normal foram analisados por *Wilcoxon signed rank test*. Para o cálculo da variabilidade ou dispersão dos valores das médias da expressão relativa foi realizado a análise da amplitude (valores máximos – valores mínimos de RQ).

Para reduzir o risco de falsos positivos, os valores de p foram ajustados para múltiplos testes usando o teste de Benjamini-Hochberg.<sup>(58)</sup> O teste do coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para comparação entre a expressão gênica e os escores do KDPI. As sobrevidas dos enxertos e dos pacientes em 1 ano pós-transplante

foram avaliadas usando as curvas de Kaplan Meyer e para a comparação das curvas, o Teste *Log-rank*. O nível de significância foi estabelecido em valor de  $p < 0,05$ .



**Tabela 1.** Relação de genes avaliados nas reações de q-PCR em tempo real

Nome do Gene	Símbolo	ID do Ensaio
Beta-glucuronidase	GUSB	Hs99999908_m1
Caspase 1	CASP1	Hs00354836_m1
Fator de crescimento transformador beta	TGF- $\beta$	Hs00998133_m1
Fator de necrose tumoral alfa	TNF- $\alpha$	Hs00174128_m1
Fator induzível por hipóxia 1	HIF-1	Hs00153153_m1
Fator nuclear kappa-beta	NF- $\kappa$ B	Hs00765730_m1
Fator regulador 3 de interferon	IRF-3	Hs01547283_m1
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	GAPDH	Hs99999905_m1
Heme oxigenase 1	HO-1	Hs01110250_m1
Hipoxantina fosforibosiltransferase	HPRT	Hs99999909_m1
Interferon beta	IFN- $\beta$	Hs01077958_s1
Interferon gama	IFN- $\gamma$	Hs00989291_m1
Interleucina 10	IL-10	Hs00961622_m1
Interleucina 1beta	IL1- $\beta$	Hs01555410_m1
Molécula de adesão intercelular 1	ICAM-1	Hs00164932_m1
<i>Nod-like receptor protein 3</i>	NLRP3	Hs00918082_m1
Proteína do grupo de alta mobilidade 1	HMGB1	Hs01923466_g1
Proteína quimiotática de monócito 1	MCP-1	Hs00234140_m1
Proteína quinase de interação com o receptor 1	RIP1	Hs01041869_m1
Receptor do tipo Toll 4	TLR4	Hs00152939_m1
Resposta primária de diferenciação mielóide 88	MyD88	Hs00182082_m1
<i>TIR-domain containing adaptor inducing interferon-<math>\beta</math></i>	TRIF	Hs01090712_m1
<i>TRIF-related adaptor molecule</i>	TRAM	Hs04189225_m1

### ***3. RESULTADOS***

---

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Características clínico-demográficas dos doadores

As características demográficas dos doadores e as variáveis do transplante analisadas estão apresentadas na tabela 2.

A população estudada foi de 80 doadores que apresentaram média de idade de  $46 \pm 17$  anos, sendo 49% do sexo masculino, com média do KDPI de  $65 \pm 28,5$ . O TIF foi de  $26 \pm 5,4$  horas e o tempo de hospitalização de  $5,4 \pm 5$  dias.

Os doadores foram divididos conforme o tipo de rim: SCD (n= 39) e ECD (n= 41). Os doadores do grupo ECD apresentaram idade mais avançada (ECD=  $59 \pm 6$  vs. SCD=  $33 \pm 16$  anos;  $p = 0,0001$ ), maior taxa de causa do óbito devido a acidente cerebrovascular (ECD= 93% vs. SCD= 36%;  $p = 0,0001$ ), maior taxa de HAS (ECD= 68% vs. SCD= 10%;  $p = 0,0001$ ), e 17% dos indivíduos do grupo ECD eram diabéticos ( $p = 0,01$ ). O TIF (SCD=  $26,2 \pm 4,7$  vs. SCD=  $25,6 \pm 6,2$  horas) e o tempo de hospitalização (SCD=  $5,4 \pm 4$  vs. SCD=  $5,4 \pm 6$  dias) foram semelhantes nos dois grupos.

A média do KDPI foi significativamente maior no grupo ECD (ECD =  $74 \pm 26\%$  vs. SCD =  $56 \pm 29\%$ ;  $p = 0,004$ ). Todos os doadores com KDPI  $> 80\%$  (n = 32) faziam parte do grupo ECD com média de  $90,7 \pm 6,3\%$  e nenhum do grupo SCD ( $p = 0,0001$ ). A maioria dos doadores com KDPI  $\leq 80\%$  (n = 48) faziam parte do grupo SCD (n = 39) e apenas 9 doadores do grupo ECD ( $p = 0,0001$ ).

**Tabela 2.** Características clínico-demográficas dos doadores

<b>Parâmetros</b>	<b>Total (n = 80)</b>	<b>SCD (n = 39)</b>	<b>ECD (n = 41)</b>	<b>Valor de p</b>
Idade, anos (média ± DP)	46 ± 17	33 ± 16	59 ± 6	<b>0,0001</b>
Gênero M(F)	39 (41)	22 (17)	17 (24)	0,7
<i>Causa do óbito</i>				
Trauma [n (%)]	24 (30)	21 (54)	3 (7)	<b>0,0001</b>
Acidente cerebrovascular [n (%)]	52 (65)	14 (36)	38 (93)	<b>0,0001</b>
Outras causas [n (%)]	4 (5)	4 (10)	0	0,11
Creatinina na retirada do órgão mg/dL (média ± DP)	2 ± 1,9	2 ± 2,3	1,9 ± 1,3	0,8
TIF (h) (média ± DP)	26 ± 5,4	25,6 ± 6,2	26,2 ± 4,7	0,56
Hipertensão arterial sistêmica [n (%)]	32 (40)	4 (10)	28 (68)	<b>0,0001</b>
<i>Diabetes Mellitus</i> [n (%)]	7 (8,7)	0	7 (17)	<b>0,01</b>
Tempo de hospitalização (dias) (média ± DP)	5,4 ± 5	5,4 ± 6	5,4 ± 4	1,0
KDPI (%)	65 ± 28,5	56 ± 29	74 ± 26	<b>0,004</b>
KDPI > 80% [n (%)]	32 (40)	0	32 (78)	<b>0,0001</b>
KDPI ≤ 80% [n (%)]	48 (60)	39 (100)	9 (22)	<b>0,0001</b>

SCD: doador de critério padrão; ECD: doador de critério estendido; TIF: tempo de isquemia fria; KDPI: *kidney donor profile index*.

### 3.2 Características clínico-demográficas dos receptores

As características demográficas dos receptores, o tipo de rim recebido e os desfechos clínicos estão apresentados na tabela 3.

Os receptores apresentaram média de idade de  $49 \pm 12,3$  anos, sendo 60% do sexo masculino e 75% eram caucasianos.

A ocorrência de DGF (ECD= 90% vs. SCD= 85%;  $p = 0,7$ ), a duração da DGF (ECD=  $14 \pm 11$  vs. SCD=  $10 \pm 9$  dias;  $p = 0,2$ ) e a taxa de RA (ECD= 20% vs. SCD= 13%;  $p = 0,5$ ) foram semelhantes nos dois grupos.

O nível sérico de creatinina (ECD=  $2 \pm 0,8$  vs. SCD=  $1,3 \pm 0,4$  mg/dL;  $p = 0,0001$ ), a taxa de filtração glomerular (SCD= ECD=  $56,7 \pm 38,3$  vs.  $70,5 \pm 29$  (mL/min/1,73m<sup>2</sup>);  $p = 0,04$ ) e a proteinúria (ECD=  $0,43 \pm 0,5$  vs. SCD=  $0,22 \pm 0,16$  g/24h;  $p = 0,04$ ) foram significativamente piores no grupo ECD após 1 ano de Tx.

As taxas de sobrevida do enxerto (ECD= 80% vs. SCD= 92% vs.  $p = 0,15$ ) e sobrevida do paciente (ECD= 85% vs. SCD= 94%;  $p = 0,17$ ) no 1º ano pós-Tx foram semelhantes nos dois grupos.

**Tabela 3:** Características clínico-demográficas dos receptores

<b>Parâmetros</b>	<b>Total</b> <b>(n = 80)</b>	<b>SCD</b> <b>(n = 39)</b>	<b>ECD</b> <b>(n = 41)</b>	<b>Valor de p</b>
Idade, anos (média ± DP)	49 ± 12,3	46,3 ± 13	51 ± 11,4	0,08
Raça (Caucasiana/não caucasiana)	60/20	27/12	30/11	1,0
Gênero M(F)	48 (32)	22 (17)	26 (15)	1,0
DGF [n (%)]	70 (87,5)	33 (85)	37 (90)	0,7
Duração da DGF (dias)	14 ± 10	10 ± 9	14 ± 11	0,2
RA [n (%)]	13 (16)	5 (13)	8 (20)	0,5
HLA <i>mismatches</i>	3,5 ± 1	3,4 ± 1,1	3,5 ± 1	0,6
Creatinina sérica 12 meses (mg/dL)	1,6 ± 0,74	1,3 ± 0,4	2 ± 0,8	<b>0,0001</b>
TFG 12 meses (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	64,9 ± 34	70,5 ± 29	56,7 ± 38,3	<b>0,04</b>
Proteinúria 12 meses (g/24h)	0,32 ± 0,37	0,22 ± 0,16	0,43 ± 0,5	<b>0,04</b>
Sobrevida do enxerto 1 ano (%)	86	92	80	0,15
Sobrevida do paciente 1ano (%)	90	94	85	0,17

SCD: doador de critério padrão; ECD: doador de critério estendido; RA: rejeição aguda, DGF: função tardia do enxerto; TFG: taxa de filtração glomerular.

### **3.3 Perfil molecular de biópsias renais pré-implantação de acordo com a classificação SCD/ECD**

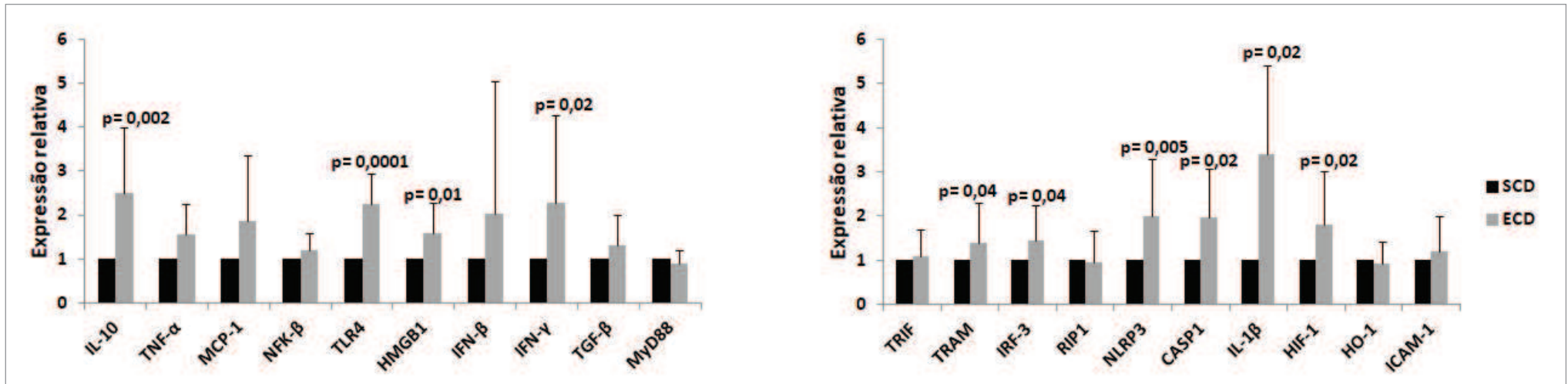
A análise de expressão gênica de Bx renais pré-implantação mostrou níveis significativamente mais elevados das moléculas IL-10, TLR4, HMGB1, IFN- $\gamma$ , TRAM, IRF-3, NLRP3, CASP1, IL-1 $\beta$  e HIF-1 nos rins ECD comparado aos rins SCD ( $p < 0,05$ ; Figura 4).

A expressão gênica de NF $\kappa$ -B, TGF- $\beta$ , MyD88, TRIF, RIP1, HO-1 e ICAM-1 foi semelhante entre os dois grupos. Embora sem significância estatística, a expressão de TNF- $\alpha$ , MCP-1 e IFN- $\beta$  foi numericamente maior no grupo ECD (Figura 4).

### **3.4 Perfil molecular de biópsias renais pré-implantação de acordo com os escores de KDPI**

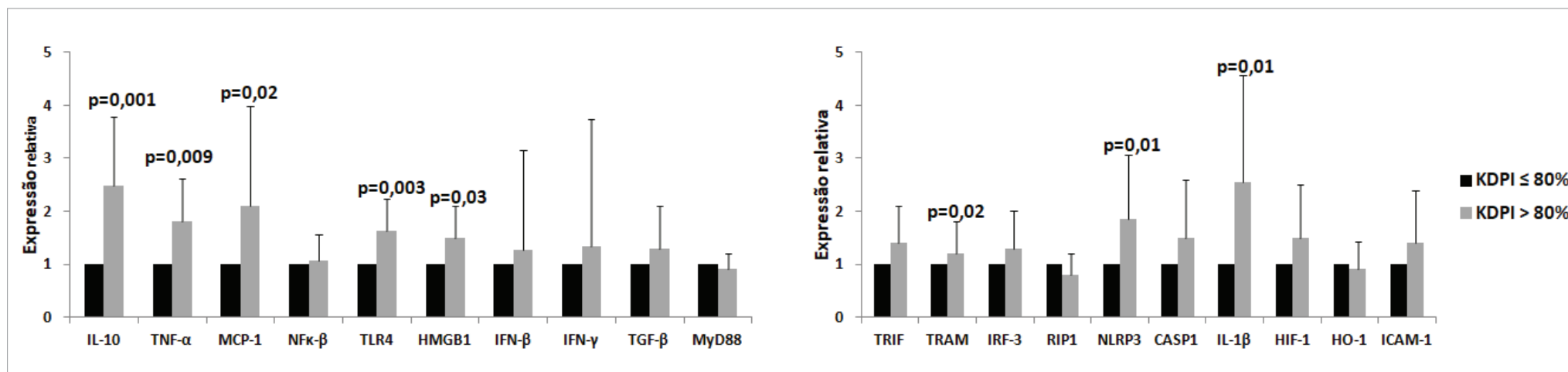
Os rins com KDPI  $> 80\%$  apresentaram níveis de expressão gênica significativamente maior das moléculas IL-10, TNF- $\alpha$ , MCP-1, TLR4, HMGB1, TRAM, NLRP3 e IL-1 $\beta$  comparado com os rins com escores de KDPI  $\leq 80\%$  (Figura 5) revelando um perfil molecular similar observado na métrica de ECD/SCD. Diferentemente dos ECDs, os rins com KDPI  $> 80\%$  também tiveram aumento isolado da expressão dos genes TNF- $\alpha$  e MCP-1, enquanto CASP1 e HIF-1 foram numericamente maior, mas sem significância estatística. (Figura 5).

Os transcritos de NF $\kappa$ -B, TGF- $\beta$ , MyD88, TRIF, RIP1, HO-1 e ICAM-1 foram semelhantes entre os grupos (Figura 5).



**Figura 4.** Expressão gênica avaliada em rins ECD vs. SCD. O grupo SCD foi usado como calibrador (RQ= 1). Os valores representam as médias e a barra representa a amplitude das variações das médias. Os valores de p são representados na figura.





**Figura 5.** Expressão gênica avaliada em rins KDPI > 80 % vs. KDPI ≤ 80%. O grupo KDPI ≤ 80% foi usado como calibrador (RQ = 1). Os valores representam as médias e a barra representa a amplitude das variações das médias. Os valores de p são representados na figura.

### 3.5 Correlações entre escores de KDPI e expressão gênica

A análise de correlação foi realizada para identificar possível correlação entre os genes diferencialmente expressos e os escores do KDPI (0-100%). O KDPI correlacionou-se positivamente com a expressão dos genes TLR4, HMGB1, NLRP3, IL-1 $\beta$ , IL-10, TRAM, CASP1, HIF-1, MCP-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ( $p > 0,05$ ), sugerindo aumento da expressão gênica com aumento da lesão renal expressa pelo escore do KDPI. Expressão de outros genes não foi correlacionada com o KDPI (Tabela 4).

**Tabela 4.** Correlação entre os níveis de expressão gênica e escores de KDPI

Gene	Coefficiente de correlação (r)	Valor de p
TLR4	0,38	0,0005
HMGB1	0,29	0,007
NLRP3	0,33	0,002
IL-1 $\beta$	0,32	0,003
IL-10	0,28	0,009
TRAM	0,22	0,04
CASP1	0,36	0,001
HIF-1	0,27	0,01
MCP-1	0,27	0,01
IFN- $\gamma$	0,40	0,0003
TNF- $\alpha$	0,37	0,007

KDPI: *kidney donor profile index*. Estatística: Correlação de Spearman.

## ***4 .DISCUSSÃO***

---

#### 4. DISCUSSÃO

Em estudo anterior observamos que, apesar de compartilhar um mesmo ambiente pró-inflamatório e hipóxico, biópsias pré-implantação de rins ECD apresentavam maior expressão de algumas citocinas inflamatórias quando comparadas aos rins SCD.<sup>(59)</sup> Neste estudo, estendemos nossas análises para outros genes, da imunidade inata e da inflamação estéril em rins ECD, e incluímos rins com KDPI > 80%, pois as duas métricas são as mais utilizadas por centros transplantadores na Europa e Américas.

Postulamos que a maior atividade inflamatória observada em rins “não ideais” (ECD e com KDPI > 80%) poderia ser devido à maior sensibilidade desses órgãos aos eventos inflamatórios gerados no processo de isquemia e preservação renal, o que poderia levar o sistema imune inato a iniciar uma inflamação estéril mais intensa e com maior impacto na resposta aloimune.

Em nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a avaliar o perfil de expressão gênica da imunidade inata em biópsias pré-implantação de rins de doadores classificados pelas métricas mais comuns usadas para aceitar ou rejeitar os rins de “baixa qualidade”.

A análise da expressão gênica, de acordo com a classificação de ECD e SCD, mostrou expressão aumentada do gene HIF-1 no grupo ECD, provavelmente devido a uma sensibilidade maior de rins ECD à lesão isquêmica do que os rins SCD. Da mesma forma, o grande impacto do estresse e dano celular que ocorrem nos rins ECD poderia ser explicado pelo aumento da expressão gênica de HMGB1 e TLR4 (Figura 4).

Níveis de HMGB1 aumentados foram relatados em órgãos danificados e quando liberados, ativam macrófagos, células dendríticas e outras células do sistema imune no

órgão, iniciando o processo de inflamação estéril.<sup>(60-62)</sup> A ligação de HMGB1 com TLR4 direciona a sinalização das vias MyD88 dependente e independente para a produção de citocinas pró-inflamatórias, expressão de moléculas de superfície celular e de quimiocinas (Figura 1).<sup>(63)</sup> Rins ECD e SCD apresentaram expressão gênica de MyD88 semelhante, porém nossos resultados sugerem que a sinalização preferencial de HMGB-1-TLR4 deve ocorrer via MyD88 independente, pois observamos o gene TRAM foi significativamente mais expresso (Figura 4). É possível que a ativação de TRAM recruta a molécula TRIF e depois interage com o TBK1 (membro da família TRAF associado a NFκ-B ligadora ativadora de quinase 1) e com IKK (complexo de kB inibitória quinase) para a fosforilação do fator de transcrição IRF3, também altamente expresso em nosso estudo (Figura 4).<sup>(40,41)</sup>

A expressão mais elevada de IL-1β, IFN-γ e IL-10 no grupo ECD, comparado ao grupo SCD, pode ser resultado do *crossstalk* entre as vias dependente e independente de MyD88, levando à ativação de NFκ-B e aumento da expressão de citocinas e outros mediadores inflamatórios da imunidade adaptativa.<sup>(39)</sup> Não podemos descartar a possibilidade de que a regulação anti-inflamatória da IL-10 pode ocorrer para neutralizar o processo inflamatório em andamento ou como parte de um processo de reparação tecidual.

Os rins ECD também apresentaram os genes NLRP3, CASP1 e IL-1β altamente expressos, sugerindo que a resposta inflamatória estéril possa ativar o complexo do inflamassoma, especialmente a proteína NLRP3 (Figura 2). É possível que células mortas e necróticas produzidas pelo ambiente hipóxico sejam capazes de ativar o inflamassoma NLPR, que por sua vez ativa a caspase-1 necessária para a secreção de formas maduras de IL-1β e IL-18 (Figura 1), corroborado pela observação dos três

genes mais expressos em nosso estudo nos rins ECD. A ativação de NLRP3 também pode ocorrer por um estímulo direto de DAMPs liberados pelo dano celular.<sup>(44)</sup>

Usando a métrica do KDPI observamos que os rins com KDPI > 80% apresentaram um perfil de transcrição muito semelhante aos rins ECD, com os genes TLR4, HMGB1, TRAM, NLRP3, IL-1 $\beta$  e IL-10 significativamente mais expressos se comparados aos rins com KDPI < 80%. Igualmente, os genes NF $\kappa$ -B, IFN- $\beta$ , MyD88, TGF- $\beta$ , TRIF, HO-1, RIP1 e ICAM-1 também foram expressos de forma similar, independentemente da classificação utilizada. A semelhança nos transcritos gênicos de “baixa qualidade” sugere que rins ECD e com KDPI > 80% reagem à lesão tecidual compartilhando vias de expressão gênica semelhantes para construir um mesmo tipo de inflamação estéril. A expressão aumentada de IRF-3, HIF-1, CASP1 e IFN- $\gamma$  nos rins ECD, mas não nos rins KDPI > 80%, pode ser devida às diferenças nas variáveis usadas para classificar os doadores pelos dois tipos de métricas, ou que os rins ECD podem estar num estágio mais avançado de lesão tecidual. Em apoio à essa ideia está a observação de que o aumento na pontuação do KDPI correlacionou-se fortemente com o aumento da expressão de HMGB1, TLR4, NLRP3, IL-1 $\beta$  e IL-10, sugerindo uma progressão na resposta inflamatória estéril e no dano renal (Tabela 3).

A expressão aumentada dos componentes moleculares das vias TLR4 e do inflamassoma observada nas biópsias pré-implantação dos rins ECD e com KDPI > 80% fornecem evidências de que esses rins de “baixa qualidade”, independentemente das métricas usadas para classificar esses órgãos, apresentaram uma resposta inflamatória estéril mais intensa que os “rins ideais”.

É possível que esse padrão de resposta inflamatória também possa afetar os desfechos clínicos inferiores como taxa de rejeição aguda e sobrevida, relatados na

literatura, uma vez que dados experimentais confirmam que a ativação de TLR4 por DAMPs depois de iniciar a resposta imune inata ativa a aloimunidade, causando disfunção aguda e crônica do enxerto e fibrose.<sup>(45,46)</sup>

Em virtude do crescimento da longevidade da população brasileira espera-se que também ocorra aumento no número de potenciais doadores com rins de “baixa qualidade” ou “não ideais”. Embora esses órgãos possam ser usados nos pacientes idosos em tratamento dialítico, é provável que também sejam alocados para receptores jovens. Portanto, o entendimento das vias de ativação da imunidade inata determinantes da ocorrência da inflamação estéril é crucial para tentar melhorar a “qualidade” dos rins ECD/KDPI > 80%. Além disso, o estudo dessas vias moleculares poderá auxiliar o transplantador na difícil tarefa de aceitar ou descartar o rim ofertado.

Finalmente, a identificação das vias de ativação da inflamação estéril pode proporcionar estratégias terapêuticas visando reduzir a atividade inflamatória desses órgãos, durante o processo de manutenção do potencial doador ou na fase de preservação desses órgãos.<sup>(45, 27-29)</sup>

## ***5 .CONCLUSÕES***

---



## 5. CONCLUSÕES

1. Genes envolvidos no processo de ativação da imunidade inata e inflamação estéril estão mais expressos nos rins classificados como ECD ou com KDPI > 80%.
2. A expressão gênica de rins ECD e de KDPI > 80% são similares sugerindo mecanismos de ativação imunológica semelhantes nos rins “não ideais” ou de “baixa qualidade”.
3. Existe uma correlação positiva entre aumento dos escores de KDPI e expressão de genes relacionados à imunidade inata.

## ***6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* 2013; 3:1-150.
2. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet.* 2013; 382:260-72.
3. Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos. Registro Brasileiro de Transplantes 2018. [internet] [acesso em 10 de abril de 2019]. Disponível em: <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2018/RBT2018-final.pdf>.
4. Censo Sociedade Brasileira de Nefrologia 2018. [internet] [acesso em 10 de abril de 2019]. Disponível em: <https://sbn.org.br>.
5. Merion RM. Expanded criteria donors for kidney transplantation. *Transplant Proceedings.* 2005; 37:3655.
6. Kim JM, Kim SJ, Joh JW, Kwon CHD, Song S, Shin M, et al. Is it safe to use a kidney from an expanded criteria donor? *Transplantation Proceedings.* 2011; 43:2359-2362.
7. Cecka JM. The OPTN/UNOS Renal Transplant Registry 2003. *Clinical Transplantation.* 2003:1-12.
8. Port FK, Bragg-Gresham JL, Metzger RA, Dykstra DM, Gillespie BW, Young EW, et al. Donor characteristics associated with reduced graft survival: an approach to expanding the pool of kidney donors. *Transplantation.* 2002; 74:1281-1286.

9. Audard V, Matignon M, Dahan K, Lang P, Grimbert P. Renal transplantation from extended criteria cadaveric donors: problems and perspectives overview. *Transpl Int.* 2008; 21:11-17.
10. Ojo AO, Hanson JA, Meier-Kriesche H, Okechukwu CN, Wolfe RA, Leichtman AB, et al. Survival in recipients of marginal cadaveric donor kidneys compared with other recipients and wait-listed transplant candidates. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2001; 12:589-597.
11. Pascual J, Zamora J, Pirsch JD. A systematic review of kidney transplantation from expanded criteria donors. *American Journal of Kidney Diseases.* 2008; 52: 553-586.
12. Miles CD, Schaubel DE, Jia X, Ojo AO, Port FK, Rao PS. Mortality experience in recipients undergoing repeat transplantation with expanded criteria donor and non-ECD deceased-donor kidneys. *Am J Transplant* 2007; 7:1140.
13. Grifasi C, D'Alessandro V, D'Armiento M, Campione S, Scotti A, Pelosio L, et al. Can only histological evaluation determine the allocation of ECD kidneys? *BMC Nephrology.* 2014; 15:207.
14. Schold JD, Howard RJ, Scicchitano MJ, Meier-Kriesch HU. The expanded criteria donor policy: An evaluation of program objectives and indirect ramifications. *American Journal of Transplantation.* 2006; 6:1689–1695.
15. Aubert O, Kamar N, Vernerey D, Viglietti D, Martinez F, Duong-Van-Huyen JP, et al. Long term outcomes of transplantation using kidneys from expanded criteria donors: prospective, population based cohort study. *BMJ* 2015; 351:3557.

16. Rao PS, Schaubel DE, Guidinger MK, Andreoni KA, Wolfe RA, Merion RM, et al. A comprehensive risk quantification score for deceased donor kidneys: the kidney donor risk index. *Transplantation*. 2009; 88:231-6.
17. Ojo AO, Wolf RA, Held PJ, Prot FK, Schmourder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation*. 1997; 63:968-974.
18. Mayer G, Persijn GG. Eurotransplant Kidney Allocation System (ETKAS) rationale and implementation. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21:2-3.
19. Anglicheau D, Loupy A, Lefaucheur C, Pessione F, Létourneau I, Côté I, et al. A simple clinic-histopathological composite scoring system is highly predictive of graft outcome in marginal donors. *Am J Transplant*. 2008; 8:2325-2334.
20. Ramalho ALAS, Custodio FB, Tokuda BM, Caldas HC, Fernandes IM, Abbud-Filho M, et al. Clinical and Histopathologic Comparative Analysis Between Kidney Transplant Recipients from Expanded-Criteria Donors and Standard-Criteria Donors. *Transplantation Proceedings*. 2013; 45:3234-3238.
21. Dare AJ, Pettigrew GJ, Saeb-Parsy K. Preoperative assessment of the deceased-donor kidney: from macroscopic appearance to molecular biomarkers. *Transplantation*. 2014; 97:797-807.
22. Lopes K, Alves R, Neto PA, Macário F, Mota A. The prognostic value of pre-implantation graft biopsy on the outcomes of renal transplantations. *Transplant Proceedings*. 2011; 43:67-69.
23. Mas VR, Scian MJ, Archer KJ, Suh JL, David KG, Ren Q, et al. Pretransplant transcriptome profiles identify among kidneys with delayed graft function those with poorer quality and outcome. *Molecular Medicine*. 2011; 17:1311-1322.

24. Mas VR, Archer KJ, Yanek K, Dumur CI, Capparuccini MI, Mangino MJ, et al. Gene expression patterns in deceased donor kidneys developing delayed graft function after kidney transplantation. *Transplantation*. 2008; 85:626-635
25. Andrade-Oliveira V, Campos EF, Goncalves-Primo A, Grenzi PC, Medina-Pestana JO, Tedesco-Silva H, et al. TLR4 mRNA levels as tools to estimate risk for early posttransplantation kidney graft dysfunction. *Transplantation*. 2012; 94:589-595.
26. Guerrieri D, Re L, Petroni J, Ambrosi N, Pilottiet RE, et al. Gene expression profile in delay graft function: Inflammatory markers are associated with recipient and donor risk factors. *Mediators Inflamm*. 2014; 2014:167361.
27. Saat TC, Susa D, Roest HP, Ko. A comparison of inflammatory, cytoprotective and injury gene expression profiles in kidneys from brain death and cardiac death donors. *Transplantation*. 2014; 98:15-21.
28. McKay DB. The role of innate immunity in donor organ procurement. *Semin Immunopathol*. 2011; 33:169-184.
29. Ojo AO. Expanded criteria donors: process and outcomes. *Semin Dial*. 2005; 18:463-468.
30. Kayler LK, Magliocca J, Zendejas L, Srinivas TR, Schold JD. Impact of cold ischemia time on graft survival among ECD transplant recipients: A paired kidney analysis. *Am J Transplant*. 2011; 11:2647-2656.
31. Gorayeb-Polacchini FS, Caldas HC, Gauch CR, Ferreira-Baptista MAS, Fernandes-Charpiot IMM, Abbud-Filho M. Factors That Influence Delayed Graft Function in Kidney Transplants: A Single-Center Paired Kidney Analysis. *Transplant Proc*. 2019; 51:1568-1570.

32. Requião-Moura LR, Durão Mde S, Tonato EJ, Matos AC, Ozaki KS, Câmara NO, et al. Effects of ischemia and reperfusion injury on long-term graft function. *Transplantation Proceedings*. 2011; 43:70-3. 24.
33. Pfaff WW, Howard RJ, Patton PR, Adams VR, Rosen CB, Reed AI. Delayed graft function after renal transplantation. *Transplantation*. 1998; 65:219-223.
34. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002; 296:301-305.
35. Kasimsetty SG, McKay. DB Ischemia as a factor affecting innate immune responses in kidney transplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2016; 25:3-11.
36. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol*. 2010; 28:321-342.
37. Cucchiari D, Podestá M, Ponticelli C. The critical role of innate immunity in kidney transplantation. *Nephron*. 2016; 132:227–237.
38. O’Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol*. 2007; 7:353-364
39. Yang Y, Lv J, Jiang S, et al. The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation. *Cell Death Dis*. 2016; 7:e2234.
40. Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, Bryant CE. Assembly and localization of Toll-like receptor signaling complexes. *Nat Rev Immuno*. 2014; 14:546–558.
41. Tatematsu M, Ishii A, Oshiumi H, Horiuchi M, Inagaki F, Seya T, et al. A molecular mechanism for Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1-mediated IRF-3 activation. *J Biol Chem*. 2010; 285:20128–20136.
42. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2018; 9:7204–7218.

43. Kamo N, Ke B, Ghaffari AA, Shen XD, Busuttil RW, Cheng G, et al. ASC/caspase-1/IL-1 $\beta$  signaling triggers inflammatory responses by promoting HMGB1 induction in liver ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*. 2013; 58:351–362.
44. Gholamnezhadjafari R, Tajik N, Falak R, Aflatoonian R, Dehghan S, Rezaei A. Innate inflammatory gene expression profiling in potential brain-dead donors: detailed investigation of the effect of common corticosteroid therapy. *Innate Immun*. 2017; 23:440-448.
45. McDonald B, Kubes P. Innate immune cell trafficking and function during sterile inflammation of the liver. *Gastroenterology*. 2016; 151:1087–1095.
46. Todd JL, Palmer SM. Danger signals in regulating the immune response to solid organ transplantation. *J Clin Invest*. 2017; 127:2464–2472.
47. Song L, Pei L, Yao S, Wu Y and Shang Y. (2017). NLRP3 inflammasome in neurological diseases, from functions to therapies. *Front. Cell. Neurosci*. 2017; 11:63.
48. Weigt SS, Palchevskiy V, Belperio JA. Inflammasomes and IL-1 biology in the pathogenesis of allograft dysfunction. *J Clin Invest*. 2017; 127:2022-2029.
49. Guo HC, Jin Y, Zhi XY, Yan D, Sun SQ. NLRP3 Inflammasome Activation by Viroporins of Animal Viruses. *Viruses*. 2015; 7:3380-3391.
50. Hashmp SF, Sattar MZA, Rathore HA, Ahmadi A, Johns EJ. A critical review on pharmacological significance of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) on NF-KB concentration and ICAM-1 expression in renal ischemia reperfusion injury. *Acta Pol Pharm*. 2017; 74:747-752.
51. Gozzelino R1, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010; 50:323-354.




- 
52. Wagner M, Cadetg P, Ruf R, Mazzucchelli L, Ferrari P, Redaelli CA. Heme oxygenase-1 attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis and improves survival in rat renal allografts. *Kidney Int.* 2003;63:1564-1573.
53. Akhtar MZ, Sutherland A, Huang H, Ploeg RJ, Pugh CW. The role of hypoxia-inducible factors in organ donation and transplantation: the current perspective and future opportunities. *Am J Transplant.* 2014; 14:1481-1487.
54. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant.* 2008; 8:753-760.
55. Rickham PP. Human Experimentation. Code of Ethics of the World Medical Association. Declaration of Helsinki. *British medical journal.* 1964; 2(5402):177.
56. Danovitch GM, Chapman J, Capron A, Levin A, Abbud-Filho M, Al Mousawi M, et al. Organ trafficking and transplant tourism: the role of global professional ethical standards-the 2008 Declaration of Istanbul. *Transplantation.* 2013; 95:1306.
57. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25:402-408.
58. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of theRoyal Statistical Society—Series B:Methodological,*1995; 57:289–300.
59. Mazeti-Felicio CM, Caldas HC, Fernandes-Charpiot IMM, Dezotti CZ, Baptista MASF, Abbud-Filho M. Preimplantation kidney biopsies of extended criteria donors have a heavier inflammatory burden than kidneys from standard criteria donors. *Transplant Direct.* 2017; 23;3:e180.

60. Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, et al. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med.* 2005; 201:1135–1143.
61. Wu H, Ma J, Wang P, Corpuz TM, Panchapakesan U, Wyburn KR, et al. HMGB1 contributes to kidney ischemia reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol.* 2010; 21:1878–1890.
62. Rabadi MM, Ghaly T, Goligorsky MS, Ratliff BB. HMGB1 in renal ischemic injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012; 303:873–885.
63. Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, et al. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med.* 2005; 201:1135-1143.



## Anexo I. Aprovações do Comitê de Ética em Pesquisa



Comitê de Ética em  
Pesquisa em Seres Humanos  
CEP/FAMERP


Parecer n.º 1.021.915

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O projeto de pesquisa **CAAE 42707215.5.0000.5415** sob a responsabilidade de **Mario Abbud Filho** com o título "Identificação de biomarcadores moleculares em rins de doadores de critérios estendidos" está de acordo com a resolução do CNS 466/12 e foi **aprovado por esse CEP**.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) **deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo**, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos e também da notificação da data de inclusão do primeiro participante de pesquisa, para conhecimento deste Comitê. **Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.**

São José do Rio Preto, 14 de abril de 2015.

  
**Prof. Dr. Luciano Garcia Lourenção**  
Coordenador do CEP/FAMERP

17 3201 8613  
cep@famerp.br  
Av. Brigadeiro Faria Lima 5416 | Vila São Pedro  
15090-000 | São José do Rio Preto SP  
www.famerp.br/cep