



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

Camila Montoro Mazeti Felício

**Avaliação do Perfil Molecular Inflamatório
em Rins de Doadores com Critérios
Estendidos**

São José do Rio Preto
2016

Camila Montoro Mazeti Felício

Avaliação do perfil molecular inflamatório em rins de doadores com critérios estendidos

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

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Heloisa Cristina Caldas

São José do Rio Preto

2016

Mazeti-Felício, Camila Montoro

Avaliação do perfil molecular inflamatório em rins de doadores de critérios estendidos/ Camila Montoro Mazeti Felício

São José do Rio Preto, 2016

110 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. Doador com critérios estendidos; 3. Inibidores de calcineurina; 4. Inibidores da mTOR.

Camila Montoro Mazeti Felício

**Avaliação do perfil molecular inflamatório
em rins de doadores com critérios estendidos**

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Mario Abbud Filho

2º Examinador: Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro

3º Examinador: Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile

4º Examinador: Prof^a. Dr^a. Dorotéia Rossi Silva Souza

5º Examinador: Prof. Dr. Miguel Zerati Filho

Suplentes: Prof^a. Dr^a. Ida Maria M. Fernandes Charpiot

Prof^a. Dr^a. Rosa S. Kawasaki Oyama

São José do Rio Preto, 23 de março de 2016.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	iv
Lista de Quadros e Tabelas.....	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	vii
Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. Transplante renal e tipos de doadores.....	2
1.2. Função tardia do enxerto – DGF.....	4
1.3. Eventos imunológicos associados à morte encefálica do doador e a lesão de isquemia e reperfusão.....	5
1.4. A resposta imune no transplante renal – mecanismos imuno-inflamatórios...	6
1.5. Análises histológicas e moleculares.....	9
1.6. Imunossupressão.....	10
1.7. Objetivos.....	12
2. Casuística e Métodos.....	13
2.1. Desenho do estudo e casuística.....	14
2.2. Critérios de inclusão.....	14
2.3. Critérios de exclusão.....	14
2.4. Regimes de imunossupressão.....	15
2.5. Definições.....	16
2.6. Protocolo de biópsias e definições histológicas.....	17
2.7. Extração e quantificação do RNA total das biópsias renais.....	17

2.8. Transcrição reversa do RNA total e confecção do DNA complementar (DNAc).....	18
2.9. Quantificação da expressão gênica intra-enxerto.....	19
2.10. Análises estatísticas.....	19
3. Resultados.....	21
3.1. Características demográficas de doadores e receptores de acordo com o tipo de rim.....	22
3.2. Dados demográficos e clínicos de receptores de acordo com o tipo de imunossupressão.....	24
3.3. Dados demográficos e clínicos de receptores de acordo com o tipo de rim e imunossupressão.....	24
3.4. Achados histológicos.....	28
3.5. Perfil molecular de biópsias pré-implantação (T0).....	30
3.6. Perfil molecular de biópsias T15 e T90, tipo de doador e regimes de imunossupressão.....	33
4. Discussão.....	40
5. Conclusões.....	46
6. Referências bibliográficas.....	48
7. Apêndices.....	62
Apêndice I. Artigo científico submetido ao <i>American Journal of Transplantation</i>	63
8. Anexos.....	98
Anexo I. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	99
Anexo II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	100

*Ao meu esposo Thiago L. Felício,
Aquele que incondicionalmente compartilhou dos meus sonhos, me incentivou e
me ajudou a realizá-los. Meu eterno amor.*

*Aos meus pais Adevair e Edna M. M. Mazeti
Por me ensinarem valiosas lições e me guiarem nos caminhos da honestidade com todo
amor e dedicação.*

Agradecimentos

À Deus

Aquele que me direciona, apoia, consola e dá forças. Por todos os momentos em que estive ao meu lado, me auxiliando na transposição dos obstáculos para que eu pudesse evoluir.

À minha família

Por sempre acreditar em mim e em meus sonhos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mario Abbud Filho

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

À minha co-orientadora Prof^a Dra. Heloisa Cristina Caldas

Pela amizade, ensinamentos de vida e por todo o apoio. Minha eterna gratidão.

A toda a equipe do Laboratório de Imunologia e Transplante Experimental (LITEX)

Cinthia Dias, Greiciane Maria da Silva Florim, Priscila Mata Camargo, Camila Ravazzi Gauchi, Brenda Caroline A. Violim, Natália Alves Fiorilli, Glória Elisa F. Mendes, Camila Zangrossi Dezotti e Julio C. Razera de Melo.

Pela amizade, entusiasmo, carinho e paciência.

À Prof^a Dra Dorotéia R. S. Souza e Prof^a Dra Marcela A. de Souza Pinhel

Por me receberem em seu laboratório, por tudo que me ensinaram e contribuíram para o meu amadurecimento científico e pessoal.

Aos amigos do bloco U-6

Pelo convívio, carinho e alegria de todos.

À Dra. Ida M. Maximina Fernandes

Por toda a ajuda, pelos ensinamentos, pelos sorrisos e amizade.

À Dra. Maria Alice S. Ferreira Baptista

Pelas análises das biópsias renais, pela amizade e disponibilidade.

Aos residentes de Nefrologia e as equipes transplantadoras do Hospital de Base de São José do Rio Preto

Pelo auxílio e disposição em ajudar sempre.

Às pacientes que participaram deste estudo

Pela participação e pelo aprendizado.

Aos funcionários da Pós-graduação da FAMERP

Por estarem sempre dispostos a ajudar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior - CAPES

Pelo incentivo educacional e apoio financeiro.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

(Charles Chaplin)

Lista de Quadros e Tabelas

Quadro 1.	Fatores de risco para DGF relacionados ao doador, órgão, receptor e ao procedimento cirúrgico.....	4
Quadro 2.	Moléculas estudadas, principais funções e células secretoras.....	8
Tabela 1.	Características de doadores e receptores e dados do transplante.....	23
Tabela 2.	Demografia e informações clínicas relevantes de acordo com a imunossupressão e tipo de doador.....	26
Tabela 3.	Complicações infecciosas e cirúrgicas.....	27
Tabela 4.	Histologia das biópsias pré-implante e biópsias 15 e 90 dias pós-transplante por tipo de doador e imunossupressor.....	29
Tabela 5.	Regressão linear múltipla da associação entre as variáveis do doador e as expressões gênicas em biópsias T0.....	32
Tabela 6.	Análises de regressão logística dos fatores de risco e expressões gênicas em biópsias T15.....	36
Tabela 7.	Análises de regressão logística dos fatores de risco e expressões gênicas em biópsias T90.....	37

Lista de Figuras

Figura 1.	Fluxograma da população de pacientes e disposições dos grupos estudados.....	16
Figura 2.	Representação esquemática por "box-plot" de valores de mediana e quartis dos níveis de expressão de RNAm em biópsias pré-implantação (T0).....	31
Figura 3.	Representação esquemática por "box-plot" de valores de mediana e quartis dos níveis de expressão de RNAm em biópsias 15 dias após o transplante (T15).....	34
Figura 4.	Representação esquemática por "box-plot" de valores de mediana e quartis dos níveis de expressão de RNAm em biópsias 90 dias após o transplante (T90).....	35
Figura 5.	Expressão gênica relativa de mRNA de FOXP3, TGF- β 1, MCP-1, RANTES e IL-10 a partir dos valores de expressão basal (T0) em relação às expressões de biópsias T15 e T90 (delta).....	39

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Bx	Biópsia
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCL2	Ligante de citocina C-C do tipo 2
CCL5	Ligante de citocina C-C do tipo 5
CD4+	Cluster de diferenciação 4 positivo
CD8+	Cluster de diferenciação 8 positivo
CD25+	Cluster de diferenciação 25 positivo
CMV	Citomegalovírus
Ct	Ciclo threshold
DAMPs	<i>Damage associated molecular pattern</i> = padrões moleculares associados a danos
DCE ou ECD	Doador com critérios estendidos
DCS ou SCD	Doador de critério padrão
DEPC	Dietilpirocarbonato
DGF	<i>Delayed graft function</i> = função tardia do enxerto
DMPT	Diabetes mellitus pós-transplante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementar
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DP	Desvio padrão
Eve	Everolimo
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FOXP3	Forkhead box P3
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> = gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> = antígeno leucocitário humano
IC	Intervalo de confiança
ICN	Inibidor da calcineurina
IFTA	Fibrose intersticial e atrofia tubular
IL-10	Interleucina 10
IRC	Insuficiência renal crônica
ISS	Imunossupressão
I/R	Isquemia e reperfusão
LITEX	Laboratório de Imunologia e Transplante Experimental
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> = proteína de atração para monócitos-1
ME	Morte encefálica

mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i> = proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NK	<i>Natural killer</i>
p	Nível de significância
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> = Reação em Cadeia da Polimerase
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RA	Rejeição aguda
RANTES	<i>Regulated Upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted</i>
RACB	Rejeição aguda comprovada por biópsia
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RTx	Receptores de transplante renal
RT-PCR	Transcrição reversa por reação em cadeia da polimerase
sCr	Creatinina sérica
Tac	Tacrolimo
TFG	Taxa de filtração glomerular
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF-β1	<i>Transforming growth factor beta 1</i> = Fator de transformação do crescimento beta 1
TIF	Tempo de isquemia fria

<i>Tregs</i>	Células T reguladoras
Tx	Transplante
β - actina	Beta actina
$\Delta\Delta Ct$	Delta delta do ciclo <i>threshol</i> d

Resumo

Introdução: O uso de rins de doadores com critérios estendidos (DCE) está associado com órgãos de qualidade inferior e, por isso acabam gerando alta taxa de descarte desses órgãos. Os métodos clínicos e histológicos usados como ferramentas para avaliar os órgãos “não ideais” e prever os desfechos dos DCE têm resultados conflitantes.

Objetivos: Avaliar as diferenças na expressão gênica de biópsias (Bx) renais em DCE e doadores com critérios padrões (DCS) no pré e pós-transplante (Tx) e buscar possíveis alterações induzidas pelos regimes de imunossupressão (ISS). **Metodologia:** Receptores (RTx) de DCS e DCE foram randomizados para tacrolimo (Tac) ou everolimo (Eve) e as Bx foram coletadas no pré-transplante (T0 Bx; n = 80) e após 15 (T15 Bx; n = 64) e 90 dias (T90 Bx; n = 51) pós-Tx. Os subgrupos DCS-Tac, DCE-Tac, DCS-Eve e DCE-Eve foram analisados para os desfechos clínicos e os dados foram correlacionados com a expressão gênica intra-enxerto. **Resultados:** Receptores de DCE-Eve e DCE-Tac tiveram menor sobrevida em um ano pós-Tx. Infecção por citomegalovírus e diabetes mellitus pós-Tx foram maiores em pacientes tratados com Tac. Após um ano, receptores de DCE-Eve apresentaram creatinina sérica (sCr) mais elevada do que DCE-Tac. As taxas de rejeição aguda foram maiores no grupo Eve, independente do tipo de doador. Bx T0 de rins de DCE mostraram maior expressão de MCP-1, RANTES, TGF- β 1 e IL-10 quando comparado com rins de DCS. TGF- β 1 foi relacionado com a sCr na retirada do órgão, enquanto que o tempo de hospitalização de DCE foi associado com maior expressão de MCP-1 e RANTES. Bx T15 de pacientes dos grupos Eve apresentaram aumento de FOXP3 e MCP-1. A expressão de RANTES foi mais elevada no grupo DCS-Eve. O uso de Eve foi à única variável associada com maior expressão de FOXP3, MCP-1 e RANTES. O perfil das Bx após 90 dias foi similar exceto pelo aumento dos

transcritos de FOXP3 restritos ao grupo DCS-Eve. A maior expressão de FOXP3 foi associada com o uso de Eve e a função tardia do enxerto com o aumento na expressão de MCP-1 e IL-10. Foram subtraídos das Bx T15 e T90, os valores de expressão gênica obtidos nas Bx T0, e dois tipos distintos de perfil molecular foram encontrados para DCS e DCE. Rins de DCS apresentaram maior expressão para todas as moléculas, exceto TGF- β 1, independentemente do regime de ISS. Os rins de DCE mostraram menor expressão para as mesmas moléculas, exceto por aumento discreto na expressão de FOXP3 e RANTES. **Conclusão:** Bx pré-implantação de rins de DCE tiveram um perfil molecular inflamatório diferente de rins de DCS, com maior expressão de RANTES, MCP-1, TGF- β 1 e IL-10. No pós-Tx, a ISS modificou o padrão inicial de expressão de citocinas nos tempos estudados.

Palavras-chave: Transplante Renal; Doador com Critérios Estendidos, Inibidor da Calcineurina; Inibidor da mTOR, Tacrolimo, Everolimo, Imunossupressão.

Abstract

Background: The use of kidneys from extended criteria donors (ECD) is associated with organs of inferior quality and, therefore, a high discarding rate. Clinical and histological tools available to assess non-ideal organs and predict outcomes of ECD have conflicting results. **Objectives:** To evaluate differences in the intragraft cytokine genes expression in ECD and SCD (standard criteria donors) kidney biopsies (Bx) pre and post-transplant (Tx) and sought possible changes induced by immunosuppressive regimens (ISS). **Methodology:** SCD and ECD recipients (RTx) were randomized to tacrolimus (Tac) or everolimus (Eve) and Bx were collected pre-implantation (T0 Bx; n = 80) and after 15 (T15 Bx; n = 64) and 90 days (T90 Bx; n = 51) post-Tx. Subgroups SCD-Tac, ECD-Tac, SCD-Eve and ECD-Eve were analyzed for clinical outcomes and clinical data were correlated with intragraft gene expression. **Results:** Overall, ECD-Eve and ECD-Tac had inferior one-year patient survival and ECD-Tac had lower graft survival than other groups while cytomegalovirus and de novo diabetes pos-Tx were higher in patients with Tac. After one year ECD-Eve patients had higher serum creatinine than ECD-Tac ($p = 0.03$). Acute rejection rates were higher in Eve group regardless donor type. T0 Bx of ECD showed higher expression of MCP-1, RANTES, TGF- β 1 and IL-10 when compared with SCD. TGF- β 1 related to the serum creatinine at harvesting the organ while length of donor hospitalization and ECD donor type were associated with upregulation of MCP-1 and RANTES. T15 Bx of patients from both groups taking Eve had increased FOXP3 and MCP-1. RANTES were upregulated only in the SCD-Eve group. Eve was the only variable associated with upregulation of FOXP3, MCP-1 and RANTES. Molecular profiling at T90 was similar except by an increase in FOXP3 transcripts restrict to SCD-Eve group. Positive expression of FOXP3

was associated with the use of Everolimus and delayed graft function (DGF) with the increased expression of MCP-1 and IL -10. We subtracted from Bx T15 and T90 gene expression values obtained in Bx T0 and two distinct types of molecular profile were found to SCD and ECD. SCD kidneys showed upregulation for all molecules, except TGF- β 1 regardless of the ISS system, and ECD kidneys showed negative regulatory molecules for the same, except for slight positive FOXP3 and RANTES expressions. **Conclusion:** Pre-implantation Bx of ECD kidneys had an inflammatory molecular profile clearly distinct from SCD, with higher expression of RANTES, MCP-1, TGF- β 1 and IL-10. Post-Tx, the ISS given modifies the initial cytokine expression pattern at different time points.

Keywords: Kidney Transplantation; Extended Criteria Donor; Calcineurin Inhibitor, mTOR Inhibitor, Tacrolimus, Everolimus, Immunosuppression.

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 (IRC) em estágio terminal, pois permite melhorar a qualidade de vida e prolongar a sobrevida do paciente.⁽¹⁻³⁾

O principal problema dos transplantes é o número reduzido de órgãos, insuficiente para suprir a demanda cada vez maior dos pacientes que aguardam em lista de espera. Este fato tem motivado os centros de transplante a buscar formas alternativas de alocação de órgãos e utilizarem rins de doadores falecidos com critérios diferentes do “padrão” tradicionalmente utilizado (DCS) e, por isso, denominados rins de doadores com critérios estendidos (DCE).⁽¹⁻¹⁶⁾

Em 2002 foi definido que doadores falecidos com ≥ 60 anos de idade ou aqueles com idade entre 50 a 59 anos, possuindo pelo menos dois de três critérios: história de hipertensão arterial sistêmica (HAS), creatinina sérica maior que 1,5 mg/dL quando retirado o órgão ou doença cerebrovascular como causa do óbito seriam considerados como DCE.⁽⁵⁾ Estas diretrizes foram desenvolvidas para identificar doadores falecidos com fatores de risco, aumentar a disponibilidade de órgãos e melhorar a eficiência do processo de alocação.⁽¹⁶⁾

Desde então difundiram-se os estudos relacionados com rins de DCE, principalmente aqueles referentes aos desfechos com esse tipo de órgão. Em estudo realizado com receptores de Tx renal (RTx) alocados em uma lista específica para DCE foi observado que houve redução do tempo de espera para o procedimento e que esses pacientes tiveram benefícios em termos de sobrevida.⁽¹⁶⁾ Lee et al., observaram que rins de DCE apresentavam menor débito urinário no pós-operatório, porém a sobrevida do enxerto era semelhante em um ano pós-Tx, quando comparado com rins de DCS.⁽¹⁷⁾ Em

revisão de literatura Pascual et al. mostraram que, na maioria dos estudos multicêntricos, os RTx de rins de DCE apresentaram sobrevida inferior do enxerto e do paciente quando comparados à dos receptores de rins de DCS. Porém, alguns estudos de centro único relataram sobrevidas do paciente e do enxerto semelhantes para ambos os tipos de doadores.⁽¹⁰⁾ Stratta e cols duplicaram o número de Tx em um ano com os rins de DCE, sendo que a sobrevida dos RTx e enxertos provenientes deste tipo de doador assemelhavam-se com as dos Tx com rins de DCS após um ano. Porém após cinco anos, as sobrevidas dos receptores de rins de DCE eram inferiores.⁽¹⁸⁾ RTx de rins de DCE apresentaram maior risco relativo de perda do enxerto quando comparados com RTx de doadores mais jovens sem nenhuma das três comorbidades que definem DCE.⁽¹⁾ Entretanto, apesar da menor sobrevida do enxerto o uso de rins de DCE proporcionou melhor sobrevivência para alguns tipos específicos de receptores do que quando comparados à permanência em diálise.⁽⁸⁾

Estudos de Tx com rins de DCE têm mostrado maior ocorrência de função tardia do enxerto (*Delayed Graft Function* – DGF), infecção, taxas mais elevadas de complicações cardiovasculares e hospitalizações mais longas quando comparados aos transplantes feitos com rins de DCS.⁽¹²⁾

Entretanto, o uso de rins de DCE ainda tem gerado controvérsia, embora sua utilização tem aumentado em todo o mundo. Atualmente nos EUA rins de DCE representam cerca de 30% dos Tx realizados enquanto que em nosso serviço 25% dos Tx são realizados com rins de DCE (dados não publicados).⁽¹⁹⁾ Estudos recomendam que rins de DCE sejam alocados preferencialmente para um grupo específico de pacientes: maiores de 60 anos, diabéticos, pacientes com acesso vascular limitado, não sensibilizados e aqueles em lista de espera por mais de 44 meses.^(7,10,20)

1.2. Função tardia do enxerto (DGF)

DGF é a complicação pós-transplante mais comumente observada em Tx com rins de doadores falecidos e com frequência de aproximadamente 70% no Brasil.⁽²¹⁾

DGF é definida como a necessidade de diálise na primeira semana pós-Tx e está associada com maior risco de rejeição aguda (RA), pior função renal pós-Tx e menores sobrevidas do paciente e do enxerto.^(12,21-28)

Vários fatores relacionados ao doador, receptor, ao órgão transplantado e ao procedimento do Tx parecem contribuir para o desenvolvimento da DGF (Quadro 1).^(29,30)

Quadro 1: Fatores de risco para DGF relacionados ao doador, órgão, receptor e ao procedimento cirúrgico.

Doador	Receptor	Órgão/Procedimento
Idade	Idade	Tempo de isquemia fria
Peso	Peso	Tipo de solução de perfusão
Causa da morte	Tempo de diálise	Anormalidades vasculares
Creatinina	Tipo de diálise	Números de <i>mismatches</i> do HLA
Duração da ventilação	Causa da IRC	Protocolo de indução de ISS
Tipo de retirada do órgão	Comorbidades	Pressão central venosa na reperusão
IRC: Insuficiência renal crônica HLA: Antígeno leucocitário humano ISS: Imunossupressão		

Dentre os fatores de risco para DGF o tempo de isquemia fria (TIF), que é definido como o tempo entre a remoção do órgão com o armazenamento a frio e início da reperfusão após a completa anastomose arterial, parece desenvolver um papel primordial na ocorrência deste desfecho.⁽³¹⁻³⁴⁾ Apesar do resfriamento do órgão, diminuir o metabolismo celular, o TIF prolongado causa lesão tecidual significativa e pode influenciar na sobrevida do enxerto.⁽³²⁻³⁴⁾

Os mecanismos envolvidos na patogênese da DGF não são claros, mas parecem estar relacionados com a lesão de isquemia e reperfusão (I/R). A hipóxia do órgão e a lesão causada pelos radicais livres de oxigênio na reperfusão ativam os linfócitos T que liberam citocinas inflamatórias.⁽³⁵⁾ Além de participarem ativamente no processo de DGF, a maior expressão dessas citocinas inflamatórias e de seus receptores está associada com a ocorrência de rejeição aguda (RA) e desenvolvimento de lesões crônicas do enxerto.⁽³⁶⁻⁴⁰⁾

A inflamação tecidual desencadeada pós-morte cerebral do doador também poderia causar uma maior expressão de moléculas inflamatórias e também colaborar para os desfechos do pós-Tx.⁽⁴⁰⁾

1.3. Eventos imunológicos associados à morte encefálica do doador e a lesão de isquemia e reperfusão

Órgãos provenientes de doadores com morte encefálica (ME) são a principal fonte de órgãos utilizados no Tx. No entanto, quando comparados com órgãos de doadores vivos, os rins de doadores falecidos têm um risco significativamente aumentado de DGF e pior sobrevida do enxerto.⁽⁴¹⁾ O estado fisiológico de morte cerebral seguido pela preservação do órgão por longos períodos de tempo, associado

com o evento de I/R são relatados como os que influenciam o desfecho do Tx renal.⁽⁴¹⁻⁴³⁾

A ME do doador desencadeia a instabilidade hemodinâmica, hipotermia, desequilíbrio hidroeletrolítico, estimulação do sistema nervoso autônomo com liberação de grande quantidade de catecolaminas e após a perfusão dos órgãos, alterações do sistema do complemento.^(41,42)

Existem relatos sobre as alterações moleculares e ativação do sistema imunológico no rim do doador após morte cerebral demonstrando a ocorrência da ativação de mediadores inflamatórios e extensa resposta local de citocinas que parecem favorecer piores desfechos a curto e longo prazo no receptor.⁽⁴²⁻⁴⁴⁾

1.4. A resposta imune no transplante renal – mecanismos imuno-inflamatórios

O Tx renal pode ser visto como um processo de intensa reação inflamatória, onde um órgão proveniente do doador, repleto de antígenos, é apresentado ao sistema imune do receptor que responde com liberação de moléculas como mediadores desse processo.^(45,46)

Por essa razão, existe grande interesse no estudo de marcadores inflamatórios no pré-transplante com objetivo de estimar ou prever o risco de DGF, rejeição e a perda do enxerto.^(38,45,46)

As citocinas são proteínas solúveis, de baixo peso molecular, produzidas geralmente em resposta ao estímulo antigênico e que funcionam como mensageiros químicos para regulação do sistema imune adaptativo e inato. Estas proteínas são produzidas por todas as células envolvidas na resposta e na apresentação de antígeno, especialmente pelos linfócitos T *helper*.^(45,46)

De acordo com Hu et al., as citocinas podem influenciar o enxerto renal pelo recrutamento de leucócitos polimorfonucleares diante o processo de I/R e pela liberação de fatores inflamatórios e tróficos que desencadeiam RA, fibrose intersticial e atrofia tubular (IFTA).⁽⁴⁷⁾

Várias citocinas têm sido pesquisadas no sangue, urina e no tecido renal de transplantados renais.⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾ No quadro 2 estão selecionadas algumas citocinas cuja análise da expressão gênica terá relevância no contexto deste trabalho e suas respectivas funções, assim como as principais células que as secretam.

Quadro 2: Moléculas estudadas, principais funções e células secretoras.

Molécula	Sigla	Secreção	Alvos e efeitos	Referências bibliográficas
<i>Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted</i>	RANTES	Células T CD8+, células epiteliais, fibroblastos e plaquetas.	Induz migração de leucócitos; Controla o tráfego de monócitos, basófilos, eosinófilos e células <i>natural killer</i> (NK).	Appay e Rowland-Jones ⁽⁵¹⁾ ; Krensky e Ahn ⁽⁵²⁾
Proteína de atração para monócitos-1	MCP-1	Células epiteliais e endoteliais, fibroblastos, monócitos, células T de memória, células dendríticas.	Atração de monócitos.	Viedt e Orth ⁽⁵³⁾ ; Yadav, Saini e Arora ⁽⁵⁴⁾
Fator de transformação do crescimento - beta 1	TGF-β1	Plaquetas, células T, macrófagos, monócitos e células mesangiais.	Inibição da proliferação das funções efectoras das células T, da proliferação de células B e de macrófagos.	Sharma et al. ⁽⁵⁵⁾ ; Pribylova- Hribova et al. ⁽⁵⁶⁾ ; Saigo et al. ⁽⁵⁷⁾
Interleucina-10	IL-10	Monócitos, macrófagos, células NK, células T <i>helper</i> 2, células dendríticas e células B.	Inibição da ativação de células dendríticas e macrófagos.	Hribova et al. ⁽⁴⁶⁾ ; Sinuani et al. ⁽⁵⁸⁾ ; Hueso et al. ⁽⁵⁹⁾
<i>Forkhead box P3</i>	FOXP3	Células T reguladoras CD4+ CD25+	Reprimem a proliferação de células T efectoras.	Veronese et al. ⁽⁶⁰⁾ ; Bunnang et al. ⁽⁶¹⁾ ; Dummer et al. ⁽⁶²⁾

1.5. Análises histológicas e moleculares

A análise histopatológica da biópsia renal tem sido usada para fornecer informações estruturais sobre a evolução do órgão transplantado e o exame histológico da biópsia pré-implantação pode fornecer informações sobre a viabilidade 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 subsequentes e menor sobrevivência do enxerto.^(15,63,64)

Após o Tx, a biópsia seriada do enxerto renal é conduta considerada como "padrão ouro" para o diagnóstico de rejeição e evolução do enxerto. No entanto, existem limitações da classificação feita apenas com base nos achados histológicos, pois existem diferentes interpretações dos patologistas para uma mesma biópsia, dissociação entre a histologia e a função renal observada e, cada vez mais, se verificam perfis moleculares de citocinas diferentes dos achados histopatológicos.⁽⁶⁴⁾ 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 e prognosticar rejeição e outros desfechos com mais acurácia.⁽⁶⁵⁾

A análise da expressão gênica do órgão do doador, o transcriptoma, pode ser uma estratégia interessante para determinar a qualidade do órgão, complementar a avaliação clínica e patológica e predizer o desfecho do Tx. O perfil molecular permitiria ainda determinar modificações sutis na variação da transcrição de genes associados à ativação imunológica. Assim, mudanças no transcriptoma podem refletir modificações relacionadas aos mecanismos de lesão e reparo tecidual, que não são visíveis pela histopatologia e não são identificados pelas variáveis clínicas.⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾

Mueller et al. demonstraram que transcriptomas das biópsias de implantação identificaram rins com risco para DGF com mais precisão do que com uso dos atuais sistemas de pontuação clínica e histológica.⁽⁶⁶⁾ Portanto, a identificação de genes transcritos poderia auxiliar na caracterização da função precoce do enxerto ou na ocorrência de DGF.⁽⁶⁹⁾

Embora vários autores tenham estudado rins de DCS, as alterações moleculares que ocorrem em rins de DCE ainda são pouco conhecidas. Portanto, a análise do perfil molecular desses rins poderia ser comparada com a dos rins de DCS e fornecer informações adicionais das vias biológicas ativadas ou reprimidas.^(39,49,66-69)

Uma abordagem genômica de eventos ocorrendo intra-enxerto poderia ser útil de duas formas: 1) a análise molecular de biópsias pré-implantação poderia fornecer um “perfil molecular” que poderia ser útil para entender o significado de "qualidade do órgão", evitando descartes inadequados; 2) após o Tx poderia medir quantitativamente a carga inflamatória em curso no enxerto e permitiria abordagens terapêuticas mais efetivas.⁽⁶⁶⁻⁶⁹⁾

Consequentemente, a identificação de padrões de moleculares inflamatórios e anti-inflamatórios dos rins de DCE e dos seus genes associados poderia ser útil para compreender os resultados inferiores observados atualmente em Tx com esses órgãos e talvez a taxa de descartes desses rins.

1.6. Imunossupressão

O desenvolvimento de novas drogas imunossupressoras contribuiu significativamente para reduzir os episódios de RA e aumentar sobrevidas do enxerto e do paciente.⁽⁷⁰⁾

Os inibidores da calcineurina (ICN), como o Tacrolimo, tem como função inibir a ativação precoce de células T, são a base dos protocolos imunossupressores de manutenção utilizados em Tx mas estão associados com nefrotoxicidade e podem contribuir para a nefropatia crônica do enxerto.⁽⁷⁰⁾ Por outro lado, os protocolos livres de ICN têm sido associados com maior risco de RA, DGF e maior ocorrência de efeitos adversos, quando comparados com regimes de imunossupressão baseada em ICN.⁽⁷⁰⁻⁷²⁾

Os inibidores específicos da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), como o Everolimo, têm efeitos imunossupressores potentes e devido à baixa nefrotoxicidade são uma opção válida como terapia de manutenção da ISS de pacientes com nefropatia crônica do enxerto que não podem utilizar regimes baseados em ICN.⁽⁷⁰⁻⁷³⁾ Os inibidores da mTOR alteram o balanço imunológico entre células aloreativas efetoras e regulatórias, inibindo o crescimento de células T efetoras e favorecendo o crescimento de células T reguladoras (*Tregs*) e a liberação de seu marcador específico, o fator de transcrição FOXP3.

O impacto causado pelo tratamento com imunossupressores nos eventos moleculares pós-Tx de rins de DCE ainda não está estabelecido. Assim, o presente estudo também buscou identificar possíveis perfis moleculares de expressão gênica nas biópsias de rins de DCS e DCE após o Tx para avaliar alterações dos transcritos moleculares associados com os regimes imunossupressores.

1.7. Objetivos

1.7.1. Objetivo geral

Avaliar as diferenças na expressão gênica de biópsias renais de DCE e DCS no pré e pós-transplante e identificar possíveis alterações induzidas pelos regimes de imunossupressão.

1.7.2. Objetivos específicos

- 1) Avaliar o perfil molecular de biópsias pré-implantação (T0) de rins de DCS e DCE.
- 2) Analisar alterações no perfil molecular induzidas por regimes imunossupressores, com Tacrolimo ou Everolimo, em biópsias realizadas 15 e 90 dias após o transplante em rins de DCS e DCE.
- 3) Correlacionar os níveis de expressão gênica em biópsias pré-implantação, 15 dias e 90 dias após o transplante com os desfechos clínicos.

2. CASUÍSTICA e MÉTODOS

2.1. Desenho do estudo e casuística

Estudo prospectivo de centro único randomizado conforme o tipo de rim e regime de imunossupressão. 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 2012 e Dezembro de 2013. Desse total, 16 foram excluídos por ausência de função primária (n = 4), perda técnica (n = 2), revogação do consentimento (n = 5), decisão dos investigadores (n = 2) e recusa de biópsia (n = 3). Sessenta e quatro receptores foram divididos de acordo com o tipo de doador renal (DCS = 43; DCE = 21) e posteriormente randomizados em grupos de acordo com o tratamento imunossupressor recebido, Tacrolimo (Tac) ou *de novo* Everolimo (Eve) (figura 1).

Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido de todos pacientes antes da inclusão no estudo, que foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional do Instituto de Moléstias Cardiovasculares de São José do Rio Preto, em conformidade com as normas vigentes para a investigação humana.

2.2. Critérios de Inclusão

- 1- Receptores com idade \geq 18 anos;
- 2- Doença renal terminal com indicação para receber um alotransplante renal primário de um doador falecido DCS ou DCE;
- 3- TCLE para transplante devidamente assinados (Anexos I e II).

2.3. Critérios de exclusão

- 1- Transplantes com múltiplos órgãos;

- 2- Evidência de infecção ativa sistêmica;
- 3- Uso de qualquer medicamento sob investigação ou tratamento até quatro semanas antes do transplante;
- 4- Hipersensibilidade conhecida ou suspeita às drogas de imunossupressão;
- 5- Terapias imunossupressoras além daquelas descritas para este estudo;
- 6- Pacientes hipersensibilizados (percentagem de anticorpos reativos > 30%);
- 7- Pacientes com HIV positivo ou com Hepatite B ou C.

2.4. Regimes de imunossupressão

Trinta receptores foram randomizados para receber Everolimo (Eve – Certican®; Novartis, Basel, Suíça), começando no dia do Tx com 1,5 mg/dia e visando uma concentração mínima de 3-8 ng/mL, ou Tacrolimo (Tac – Tarfic®; Libbs, São Paulo, Brasil) 0,15 mg/Kg/dia e meta de concentração mínima entre 8-12 ng/mL nos primeiros 3 meses e 5-10 ng/mL nos meses seguintes. Todos os pacientes receberam terapia de indução com Basiliximabe® (Simulect®, Novartis) 20 mg x 2 doses e terapia de manutenção com micofenolato de sódio (Myfortic®, Novartis) 1.440 mg/dL e Prednisona, administrada de acordo com a prática do centro.

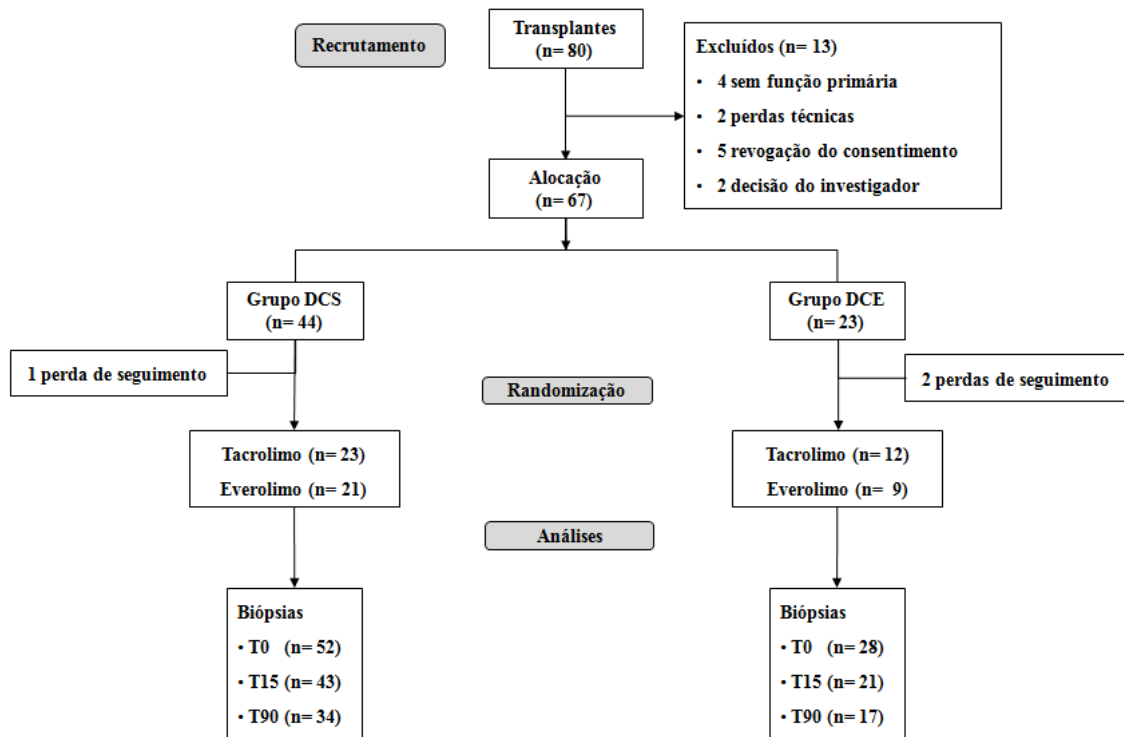


Figura 1: Fluxograma da população de pacientes e disposições dos grupos estudados.

2.5. Definições

DCE foi definido como doadores falecidos ≥ 60 anos de idade ou aqueles com idade entre 50 e 59 anos possuindo pelo menos dois de três critérios: história de HAS, creatinina sérica maior que 1,5 mg/dL quando retirado o órgão ou doença cerebrovascular como causa do óbito.⁽⁵⁾ DGF foi definida como a necessidade de diálise na primeira semana após Tx.^(5,8) A RA foi analisada no contexto clínico da disfunção do enxerto e pela histologia (rejeição comprovada por biópsia – RACB) de acordo com os critérios de Banff 2007.⁽⁶⁵⁾ O diagnóstico de diabetes *mellitus* pós-transplante (DMPT) foi feito com base na descrição feita pela Associação Americana de Diabetes.^(74,75) A infecção por citomegalovírus (CMV) foi diagnosticada quando o teste de carga DNA-

CMV foi $> \log 2.1$ ou > 150 cópias. A doença por CMV foi determinada como a presença de CMV DNAemia no plasma e sinais clínicos.⁽⁷⁶⁾ A falência do enxerto foi definida como a data de retorno para diálise crônica. A taxa de filtração glomerular (TFG) foi calculada pelo clearance de creatinina de 24 horas.

2.6. Coleta de biópsias e análises histológicas

As biópsias pré-implantação foram realizadas em cunha (T0) e as biópsias de 15 (T15) e 90 (T90) dias após Tx obtidas sob a orientação de ultrassom usando pistola semiautomática para biópsia com cânula Biocore II MG (16 Ga X 15 cm). Metade das Bx foi usada para análise histológica e o restante foi imediatamente mergulhado em solução estabilizadora de RNA, *RNAlater* (Ambion, Applied Biosystems) e congelado em nitrogênio líquido a -195°C para a avaliação molecular. O diagnóstico histopatológico foi avaliado por patologista cego e as lesões histológicas foram classificadas usando os critérios de Banff-2007.⁽⁶⁵⁾

2.7. Extração e quantificação do RNA das biópsias renais

Os fragmentos de enxerto foram retirados da solução estabilizadora e processados para a extração de RNA total usando reagente Trizol[®] (Invitrogen Life Technologies). O tecido congelado foi pesado e macerado acrescentando nitrogênio líquido para que a amostra não descongelasse. Acrescentou-se 1000 μL 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 mistura a 12.000g por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionando-se 200 μL de

clorofórmio para cada 1000 µL de Trizol, homogeneizando por inversão e mantendo à temperatura ambiente por 5 minutos. Após centrifugação a 12.000g por 15 minutos a 4°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°C. Posteriormente, centrifugou-se a amostra por 30 minutos a 14.000g à 4°C. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1mL de etanol 70% gelado, diluído com água DEPC (Amersham), e centrifugou-se a amostra por 2 minutos a 14.000g a 4°C; repetindo esta etapa por duas vezes. Descartando novamente o sobrenadante e os tubos foram deixados sobre papel absorvente até secagem do *pellet*. Feito isso, foi adicionado 20 µL de água 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 do fabricante.

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

O RNA total foi submetido a 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 2 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/ μ L) e 4 μ L de água DEPC. As amostras foram submetidas a ciclagem 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 em tempo real

Avaliação dos níveis de expressão dos genes FOXP3, IL-10, TGF- β 1, CCL5/RANTES e CCL2/MCP-1 foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Quantitative real time polymerase chain reaction* – qRT-PCR) com sondas TaqMan®, de acordo com os protocolos do fabricante (Applied Biosystems). Para as análises de quantificação cada reação foi preparada com 10 μ L de TaqMan Gene Expression Master Mix; 1 μ L de sonda TaqMan®, 8 μ L de água DEPEC e 1 μ L de DNAc. Todas as amostras foram executadas em triplicata e analisadas no StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems), os dados foram normalizados com as expressões dos genes endógenos GAPDH e β -actina. A quantificação relativa foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Ct - ciclo *threshold*). O grupo de referência consistiu em amostras obtidas de receptores de rins DCS sem DGF e RA. Os resultados estão expressos em medianas de unidades de expressão relativa.

2.10. Análises estatísticas

Os dados são apresentados em números absolutos, médias \pm desvio padrões (DP), medianas ou porcentagens. As quantificações gênicas são mostradas em gráficos box-plot com transformação logarítmica dos dados. Os níveis de RNA mensageiro (RNAm) foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis com todos os grupos de tratados. O teste de Tukey foi utilizado para comparações múltiplas entre os grupos estudados. O teste de Mann-Whitney foi empregado para comparações entre dois grupos. Foi usado o

teste exato de Fisher para comparar variáveis qualitativas. A análise de regressão linear múltipla foi realizada para avaliar os efeitos independentes de TIF, tipo e idade do doador, sCr, tempo de hospitalização, ocorrência de DGF e RA e, a imunossupressão sobre a expressão relativa nas biópsias renais. Análises multivariadas de regressão logística binária foram executadas para observar variáveis clínicas associadas a expressão relativa, que incluiu um termo para grupo de tratamento randomizado (Eve vs. Tac) e ajuste para outras covariáveis, incluindo a idade do doador, TIF e tipo de doador (DCS vs. DCE). Análises de sobrevida do enxerto foram baseadas no tempo entre o transplante e a falência do enxerto (censura da morte) e na sobrevida do paciente sobre o tempo entre o transplante e morte com um rim funcionando (censura dos retornos em diálise) e, foram calculadas utilizando o método de Kaplan-Meier para comparações utilizando testes de Log-Rank.

Empregou-se representação gráfica por meio de box-plot incluindo valor mínimo, mediana e valor máximo, além de eventuais *outliers*.

Todas as análises foram realizadas utilizando o software Stats Direct versão 3.0 (Stats Direct Ltd.). O nível de significância estatística foi estabelecido em valor de $p < 0.05$

3. RESULTADOS

3.1. Características demográficas de doadores e receptores de acordo com o tipo de rim

No presente trabalho foram estudados 64 doadores falecidos e 64 receptores transplantados renais. Desses, 43 foram DCS e 21 DCE e as variáveis analisadas desses doadores estão resumidas na tabela 1. A comparação entre os dois grupos mostrou que os DCE eram significativamente mais velhos (idade média de 57 ± 6 vs. 37 ± 13 anos, $p = 0,0001$), apresentaram maior prevalência de morte por acidente cerebrovascular ($p = 0,02$) e HAS ($p = 0,001$). O TIF (DCS = $24 \pm 3,5$ vs. DCE = $25,7 \pm 3,9$ horas), o número de doadores diabéticos e a duração da hospitalização do doador foram semelhantes nos dois grupos.

Características demográficas dos receptores de acordo com o tipo de rim recebido e os resultados clínicos são apresentados na tabela 1. Tac e Eve foram administrados a 51%, 49%, 57% e 43%, dos receptores de DCS e DCE, respectivamente. Receptores de DCE foram mais velhos quando comparados com DCS (52 ± 9 vs. 45 ± 12 anos; $p = 0,01$) e tiveram mais incompatibilidades HLA-DR. Etnia, sexo, CMV, diabetes mellitus pós-transplante (DMPT), não foram diferentes entre os grupos. Da mesma forma, foram semelhantes as taxas de RA (12% vs. 14%, $p = \text{NS}$), DGF (67% vs. 71%, $p = \text{NS}$) e duração da DGF ($15 \pm 6,7$ vs. 14 ± 6 dias; $p = \text{NS}$) para DCS e DCE, respectivamente. A sCr (DCS = $1,4 \pm 0,55$ vs. DCE = $1,72 \pm 0,65$ mg/dL; $p = 0,04$) e taxa de filtração glomerular (TFG) (DCS = 68 ± 25 vs. DCE = 51 ± 17 mL/min; $p = 0,02$) em 12 meses pós-Tx foram piores no grupo DCE. As sobrevidas de paciente e enxerto, um ano pós-Tx, foram significativamente menores no grupo DCE do que para DCS ($p = 0,03$ e $p = 0,016$, respectivamente) (tabela 1).

Tabela 1: Características de doadores e receptores e dados do transplante.

Parâmetro	DCS (n = 43)	DCE (n = 21)	Valor de p
Característica dos doadores			
Idade, anos (média ± DP)	37 ± 13	57 ± 6	0,0001
Gênero M(F)	22(21)	10(11)	NS
Causa da morte			
Trauma [n (%)]	24 (56)	-	-
Acidente cerebrovascular [n (%)]	17 (40)	21 (100)	0,02
Outra causa de morte [n (%)]	2 (4,5)	-	-
sCr na retirada (mg/dL) (média ± DP)	1,55 ± 1,1	1,65 ± 1,0	NS
TIF (horas) (média ± DP)	24 ± 3,5	25,7 ± 3,9	NS
HAS [n (%)]	8 (17)	18 (56)	0,001
Diabetes mellitus [n (%)]	2 (4,6)	2 (9,5)	NS
Tempo de hospitalização (dias) (média ± DP)	5,7 ± 5	4,3 ± 3	NS
Característica dos receptores			
Idade, anos (média ± DP)	45 ± 12	52 ± 9	0,01
Etnia (Caucasiana/Não-caucasiana)	26/17	13/8	NS
Gênero M(F)	31 (12)	16 (5)	NS
CMV [positivo, n (%)]	18 (42)	13 (62)	NS
DGF [n (%)]	29 (67)	15 (71)	NS
Duração da DGF (dias) (média ± DP)	15 ± 6,7	14 ± 6	NS
Rejeição aguda [n (%)]	5 (12)	3 (14)	NS
Mismatch HLA-AB (média ± DP)	2,75 ± 0,3	2,79 ± 0,7	NS
Mismatch HLA-DR (média ± DP)	0,35 ± 0,5	0,75 ± 0,6	0,01
sCr 12 meses (mg/dL) (média ± DP)	1,4 ± 0,5	1,72 ± 0,6	0,04
TFG 12 meses (mL/min) (média ± DP)	68 ± 25	51 ± 17	0,02
Imunossupressão			
Tacrolimo [n (%)]	22 (51)	12 (57)	NS
Everolimo [n (%)]	21 (49)	9 (43)	NS
DMPT [n (%)]	6 (14)	4 (19)	NS
Sobrevida paciente 12 meses (%)	98	85	0,03
Sobrevida enxerto 12 meses (%)	98	76	0,016

M: sexo masculino; F: sexo feminino; sCr: Creatinina sérica; DP: Desvio padrão; TIF: Tempo de isquemia fria; HAS: Hipertensão arterial sistêmica; CMV: Citomegalovírus; DGF: Função tardia do enxerto; HLA: Antígeno leucocitário humano; TFG: Taxa de filtração glomerular; DMPT: Diabetes mellitus pós-transplante..

3.2. Dados demográficos e clínicos de receptores de acordo com o tipo de imunossupressão

Os resultados clínicos e demográficos de pacientes tratados com Tac ou Eve são mostrados na tabela 2. A idade e as taxas de DGF não foram diferentes entre os dois grupos, mas os pacientes tratados com Eve apresentaram duração da DGF mais longa (Tac = 12 ± 5 vs. Eve = $16 \pm 7,3$ dias; $p = 0,04$). Apesar das taxas de RA serem quase três vezes maiores no grupo Eve, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes (Tac = 6% vs. Eve = 17%; $p = \text{NS}$).

Depois de um ano, a sCr e a taxa de filtração glomerular (TFG) não eram diferentes e foi observado um menor nível de proteinúria de 24 horas em pacientes tratados com Tac (Tac = $0,37 \pm 0,59$ vs. Eve = $0,53 \pm 0,67$ g/24h; $p = 0,02$). A taxa de infecção por CMV foi maior no grupo Tac (Tac = 71% vs. Eve = 40%; $p = 0,02$) e DMPT foi numericamente duas vezes maior em pacientes Tac ($p = \text{NS}$).

3.3. Dados demográficos e clínicos de receptores de acordo com os tipos de rim e de imunossupressão

Para estudar os resultados clínicos de acordo com o tipo de doador combinado com o regime imunossupressor, estratificamos o grupo em quatro subgrupos de pacientes (DCS-Tac = 22; DCE-Tac = 12; DCS-Eve = 21; DCE-Eve = 9; tabela 2).

Não houve diferença na idade, ocorrência e duração da DGF entre os quatro subgrupos. Taxas de RA foram semelhantes, mas houve uma tendência para ser maior em pacientes tratados com Eve (DCS-Tac = 4,5%; DCE-Tac = 8%; DCS-Eve = 19%; DCE-Eve = 11%; $p = \text{NS}$). A sCr, um ano após o Tx, foi significativamente menor no DCE-Tac quando comparados com pacientes DCE-Eve ($1,6 \pm 0,3$ vs. $1,9 \pm 0,9$ mg/dL; $p = 0,03$).

Receptores de rins de DCS tinham semelhante sCr em um ano, independentemente do tipo de protocolo imunossupressor utilizado (DCS-Tac = $1,36 \pm 0,48$ vs. DCS-Eve = $1,45 \pm 0,6$ mg/dL; $p = \text{NS}$). A TFG não foi diferente entre os quatro subgrupos embora receptores de DCS apresentaram valores de TFG, pelo menos, 15 mL/min maior quando comparado com os receptores de DCE (tabela 2). Do mesmo modo, os níveis de proteinúria de 24 horas não foram diferentes, mas observou-se uma tendência para ser mais elevada nos subgrupos tratados com Eve (tabela 2). CMV foi menos frequente em pacientes tratados com Eve quando comparado com Tac (DCE-Tac = 83% vs. DCE-Eve = 33%, $p = 0,03$; DCS-Tac = 59% vs. DCS-Eve = 24%; $p = 0,03$). Nenhum paciente do grupo DCE-Eve teve DMPT contra 33% de ocorrência em receptores de DCE-Tac ($p = 0,01$; tabela 2).

Em toda a população as complicações cirúrgicas da ferida operatória foram significativamente maiores no grupo Eve ($p = 0,04$) e as complicações infecciosas não diferiram entre os grupos Tac e Eve (tabela 3). A infecção do trato urinário foi mais frequente no grupo de pacientes DCE-Eve quando comparados com os pacientes DCS-Eve ($p = 0,03$).

Tabela 2: Demografia e informações clínicas relevantes de acordo com a imunossupressão e tipo de doador.

	Tac (n = 34)	Eve (n = 30)	DCE-Tac (n = 12)	DCS-Tac (n = 22)	DCE-Eve (n=9)	DCS-Eve (n=21)
Idade do receptor, anos (média ± DP)	48 ± 10	47 ± 12,5	51 ± 9,4	46,4 ± 10	54,2 ± 8,2	44 ± 13
DGF [n (%)]	22 (65)	22 (73.3)	8 (67)	14 (64)	7 (78)	15 (71)
Duração da DGF (dias) (média ± DP)	12 ± 5 ^a	16 ± 7,3	13 ± 7	12 ± 3,7	15,4 ± 5	16,6 ± 8,3
Rejeição aguda [n (%)]	2 (6)	5 (17)	1 (8)	1 (4.5)	1 (11)	4 (19)
Proteinúria 12 meses (média ± DP)	0,37 ± 0,59 ^b	0,53 ± 0,67	0,26 ± 0,22	0,41 ± 0,67	0,60 ± 0,8	0,51 ± 0,6
TFG 12 meses (média ± DP)	64 ± 23	63 ± 26	52,4 ± 13	67,6 ± 24,5	50,6 ± 21	67 ± 26,6
sCr 12 meses (mg/dL) (média ± DP)	1,43 ± 0,4	1,60 ± 0,7	1,6 ± 0,3 ^d	1,36 ± 0,48	1,9 ± 0,9	1,45 ± 0,6
DMPT [n (%)]	7 (21)	3(10)	4 (33) ^e	3(14)	0	3(14)
CMV infecção [n (%)]	24 (71) ^c	12 (40)	10(83) ^f	13(59) ^g	3(33)	5(24)
Sobrevida do paciente 12 meses (%)	93,8	90	90	100	90	95
Sobrevida do enxerto 12 meses (%)	91	87	70	100	82	95

^a Tac vs. Eve (p = 0,04); ^b Tac vs. Eve (p = 0,02); ^c Tac vs. Eve (p = 0,02); ^d DCE-Tac vs. DCE-Eve (p = 0,03); ^e DCE-Tac vs. DCE-Eve (p = 0,01); ^f DCE-Tac vs. DCE-Eve (p = 0,03); ^g DCS-Tac vs. DCS-Eve (p = 0,03). DGF: Função tardia do enxerto; DP: Desvio padrão; TFG: Taxa de filtração glomerular; sCr: Creatinina sérica; DMPT: Diabetes mellitus pós-transplante; CMV: Citomegalovírus.

Tabela 3: Complicações infecciosas e cirúrgicas.

	Tac (n= 34)	Eve (n= 30)	DCE-Tac (n= 12)	DCS-Tac (n= 22)	DCE-Eve (n= 9)	DCS-Eve (n= 21)
<i>Infeções, n (%)</i>						
Herpes simples	1 (3)	2 (6)	0	1 (4.5)	1 (11)	1 (5)
Herpes zoster	2 (6)	3 (10)	2 (17)	0	2 (22)	1 (5)
Infecção do trato urinário	10 (29)	8 (26)	5 (42)	5 (23)	5 (55) ^b	3 (14)
Pneumonia	6 (17)	6 (20)	4 (33)	2 (9)	3 (33)	3 (14)
Outros	7 (20,6)	5 (16,5)	2 (16)	5 (23)	2 (22)	3 (14)
Sepse	1 (3)	3 (10)	1 (8)	0	2 (22)	1 (5)
Infecção fúngica	5 (15)	1 (3)	2 (16)	3 (25)	0	1 (5)
<i>Complicações cirúrgicas, n (%)</i>						
Ferida operatória	4 (12) ^a	9 (30)	2 (16)	2 (9)	2 (22)	7 (33)
Linfocele	7 (21)	7 (23)	2 (16)	5 (23)	2 (22)	5 (24)

^a Tac vs. Eve (p = 0,04); ^b DCE-Eve vs. DCS-Eve (p = 0,03).

3.4. Achados histológicos

Histologia normal foi observada em 33% e 14% das Bx T0 de rins DCS e DCE, respectivamente ($p = \text{NS}$). Fibrose intersticial e atrofia tubular leve ($\text{IFTA} \leq 1$) foram semelhantes em ambos os grupos enquanto que achados de $\text{IFTA} > 1$ eram quase três vezes mais comum em DCE que em rins DCS ($p = \text{NS}$) (tabela 4).

Nas Bx T15, nenhum receptor de DCE apresentou histologia normal versus 26,5% no grupo DCS. $\text{IFTA} \leq 1$ ocorreu de forma semelhante nos pacientes do grupo DCS usando Tac (63%) ou Eve (68%) e foi numericamente mais elevada entre DCE-Tac (73%) do que no DCE-Eve (44,5%), embora sem atingir diferença estatisticamente significativa. Nenhum rim DCS teve $\text{IFTA} > 1$ enquanto este achado foi diagnosticado em 20% do grupo DCE (Tac = 9% vs. Eve = 11%; $p = \text{NS}$) (tabela 4).

RACB IA/IB foi duas vezes mais comum em receptores de DCE (20%: Tac = 9%; Eve = 11%), quando comparado com DCS, embora sem apresentar significância estatística (tabela 4). Apenas um paciente do grupo DCS-Eve teve RACB - Banff III. Em T90, Bx com histologia normal foram encontradas em 10,5% dos grupos DCS-Tac e 12,5% DCE-Eve. A grande maioria das Bx apresentaram $\text{IFTA} \leq 1$ em todos os subgrupos. $\text{IFTA} > 1$ foi detectada em 17,5% e 11% de grupos de DCS e DCE, respectivamente. Apenas um paciente do DCE-Eve teve RACB IA/IB (tabela 4).

Tabela 4: Histologia das biópsias pré-implantação e biópsias 15 e 90 dias pós-transplante por tipo de doador e imunossupressor.

Classificação histológica, n(%)	T0			T15						T90					
	DCS (n=52)	DCE (n=28)	Valor de p	Tac (n=19)	DCS Eve (n=19)	Valor de p	Tac (n=11)	DCE Eve (n=9)	Valor de p	Tac (n=19)	DCS Eve (n=15)	Valor de p	Tac (n=9)	DCE Eve (n=8)	Valor de p
Histologia normal	17 (33)	4 (14)	NS	3 (16)	2 (10,5)	NS	*	*	*	2 (10,5)	*	*	*	1 (12,5)	*
IFTA ≤ I	33 (63)	21 (75)	NS	12 (63)	13 (68)	NS	8 (73)	4 (44,5)	NS	13 (68)	13 (87)	NS	7 (78)	6 (75)	NS
IFTA > I	2 (4)	3 (11)	NS	*	*	*	1 (9)	1 (11)	NS	2 (10,5)	1 (7)	NS	1 (11)	*	*
RA – IA e IB	*	*	*	1 (5)	1 (5)	NS	1 (9)	1 (11)	NS	*	*	*	*	1 (12,5)	*
RA – III	*	*	*	*	1 (5)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Alterações borderline	*	*	*	1 (5)	1 (5)	NS	1 (9)	1 (11)	NS	1 (5,5)	1 (7)	NS	1 (11)	*	*
Outras alterações	*	*	*	2 (10,5)	1 (5)	NS	1 (9)	1 (11)	NS	2 (10,5)	*	*	1 (11)	1 (12,5)	NS

IFTA: Fibrose intersticial e atrofia tubular; RA: Rejeição aguda

3.5. Perfil molecular de biópsias pré-implantação (T0)

Para avaliar a carga de inflamação dos rins de DCS e DCE estudamos a expressão gênica de moléculas inflamatórias em 80 biópsias pré-implantação (T0) (DCE = 28; DCS = 52). Moléculas pró-inflamatórias MCP-1 ($p = 0,016$), RANTES ($p = 0,008$), TGF- β 1 ($p = 0,04$) e anti-inflamatória IL-10 ($p = 0,0005$) foram significativamente mais expressas nos rins DCE do que nos rins DCS e a expressão do gene FOXP3 foi semelhante em ambos os tipos de rins (figura 2).

A duração da internação do doador foi a única variável independentemente associada com a expressão aumentada de FOXP3 ($p = 0,01$) e MCP-1 ($p = 0,04$). Tipo de doador DCE foi relacionado com elevada expressão de ambas as citocinas inflamatórias MCP-1 ($p = 0,02$) e RANTES ($p = 0,006$), enquanto que o aumento da expressão de TGF- β 1 só foi associada com a sCr do doador na retirada do órgão ($p = 0,04$). Idade do doador e TIF não foram associados com expressão de nenhum dos genes estudados (tabela 5).

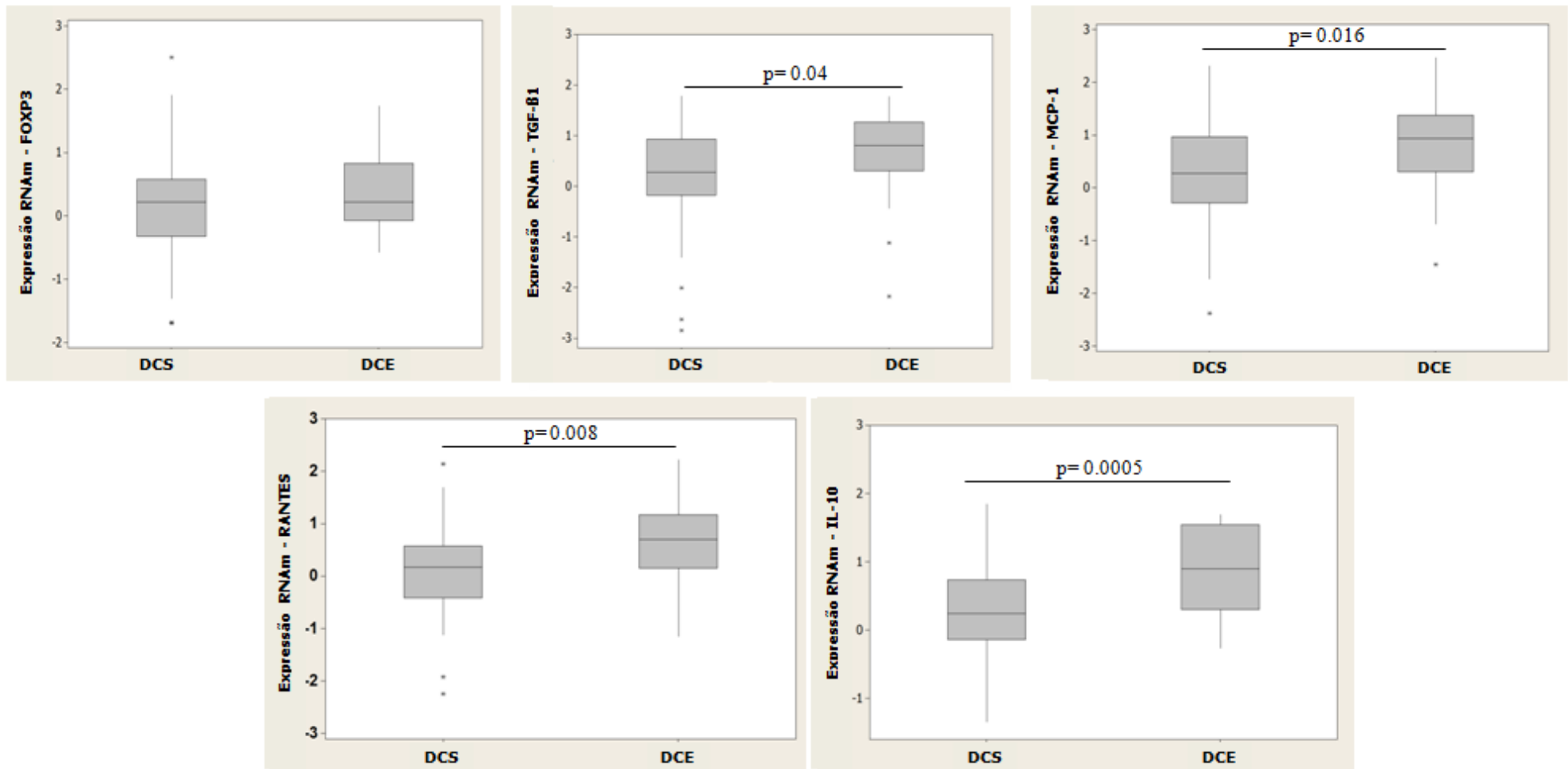


Figura 2: Representação esquemática por "box-plot" de valores de mediana e quartis dos níveis de expressão de RNAm em biópsias pré-implantação (T0). DCS: Doador renal com critérios padrões; DCE: Doador renal com critérios estendidos; RNAm: RNA mensageiro.

Tabela 5. Regressão linear múltipla da associação entre as variáveis do doador e as expressões gênicas em biópsias T0.

Variáveis	FOXP3		TGF- β 1		MCP-1		RANTES		IL-10	
	Coefficiente (Beta)	Valor de p	Coefficiente (Beta)	Valor de p	Coefficiente (Beta)	Valor de p	Coefficiente (Beta)	Valor de p	Coefficiente (Beta)	Valor de p
Rim DCE	4,8	NS	-0,02	NS	42	0,02	22,8	0,006	8,9	NS
Idade do doador	-0,01	NS	0,23	NS	-0,48	NS	-0,2	NS	0,02	NS
Última sCr do doador	-1	NS	3,14	0,04	-1,25	NS	-2,7	NS	1,7	NS
TIF (horas)	-0,04	NS	0,4	NS	-1,9	NS	-0,7	NS	0,36	NS
Tempo de hospitalização (dias)	1	0,01	0,009	NS	2,8	0,04	1,18	NS	0,65	NS

DCE: Doador renal com critérios estendidos; sCr: Creatinina sérica; TIF: Tempo de isquemia fria.

3.6. Perfil molecular de biópsias T15 e T90, tipo de doador e regimes de imunossupressão

Sessenta e quatro biópsias T15 e 51 Bx T90 foram estratificadas de acordo com o tipo de doador e regime imunossupressor. As figuras 3 e 4 mostram que em Bx T15 e T90 análise dos transcritos gênicos não foi diferente na população total de DCS e DCE.

Avaliação dos subgrupos conforme o tipo de doador e do protocolo imunossupressor utilizado mostrou um perfil onde MCP-1 e RANTES foram significativamente mais expressos no grupo de DCS-Eve (figuras 3 e 4) e sem diferenças na expressão de IL-10 e TGF- β 1, tanto em T15 como em T90. Expressão de FOXP3 mostrou-se diferente, pois enquanto que em T15 houve expressão positiva em ambos os grupos DCS e DCE tratados com Eve, em T90 apenas pacientes do DCS-Eve mostraram aumento nos transcritos de FOXP3 (figuras 3 e 4).

A tabela 6 mostra a correlação entre as variáveis do doador e receptor e a expressão gênica em Bx T15. Houve significativa correlação de FOXP3, MCP-1 e RANTES apenas com uso de Eve.

Da mesma forma, a tabela 7 mostra essas correlações em Bx T90 e diferentemente do padrão molecular observado em T15, apenas FOXP3 mostrou-se correlacionado com o uso de Eve, MCP-1 e IL-10 apareceram correlacionados com DGF.

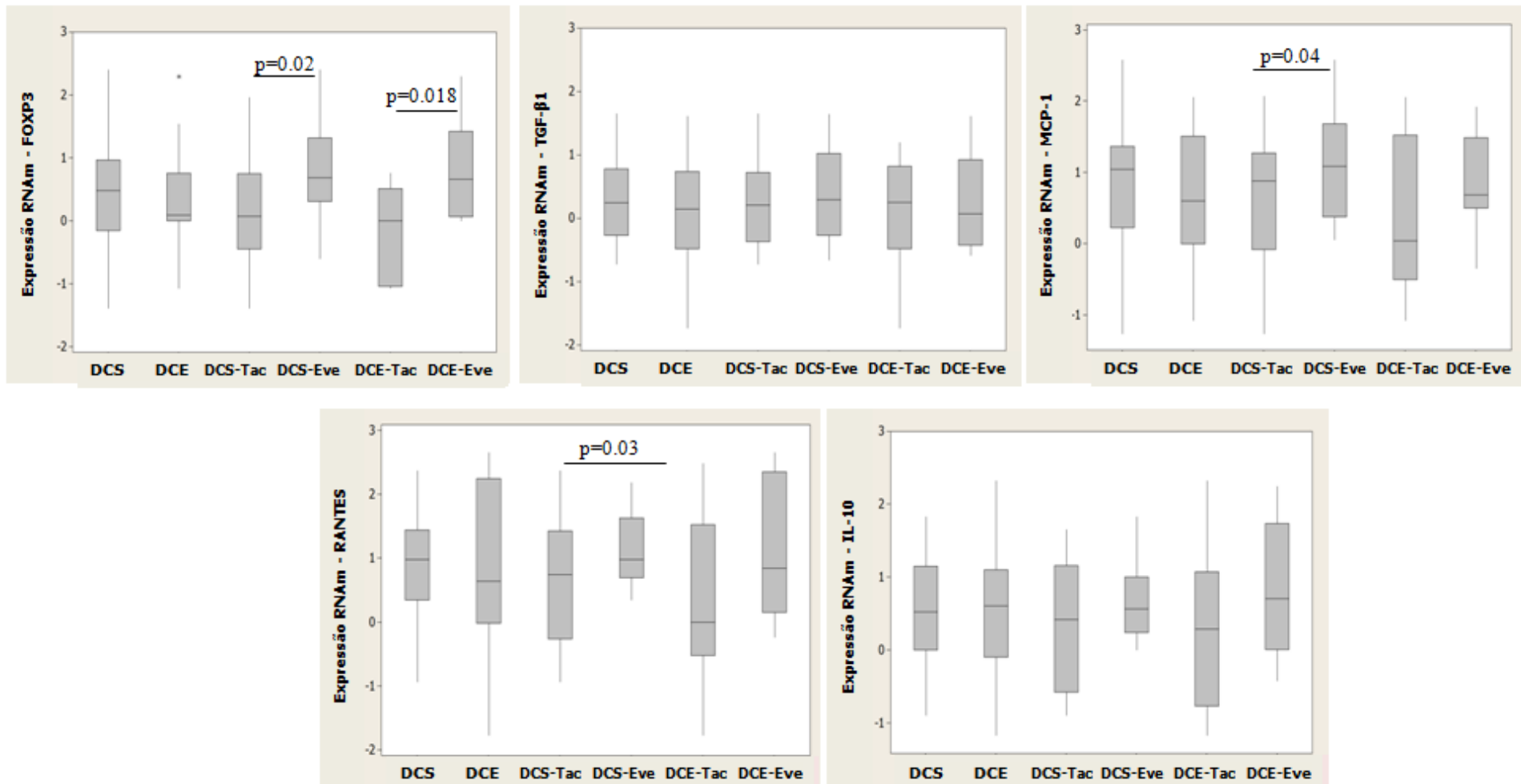


Figura 3: Representação esquemática por "box-plot" de valores de mediana e quartis dos níveis de expressão de RNAm em biópsias 15 dias após o transplante (T15). DCS: Doador renal com critérios padrões; DCE: Doador renal com critérios estendidos; Eve: Everolimo, Tac: Tacrolimo; RNAm: RNA mensageiro.

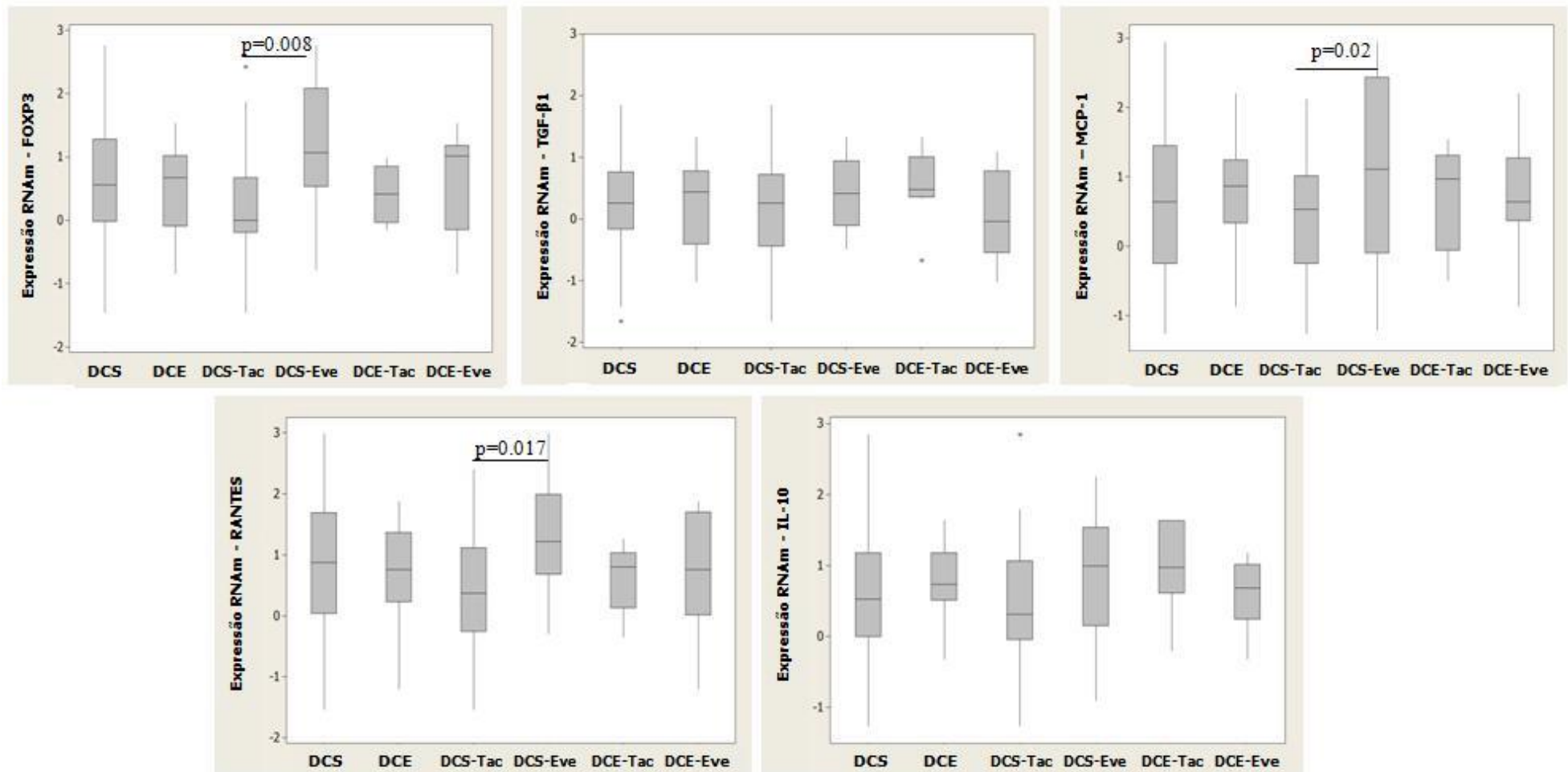


Figura 4: Representação esquemática por "box-plot" de valores de mediana e quartis dos níveis de expressão de RNAm em biópsias 90 dias após o transplante (T90).

DCS: Doador renal com critérios padrões; DCE: Doador renal com critérios estendidos; Eve: Everolimo, Tac: Tacrolimo; RNAm: RNA mensageiro.

Tabela 6: Análises de regressão logística dos fatores de risco e expressões gênicas em biópsias T15.

Covariável	FOXP3		TGF- β 1		MCP-1		RANTES		IL-10	
	Razão de chance (IC 95%)	Valor de p	Razão de chance (IC 95%)	Valor de p	Razão de chance (IC 95%)	Valor de p	Razão de chance (IC 95%)	Valor de p	Razão de chance (IC 95%)	Valor de p
Rim DCE	0,60 (0,07-4,9)	NS	0,53 (0,08-3,4)	NS	0,86 (0,09-8,3)	NS	0,7 (0,05-9)	NS	0,85 (0,12-5,6)	NS
Idade do doador (anos)	0,7 (0,08-5,3)	NS	1,8 (0,3-11)	NS	0,37 (0,03-3,5)	NS	0,3 (0,02-3,8)	NS	0,64 (0,09-4,1)	NS
TIF (horas)	2,5 (0,6-10,5)	NS	1,6 (0,5-5,3)	NS	1,6 (0,28-9,1)	NS	0,85 (0,12-5,9)	NS	1,75 (0,46-6,6)	NS
Tempo de hospitalização (dias)	1,5 (0,3-7,0)	NS	1,63 (0,43-6,1)	NS	7,2 (0,8-64,6)	NS	618 (0,008-44)	NS	1,14 (0,27-4,8)	NS
DGF	1,7 (0,4-7,0)	NS	0,53 (0,15-1,9)	NS	3,3 (0,5-20,1)	NS	1,6 (0,19-14)	NS	0,32 (0,07-1,4)	NS
RA	2,7 (0,2-32,8)	NS	2,55 (0,4-17,2)	NS	0,38 (0,02-7,3)	NS	11,8 (1,4-5,3)	NS	3,6 90,3-36,3)	NS
Eve	11,8 (2,5-55,1)	0,0017	1,06 (0,32-3,5)	NS	30,5 (2,7-343)	0,005	41,6 (3,7-465)	0,002	3,5 (0,9-13,2)	NS

DCE: Doador renal com critérios estendidos; TIF: Tempo de isquemia fria; DGF: função tardia do enxerto; RA: Rejeição aguda; Eve: Everolimo.

Tabela 7: Análises de regressão logística dos fatores de risco e expressões gênicas em biópsias T90.

Covariável	FOXP3		TGF- β 1		MCP-1		RANTES		IL-10	
	Razão de chance (IC 95%)	Valor de p	Razão de chance (IC 95%)	Valor de p	Razão de chance (IC 95%)	Valor de p	Razão de chance (IC 95%)	Valor de p	Razão de chance (IC 95%)	Valor de p
Rim DCE	0,18 (0,02-1,7)	NS	0,23 (0,01-2,8)	NS	1,1 (0,1-13,5)	NS	1,8 (0,15-22,2)	NS	3,2 (0,12-85,3)	NS
Idade do doador (anos)	2,5 (0,27-23)	NS	4,3 (0,3-56,1)	NS	1,5 (0,1-16,9)	NS	0,5 (0,04-6)	NS	1,3 (0,07-24)	NS
TIF (horas)	1,5 (0,36-6,2)	NS	1,6 (0,4-6,3)	NS	0,9 (0,2-4,2)	NS	1,4 (0,2-7,4)	NS	0,9 (0,15-5,4)	NS
Tempo de hospitalização (dias)	0,97 (0,1-8,9)	NS	0,64 (0,07-5,6)	NS	1,0 (0,1-10,6)	NS	0,9 (0,06-14,7)	NS	1,5 (0,07-28,4)	NS
DGF	1,7 (0,4-6,9)	NS	1,04 (0,28-3,9)	NS	4,9 (1,2-19,9)	0,02	0,4 (0,06-2,3)	NS	8 (1,5-42,5)	0,01
RA	5,6 (0,4-81,1)	NS	0,79 (0,13-4,5)	NS	0,9 (0,1-7,8)	NS	127 (0,0008-19,1)	NS	65,8 (0,0005-7802)	NS
Eve	6,6 (1,4-31,1)	0,01	0,87 (0,22-3,4)	NS	2,9 (0,6-14,2)	NS	2,3 (0,4-12,5)	NS	2,3 (0,37-14,4)	NS

DCE: Doador renal com critérios estendidos; TIF: Tempo de isquemia fria; DGF: função tardia do enxerto; RA: Rejeição aguda; Eve: Everolimo.

Quando subtraímos das Bx T15 e T90 os valores de expressão gênica obtidos nas Bx T0 dois tipos distintos de perfil molecular emergiram para DCS e DCE (figura 5). Enquanto que os rins DCS apresentaram regulação positiva para todas as moléculas, exceto TGF- β 1, independentemente do regime de ISS, os rins DCE mostraram regulação negativa para as mesmas moléculas, exceto por discreta expressão positiva de FOXP3 e RANTES (figuras 5 A e B).

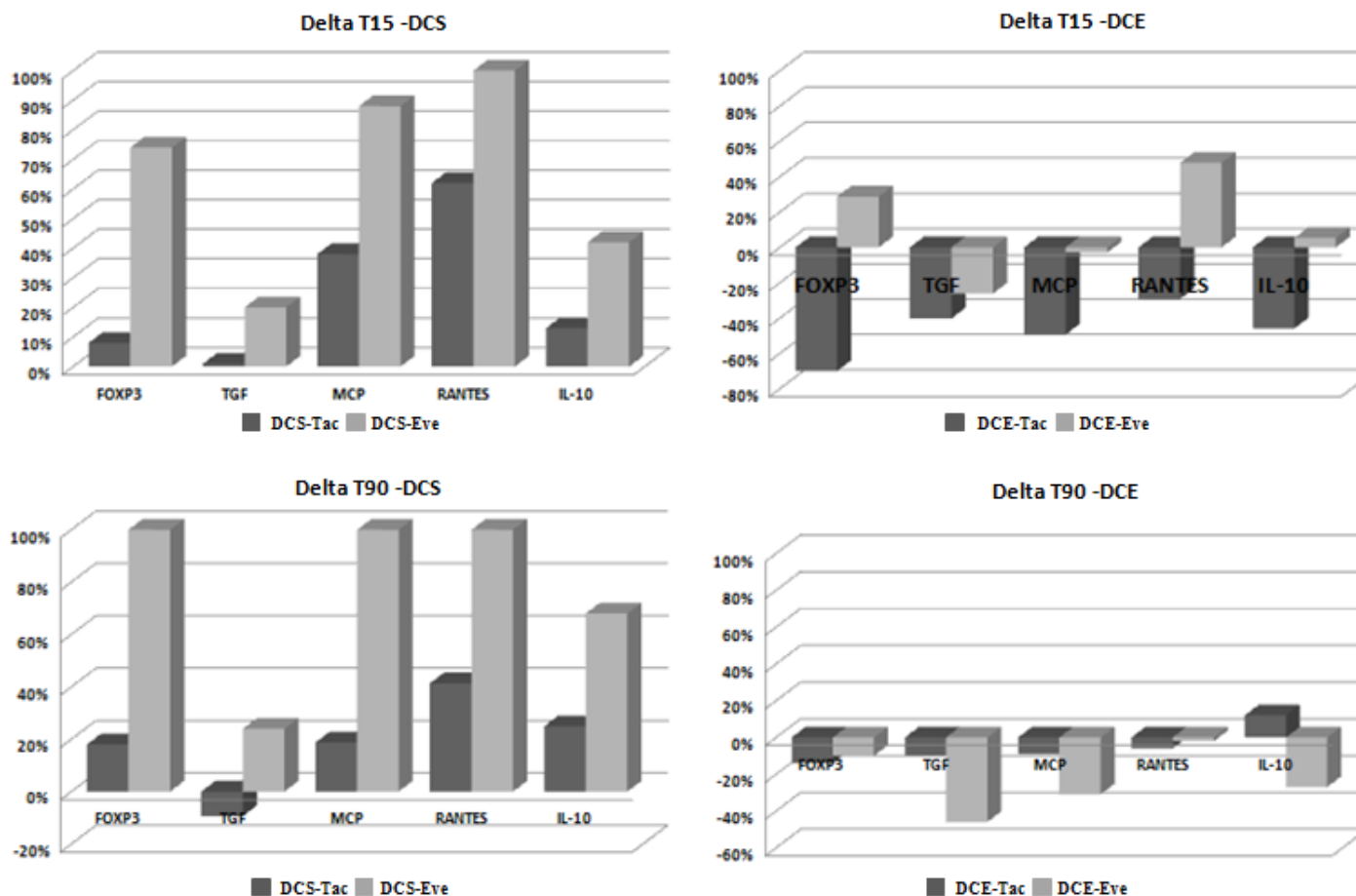


Figura 5: Expressão gênica relativa de RNAm de FOXP3, TGF- β 1, MCP-1, RANTES e IL-10 a partir dos valores de expressão basal (T0) em relação as expressões de biópsias T15 e T90 (Delta). Os dados são apresentados em porcentagem de aumento. DCS: Doador renal com critérios padrões; DCE: Doador renal com critérios estendidos; Eve: Everolimo, Tac: Tacrolimo.

4. DISCUSSÃO

A heterogeneidade dos fatores de risco para avaliar os desfechos pós-Tx podem refletir nas limitações da padronização de biomarcadores para avaliação da qualidade renal. A identificação de biomarcadores que sejam capazes de prever os resultados do Tx com rins de DCE é importante, pois poderia diminuir as elevadas taxas de descartes desses órgãos.^(1,2) Desse modo, a aplicação de ferramentas moleculares em biópsias pré-implantação poderia produzir maior entendimento sobre as bases moleculares dos processos que levam a desfechos ruins no pós-Tx. Neste trabalho foram investigados os níveis de expressão gênica de moléculas que parecem ter relação com resultados do transplante renal e sua possível associação com o tipo de doador e o efeito do protocolo de ISS.

Como nossa hipótese era de que rins de DCE tinham piores desfechos do que rins de DCS, em consequência de possuírem uma atividade inflamatória mais intensa, inicialmente comparamos os transcritos moleculares das Bx T0 de rins de DCS e DCE. Análise das expressões gênicas em Bx T0 mostraram diferenças marcantes entre o perfil de expressão de rins de DCE e DCS, com moléculas pró-inflamatórias, MCP-1 e RANTES, e anti-inflamatórias, IL-10 e TGF- β 1 expressas de forma significativamente maior em rins de DCE quando comparados com DCS.

A idade do doador pode estar correlacionada com maior ocorrência de comorbidades, como HAS e doença cerebrovascular, produzindo um perfil molecular inflamatório diferenciado em rins de DCE quando comparados a rins de DCS. Martins et. al. sugerem que o envelhecimento está associado com a ativação crônica do sistema imune, com aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e redução da expressão de moléculas de adesão.⁽⁷⁷⁾

Além disso, esses outros estudos experimentais e em humanos que mostram que a morte encefálica causa um estado pró-inflamatório sistêmico que predispõe órgãos periféricos como os rins à lesão.⁽⁷⁸⁻⁸¹⁾ Este ambiente pró-inflamatório parece ser específico para ME, pois rins obtidos de doadores com parada cardíaca, com tempos de isquemia fria semelhantes, não têm o mesmo perfil inflamatório. A inflamação sistêmica também tem sido atribuída a alterações hormonais, instabilidade hemodinâmica, idade, TIF prolongado e duração da hospitalização dos potenciais doadores.^(82,83)

Em nosso estudo, não foram encontradas diferenças entre as variáveis analisadas para os grupos de DCS e DCE, exceto aquelas inerentes à classificação de DCE. No entanto, a associação encontrada na análise multivariada entre o aumento da expressão de MCP-1 e RANTES o tipo de doador (DCE) e com o tempo de hospitalização, reforçam trabalhos que sugerem o envolvimento de um processo inflamatório iniciado antes da retirada do órgão.⁽⁸⁴⁾

Altas expressões de IL-10 e TGF- β 1 podem ser devido a uma resposta anti-inflamatória gerada como resposta ao estado pró-inflamatório existente nesses rins e também uma tentativa de reparar a lesão causada pela isquemia do tecido. Interessantemente, a associação da expressão de FOXP3 e TGF- β 1 com o tempo de internação, como com a sCr na retirada do órgão, podem estar relacionadas com a atividade de reparação tecidual e com o tráfico de diferentes tipos de células protetoras, especialmente aquelas do tipo células *Tregs*, envolvidas na reparação do processo de isquemia e reperfusão.⁽⁸⁵⁻⁸⁷⁾

A idade do doador e do receptor não foram significativamente associados com qualquer expressão das citocinas nas Bx T0.

A inflamação sistêmica e o perfil pró-inflamatório presentes nas Bx T0 podem ser decorrentes de uma resposta às lesões que ocorrem durante à isquemia e captação do órgão do doador e podem estar relacionadas com a ativação da imunidade inata. É descrito que sob condições de estresse, o processo de morte celular pode liberar para o meio extracelular moléculas endógenas denominadas padrão moleculares associados ao dano (*damage associated molecular pattern* - DAMPs) e desencadear uma inflamação do tipo "estéril" característica de processos como trauma e isquemia.⁽⁸⁸⁻⁹⁰⁾

Outra hipótese envolvendo os DAMPs é o grau de hipóxia que ocorre antes de captação dos órgãos. Damman et. al. relataram maior atividade das vias relacionadas com hipóxia e sistema de coagulação que levam à liberação de DAMPs em doadores com ME.⁽⁸⁴⁾

Nesse contexto é possível que órgãos de doadores “não ideais”, tais como os dos DCE, que tiveram maior tempo de hospitalização e possivelmente, maior dano tecidual, liberariam maior quantidade de restos celulares e moléculas endógenas de sinalização que ativam a imunidade inata, resultando em potentes estímulos estéreis, traduzidos por maior produção de citocinas e quimiocinas.^(88,91,92)

Além disso, alterações na quantidade de neutrófilos, células dendríticas residentes e células T CD4+ CD8+ que infiltram o rim de DCE também podem influenciar a intensidade da inflamação estéril e, conseqüentemente, a resposta imune adaptativa mediada por células T.⁽⁹³⁻⁹⁵⁾

Estudos anteriores mostraram que os receptores de rins de DCE têm pior função renal e menor sobrevida do enxerto e do paciente do que DCS^(4,7,10,22). Entretanto, os

subgrupos estudados não apresentaram diferenças significantes com relação a DGF e função renal no primeiro ano pós-Tx, apesar de uma tendência de maiores taxas de RA terem sido observadas nos subgrupos tratados com Eve. Esses pacientes tiveram maior duração da DGF, maior proteinúria e menores taxas de infecção por CMV, enquanto mais DMPT foi encontrada entre os pacientes que receberam Tac, corroborando dados anteriores de estudos clínicos maiores.^(96,97)

Após o transplante, o perfil dos transcritos encontrado em Bx T15 e T90 foram muito semelhantes, ambos marcados pelo aumento da expressão FOXP3 apenas em subgrupos tratados com Eve, sugerindo uma relação causal com esta droga. No entanto, enquanto em T15 a utilização de Eve foi associada com aumento da expressão de FOXP3, MCP-1 e RANTES, em T90 a relação foi unicamente com Eve. Como o período T15 abrange eventos de maior atividade inflamatória, tais como DGF e RA, é possível que esses resultados sejam em virtude de uma tentativa de equilíbrio entre a resposta inflamatória e anti-inflamatória e/ou um efeito dos inibidores da mTOR. Nas Bx coletadas em T90, um período pós-Tx mais estável, o aumento da expressão de FOXP3 pode ser predominantemente devido a atividade de células *Tregs* atuando no processo de lesão/reparação. A liberação de citocinas inflamatórias, detectadas por hibridização *in situ* ou no plasma foi relatada em biópsias renais pré-implantação de doadores vivos, doadores com ME e doadores mortos com coração parado, mas diferenças no perfil molecular de DCS e DCE não foram investigadas.^(42,81)

Em virtude das Bx T0 de rins de DCS e DCE exibirem elevada expressão gênica, reavaliemos os transcritos intra-enxerto sem a respectiva atividade inflamatória basal. A partir dessa análise surgiram dois perfis de expressão gênica muito distinto para rins de DCS e DCE. Enquanto nos rins de DCS os transcritos moleculares

permaneceram aumentados em T15 e T90, nos rins de DCE quase todas as moléculas tiveram suas expressões diminuídas, com exceção de pacientes do grupo DCE-Eve que mostraram pequeno aumento de FOXP3 e RANTES (T15) e IL-10 (T90). É interessante observar que em ambos os períodos, as Bx de DCS-Eve exibiram um padrão caracterizado por níveis de expressão gênica mais elevados do que DCS-Tac, especialmente para o gene FOXP3. A menor expressão relativa de citocinas em rins de DCE pode representar um estado não-funcional da ativação de células T que se tornaram incapazes de montarem uma resposta imunológica com equilíbrio adequado entre moléculas inflamatórias e anti-inflamatórias.⁽⁸⁶⁾

Nossos resultados sugerem que os rins de DCE têm características teciduais específicas, com transcritos moleculares muito diferentes dos rins de DCS. Ainda assim, sugere-se que a diferença na expressão gênica molecular entre DCE e DCS pode ser relacionada com a imunidade inata e a intensidade da inflamação estéril. Após o transplante, independentemente do regime imunossupressor, o perfil molecular de rins de DCS permanece predominantemente pró-inflamatório, enquanto rins de DCE geram um perfil não-fisiológico com diminuição da expressão das moléculas inflamatórias.

Embora nosso estudo demonstre de forma inédita as diferenças de perfil molecular existente em rins de DCS e DCE, ele possui algumas limitações como o alto custo das análises do transcriptoma, possibilidade de vieses na interpretação e o número reduzido de pacientes reduzido em cada grupo.

Por outro lado, uma vez comprovadas essas diferenças, os presentes resultados podem oferecer novas estratégias para o tratamento visando reduzir a carga inflamatória dos rins de DCE.

5. CONCLUSÕES

Este estudo permite concluir que:

1) Rins de DCE possuem maior expressão gênica de moléculas inflamatórias do que rins de DCS.

2) Em biópsias T15, houve aumento da expressão de FOXP3 e MCP-1 em pacientes tratados com Eve. A expressão de RANTES foi mais elevada no grupo DCS-Eve. O perfil molecular das Bx T90 foi similar ao perfil encontrado em Bx T15, exceto pelo aumento dos transcritos de FOXP3 no grupo DCS-Eve.

3) O maior tempo de hospitalização do doador, os rins de DCE e níveis elevados de sCr na retirada do órgão foram relacionados com maior expressão de moléculas inflamatórias. O tratamento com Eve foi associado com aumento da expressão de moléculas inflamatórias e de FOXP3. A DGF foi associada com maior expressão de MCP-1 e IL-10 em biópsias T90.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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;74:1281-6.
2. Merion RM. Expanded criteria donors for kidney transplantation. *Transplant Proceedings* 2005; 37(9):3655
3. 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.
4. 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;12:589-97.
5. Cecka JM. The OPTN/UNOS Renal Transplant Registry 2003. *Clinical Transplantation* 2003:1-12.
6. Baskin-Bey ES, Kremers W, Stegall MD, Nyberg SL. United Network for Organ Sharing's expanded criteria donors: is stratification useful? *Clinical Transplantation* 2005;19:406-12.
7. Merion RM, Ashby VB, Wolfe RA, Distant DA, Hulbert-Shearon TE, Metzger RA, et al. Deceased-donor characteristics and the survival benefit of kidney transplantation. *JAMA* 2005;294:2726-33.
8. Ojo AO. Expanded criteria donors: process and outcomes. *Seminars in Dialysis* 2005;18:463-8.

9. 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. *American Journal of Transplantation* 2007;7:1140-7.
10. Pascual J, Zamora J, Pirsch JD. A systematic review of kidney transplantation from expanded criteria donors. *American Journal of Kidney Diseases* 2008;52:553-86.
11. García-Rubio JH, García JR, Hernández PC, López JM, Curado FA, Vallejo ML, et al. Correlation between dual kidney biopsy in expanded-criteria donors and transplant survival. *Transplantation Proceedings* 2013;45:3606-8.
12. Barba J, Zudaire JJ, Robles JE, Rosell D, Berian JM, Pascual I. Complications of kidney transplantation with grafts from expanded criteria donors. *World Journal of Urology* 2013;31:893-900.
13. Hopfer H, Kemény É. Assessment of donor biopsies. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2013;18:306-12.
14. Assis-Borba L, Cristelli MP, Paula MI, Franco MF, Tedesco-Silva H, Medina-Pestana JO. Expanding the use of expanded criteria donors in kidney transplantation. *International Urology and Nephrology* 2014;46:1663-71.
15. 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.
16. 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.

17. Lee CM, Scandling JD, Pavlakis M, Markezich AJ, Dafoe DC, Alfrey EJ. A review of the kidneys that nobody wanted: determinants of optimal outcome. *Transplantation* 1998;65:213-9.
18. Stratta RJ, Rohr MS, Sundberg AK, Armstrong G, Hairston G, Hartmann E, et al. Increased kidney transplantation utilizing expanded criteria deceased organ donors with results comparable to standard criteria donor transplant. *Annals of Surgery* 2004;239:688-95.
19. 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:h3557.
20. Gaston RS, Danovitch GM, Adams PL, Wynn JJ, Merion RM, Deierhoi MH, et al. The report of a national conference on the wait list for kidney transplantation. *American Journal of Transplantation* 2003;3:775-85.
21. Helfer MS, Vicari AR, Spuldaro F, Gonçalves LF, Manfro RC. Incidence, risk factors, and outcomes of delayed graft function in deceased donor kidney transplantation in a Brazilian center. *Transplantation Proceedings* 2014;46:1727-9.
22. Bronzatto EJ, da Silva Quadros KR, Santos RL, Alves-Filho G, Mazzali M. Delayed graft function in renal transplant recipients: risk factors and impact on 1-year graft function: a single center analysis. *Transplantation Proceedings* 2009;41:849-51.
23. Fraser SM, Rajasundaram R, Aldouri A, Farid S, Morris-Stiff G, Baker R, et al. Acceptable outcome after kidney transplantation using "expanded criteria donor" grafts. *Transplantation* 2010;89:88-96.

24. Martínez-Vaquera S, Navarro Cabello MD, López-Andreu M, Dueñas Jurado JM, Rodelo-Haad C, Ortega-Salas R, et al. Outcomes in Renal Transplantation with Expanded-Criteria Donors. *Transplantation Proceedings* 2013;45:3595e3598.
25. Friedersdorff F, Roller C, Klein G, Werthemann P, Cash H, Budde K, et al. Outcome of expanded criteria donor kidneys that were transplanted at other Eurotransplant centers after being rejected by our institution. *World Journal of Urology* 2013;31:947-52.
26. Legendre C, Canaud G, Martinez F. Factors influencing long-term outcome after kidney transplantation. *Transplant International* 2014;27:19-27.
27. de Sandes-Freitas TV, Felipe CR, Aguiar WF, Cristelli MP, Tedesco-Silva H, Medina-Pestana JO. Prolonged Delayed Graft Function Is Associated with Inferior Patient and Kidney Allograft Survivals. *PLoS One* 2015;10:e0144188.
28. Chaumont M, Racapé J, Broeders N, El Mountahi F, Massart A, Baudoux T, et al. Delayed Graft Function in Kidney Transplants: Time Evolution, Role of Acute Rejection, Risk Factors, and Impact on Patient and Graft Outcome. *American Journal of Transplantation* 2015;2015:163757.
29. Figueiredo A, Moreira P, Parada B, Nunes P, Macário F, Bastos C, et al. Risk factors for delayed renal graft function and their impact on renal transplantation outcome. *Transplantation Proceedings* 2007;39:2473-5.
30. Moreira P, Sá H, Figueiredo A, Mota A. Delayed renal graft function: risk factors and impact on the outcome of transplantation. *Transplantation Proceedings* 2011;43:100-5.
31. Goh CC, Ladouceur M, Peters L, Desmond C, Tchervenkov J, Baran D. Lengthy cold ischemia time is a modifiable risk factor associated with low glomerular filtration

rates in expanded criteria donor kidney transplant recipients. *Transplantation Proceedings* 2009;41:3290-2.

32. Kayler LK, Magliocca J, Zendejas I, Srinivas TR, Schold JD. Impact of cold ischemia time on graft survival among ECD transplant recipients: a paired kidney analysis. *American Journal of Transplantation* 2011;11:2647-56.

33. Sert I, Colak H, Tugmen C, Dogan SM, Karaca C. The effect of cold ischemia time on delayed graft function and acute rejection in kidney transplantation. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation* 2014;25:960-6.

34. Debout A, Foucher Y, Trébern-Launay K, Legendre C, Kreis H, Mourad G, et al. Each additional hour of cold ischemia time significantly increases the risk of graft failure and mortality following renal transplantation. *Kidney International* 2015;87:343-9.

35. Requião-Moura LR, Durão Junior MS, Matos AC, Pacheco-Silva A. Ischemia and reperfusion injury in renal transplantation: hemodynamic and immunological paradigms. *Einstein (Sao Paulo)* 2015;13:129-35.

36. Hu H, Knetchle SJ. Elevation of multiple cytokines/chemokines in urine of human renal transplant recipients with acute and chronic injuries: potential usage for diagnosis and monitoring. *Transplantation Reviews* 2006;20:165-71.

37. Furuichi K, Gao JL, Horuk R, Wada T, Kaneko S, Murphy PM. Chemokine receptor CCR1 regulates inflammatory cell infiltration after renal ischemia-reperfusion injury. *The Journal of Immunology* 2008;181:8670-6.

38. Pereira AB, Rezende NA, Teixeira AL, Teixeira MM, Simões e Silva AC. Citocinas e quimiocinas no transplante renal. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 2009;31:286-296

39. Dikow R, Becker LE, Schaier M, Waldherr R, Gross ML, Zeier M. In renal transplants with delayed graft function chemokines and chemokine receptor expression predict long-term allograft function. *Transplantation* 2010;90:771-6.
40. Mueller TF, Solez K, Mas V. Assessment of kidney organ quality and prediction of outcome at time of transplantation. *Seminars in Immunopathology* 2011; 33:185-199.
41. Bouma HR, Ploeg RJ, Schuurs TA. Signal transduction pathways involved in brain death-induced renal injury. *American Journal of Transplantation* 2009;9:989-97.
42. Kaminska D, Tyran B, Mazanowska O, Rabczynski J, Szyber P, Patrzalek D, et al. Cytokine gene expression in kidney allograft biopsies after donor brain death and ischemia-reperfusion injury using in situ reverse-transcription polymerase chain reaction analysis. *Transplantation* 2007;84:1118-24.
43. Kamińska D, Kościelska-Kasprzak K, Drulis-Fajdasz D, Hałoń A, Polak W, Chudoba P, et al. Kidney ischemic injury genes expressed after donor brain death are predictive for the outcome of kidney transplantation. *Transplantation Proceedings* 2011;43:2891-4.
44. Iznerowicz A, Chudoba P, Kamińska D, Kościelska-Kasprzak K, Drulis-Fajdasz D, Hałoń A, et al. Duration of brain death and cold ischemia time, but not warm ischemia time, increases expression of genes associated with apoptosis in transplanted kidneys from deceased donors. *Transplantation Proceedings* 2011;43:2887-90.
45. 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.

-
46. Hribova P, Kotsch K, Brabcova I, Vitko S, Volk HD, Lacha J. Cytokines and chemokine gene expression in human kidney transplantation. *Transplantation Proceedings* 2005;37:760-3.
 47. Hu H, Kwun J, Aizenstein BD, Knechtle SJ. Noninvasive detection of acute and chronic injuries in human renal transplant by elevation of multiple cytokines/chemokines in urine. *Transplantation* 2009;87:1814-20.
 48. Devarajan P, Mishra J, Supavekin S, Patterson LT, Steven Potter S. Gene expression in early ischemic renal injury: clues towards pathogenesis, biomarker discovery, and novel therapeutics. *Molecular Genetics and Metabolism* 2003;80:365-76.
 49. Mas VR, Mueller TF, Archer KJ, Maluf DG. Identifying biomarkers as diagnostic tools in kidney transplantation. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2011;11:183-96.
 50. Pereira AB, Teixeira AL, Rezende NA, Pereira RM, Miranda DM, Oliveira EA, et al. Urinary chemokines and anti-inflammatory molecules in renal transplanted patients as potential biomarkers of graft function: a prospective study. *International Urology and Nephrology* 2012;44:1539-48.
 51. Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends in Immunology* 2001;22:83-7.
 52. Krensky AM, Ahn YT. Mechanisms of disease: regulation of RANTES (CCL5) in renal disease. *Nature Clinical Practice Nephrology* 2007;3:164-70.
 53. Viedt C, Orth SR. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the kidney: does it more than simply attract monocytes? *Nephrology Dialysis Transplantation* 2002;17:2043-7.

-
54. Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clinica Chimica Acta* 2010;411:1570-9.
55. Sharma VK, Bologa RM, Xu GP, Li B, Mouradian J, Wang J, et al. Intragraft TGF-beta 1 mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney International* 1996;49:1297-303.
56. Pribylova-Hribova P, Kotsch K, Lodererova A, Viklicky O, Vitko S, Volk HD, et al. TGF-beta1 mRNA upregulation influences chronic renal allograft dysfunction. *Kidney International* 2006;69:1872-9.
57. Saigo K, Akutsu N, Maruyama M, Otsuki K, Hasegawa M, Aoyama H, et al. Study of transforming growth factor- β 1 gene, mRNA, and protein in Japanese renal transplant recipients. *Transplantation Proceedings* 2014;46:372-5.
58. Sinuani I, Beberashvili I, Averbukh Z, Sandbank J. Role of IL-10 in the progression of kidney disease. *World Journal of Transplantation* 2013;3:91-8.
59. Hueso M, Navarro E, Moreso F, O'Valle F, Pérez-Riba M, Del Moral RG, et al. Intragraft expression of the IL-10 gene is up-regulated in renal protocol biopsies with early interstitial fibrosis, tubular atrophy, and subclinical rejection. *American Journal of Pathology* 2010;176:1696-704.
60. Veronese F, Rotman S, Smith RN, Pelle TD, Farrell ML, Kawai T, et al. Pathological and clinical correlates of FOXP3+ cells in renal allografts during acute rejection. *American Journal of Transplantation* 2007;7:914-22.
61. Bunnag S, Allanach K, Jhangri GS, Sis B, Einecke G, Mengel M, et al. FOXP3 expression in human kidney transplant biopsies is associated with rejection and time post transplant but not with favorable outcomes. *American Journal of Transplantation* 2008;8:1423-33.

62. Dummer CD, Carpio VN, Gonçalves LF, Manfro RC, Veronese FV. FOXP3+ regulatory T cells: from suppression of rejection to induction of renal allograft tolerance. *Transplant Immunology* 2012;26:1-10.
63. Pêgas KL, Michel K, Garcia VD, Goldani J, Bittar A, Seelig D, et al. Histopathological analysis of pre-implantation donor kidney biopsies: association with graft survival and function in one year post-transplantation. *Journal Brasileiro de Nefrologia* 2014;36:186-93.
64. Haas M. Donor kidney biopsies: pathology matters, and so does the pathologist. *Kidney International* 2014;85:1016-9.
65. 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. *American Journal of Transplantation* 2008;8:753-60.
66. Mueller TF, Reeve J, Jhangri GS, Mengel M, Jacaj Z, Cairo L, et al. The transcriptome of the implant biopsy identifies donor kidneys at increased risk of delayed graft function. *American Journal of Transplantation* 2008;8:78-85.
67. 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;43:67-9.
68. 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;17:1311-22.
69. 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;85:626-35.

-
70. Molnar AO, Fergusson D, Tsampalieros AK, Bennett A, Fergusson N, Ramsay T, et al. Generic immunosuppression in solid organ transplantation: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2015;350:h3163.
71. Peddi VR, Wiseman A, Chavin K, Slakey D. Review of combination therapy with mTOR inhibitors and tacrolimus minimization after transplantation. *Transplantation Reviews* 2013;27:97-107.
72. Shihab F, Christians U, Smith L, Wellen JR, Kaplan B. Focus on mTOR inhibitors and tacrolimus in renal transplantation: pharmacokinetics, exposure-response relationships, and clinical outcomes. *Transplant Immunology* 2014;31:22-32.
73. Masola V, Zaza G, Granata S, Gambaro G, Onisto M, Lupo A. Everolimus-induced epithelial to mesenchymal transition in immortalized human renal proximal tubular epithelial cells: key role of heparanase. *Journal of Translational Medicine* 2013;11:292.
74. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine* 1998;15:539-53.
75. American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2012;35:14-35.
76. Rollag H, Ueland T, Asberg A, Hartmann A, Jardine AG, Humar A, et al. Characterization of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients by markers of inflammation in plasma. *PLoS One* 2013;8:e60767.
77. Martins PN, Pratschke J, Pascher A, Fritsche L, Frei U, Neuhaus P, et al. Age and immune response in organ transplantation. *Transplantation* 2005;79:127-32.

-
78. Nijboer WN, Schuurs TA, van der Hoeven JA, Fekken S, Wiersema-Buist J, Leuvenink HG, et al. Effect of brain death on gene expression and tissue activation in human donor kidneys. *Transplantation* 2004;78:978-86.
79. Schuurs TA, Gerbens F, van der Hoeven JA, Ottens PJ, Kooi KA, Leuvenink HG, et al. Distinct transcriptional changes in donor kidneys upon brain death induction in rats: insights in the processes of brain death. *American Journal of Transplantation* 2004;4:1972-81.
80. Kusaka M, Kuroyanagi Y, Kowa H, Nagaoka K, Mori T, Yamada K, et al. Genome wide expression profiles of rat model renal isografts from brain dead donors. *Transplantation* 2007;83:62-70
81. de Vries DK, Lindeman JH, Ringers J, Reinders ME, Rabelink TJ, Schaapherder AF. Donor brain death predisposes human kidney grafts to a proinflammatory reaction after transplantation. *American Journal of Transplantation* 2011;11:1064-70.
82. Barklin A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 2009;53:425-35.
83. Westendorp WH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Brain death induced renal injury. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2011;16:151-6.
84. Damman J, Bloks VW, Daha MR, van der Most PJ, Sanjabi B, van der Vlies P, et al. Hypoxia and Complement-and-Coagulation Pathways in the Deceased Organ Donor as the Major Target for Intervention to Improve Renal Allograft Outcome. *Transplantation* 2015;99:1293-300.
85. Kinsey GR, Huang L, Vergis AL, Li L, Okusa MD. Regulatory T cells contribute to the protective effect of ischemic preconditioning in the kidney. *Kidney International* 2010;77:771-80.

-
86. Gandolfo MT, Jang HR, Bagnasco SM, Ko GJ, Agreda P, Satpute SR, et al. Foxp3+ regulatory T cells participate in repair of ischemic acute kidney injury. *Kidney International* 2009;76:717-29.
87. Kinsey GR, Sharma R, Huang L, Li L, Vergis AL, Ye H, et al. Regulatory T cells suppress innate immunity in kidney ischemia-reperfusion injury. *Journal of the American Society of Nephrology* 2009;20:1744-53.
88. Shen H, Kreisel D, Goldstein DR. Processes of sterile inflammation. *The Journal of Immunology* 2013;191:2857-63.
89. Otterbein LE, Fan Z, Koulmanda M, Thronley T, Strom TB. Innate immunity for better or worse govern the allograft response. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2015;20:8-12.
90. Zhuang Q, Lakkis FG. Dendritic cells and innate immunity in kidney transplantation. *Kidney International* 2015;87:712-8.
91. Iyer SS, Pulskens WP, Sadler JJ, Butter LM, Teske GJ, Ulland TK, et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009;106:20388-93.
92. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews of Immunology* 2010;10:826-37.
93. Hoffmann SC, Kampen RL, Amur S, Sharaf MA, Kleiner DE, Hunter K, et al. Molecular and immunohistochemical characterization of the onset and resolution of human renal allograft ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2002;74:916-23.
94. Schwacha MG, Rani M, Zhang Q, Nunez-Cantu O, Cap AP. Mitochondrial damage-associated molecular patterns activate $\gamma\delta$ T-cells. *Innate Immunity* 2014;20:261-8.

95. Thorp EB, Stehlik C, Ansari MJ. T-cell exhaustion in allograft rejection and tolerance. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2015;20:37-42.
96. Salvadori M, Scolari MP, Bertoni E, Citterio F, Rigotti P, Cossu M, et al. Everolimus with very low-exposure cyclosporine a in de novo kidney transplantation: a multicenter, randomized, controlled trial. *Transplantation* 2009;88:1194-202.
97. Budde K, Becker T, Arns W, Sommerer C, Reinke P, Eisenberger U, et al. Everolimus-based, calcineurin-inhibitor-free regimen in recipients of de-novo kidney transplants: an open-label, randomised, controlled trial. *Lancet* 2011;377:837-47.

7. APÊNDICES

Apêndice I. Artigo científico submetido ao *American Journal of Transplantation*

Preimplantation and intragraft molecular profiles from serial biopsies of standard and extended criteria donor kidneys: The effects of donor type and immunosuppressive protocols

C. M. Mazeti-Felicio,¹⁺ H. C. Caldas,¹⁺ I. M. M. Fernandes-Charpiot,^{1,2} C. Z. Dezotti,¹ M. A. S. F. Baptista,^{1,2} and M. Abbud-Filho^{1,2,3*}

¹Laboratory of Immunology and Experimental Transplantation - LITEX, Medical School of Sao Jose do Rio Preto, Sao Jose do Rio Preto, SP, Brazil

²Kidney Transplant Unit, Hospital de Base, FAMERP/FUNFARME, Sao Jose do Rio Preto, SP, Brazil

³Urology and Nephrology Institute, Sao Jose Rio Preto, SP, Brazil

+ Both authors contributed equally in the preparation of the manuscript

Running title: Molecular profiles from extended criteria donor kidney

Institution and correspondence address:

Address reprint requests to Mario Abbud-Filho MD, PhD

Department of Medicine/Nephrology – Medical School Famerp-HB/Funfarme

Laboratory of Immunology and Transplantation Experimental - LITEX

Av Brigadeiro Faria Lima 5416- 15090-000.

Sao Jose do Rio Preto, SP, Brazil

Phone: +55 173201-5739

E-mail: mabbud@terra.com.br

Abstract

The tools used to predict the outcomes of expanded criteria donors (ECDs) lead to conflicting results. We sought to determine whether kidney biopsies (Bxs) from ECDs and standard criteria donors (SCDs) have different molecular profiles and whether immunosuppressive regimens (ISRs) change these profiles. Recipients received either tacrolimus (Tac) or everolimus (Eve). Bxs were performed at preimplantation (T0), 15 (T15) and day 90 (T90) and clinical outcomes were correlated with gene expression. The T0 Bxs of the ECDs showed increased expression of MCP-1, RANTES, TGF- β 1 and IL-10 compared with SCDs. The T15 and T90 Bxs had similar transcripts, with an upregulation of all cytokines. Distinct molecular profiles emerged when we subtracted the T15 and T90 cytokine expression from the T0: although SCD transcripts persisted with cytokine upregulation, ECD were downregulated regardless of ISR. We conclude that pre-implantation Bxs of ECD kidneys have a molecular profile distinct from that of SCD. After Tx, cytokines expression presented upregulated in SCD and downregulated in ECD, regardless the ISR. Identifying molecular profiles might provide insights for donor pretreatment and help to improve the fate of an ECD allograft.

Abbreviations:

AR, acute rejection

BPAR, biopsy proven rejection

BXL, basiliximab

CNI, calcineurin inhibitors

DAMPs, damage-associated molecular patterns

Eve, everolimus

MYF, sodium mycophenolate

P, prednisone

qRT-PCR, real-time polymerase chain reaction quantitative

Tac, tacrolimus

Tx, kidney transplantation

T0, pre-implantation biopsies

T15, biopsies 15 days after transplant

T90, biopsies 90 days after transplant

β -ACTIN, beta-actin

$\Delta\Delta$ Ct, Ct-threshold cycle

Introduction

The imbalance between the high demand and reduced supply of organs for kidney transplantation (Tx) has resulted in a growing waiting list. This imbalance has motivated transplant centers to accept “non-ideal” kidneys recovered from expanded criteria donors (ECDs) (1-3). However, the graft survival of ECD kidneys is generally worse than that of standard criteria donor (SCD) kidneys. Histopathological assessments of the pre-implantation biopsies (Bxs) of ECD kidneys to evaluate organ suitability are controversial and thus, these kidneys are often discarded (4).

A recent review showed that, despite the plethora of appraisal tools used to assess the quality of deceased donor kidneys, few demonstrate a satisfactory predictive power for clinical practice (5). It has become evident that the fear of using “inferior quality” kidneys has been used to justify their disposal. In 2011, 18% of all donated kidneys were discarded, which seriously and negatively affected waitlisted patients (4-7).

A genomic approach to determine intragraft events might be useful in two ways. First, a molecular analysis of preimplantation Bxs might provide a useful molecular profile baseline to help establish organ quality and avoid inappropriate disposals (8-10). Second, the characterization of post-Tx molecular profiles might be used to quantitatively measure the ongoing intragraft inflammatory burden, thereby providing information beyond histopathology and clinical variables (8, 11-13).

Consequently, identifying the patterns associated with the inflammatory and anti-inflammatory molecules of ECD kidneys and their associated genes might be an interesting approach to understand the outcomes of this procedure and reduce the kidney discard rate, thereby increasing the organ donor pool (14-15).

In addition, the effect of immunosuppressive regimens in the ongoing intragraft molecular events of ECD kidneys has not yet been established. Calcineurin inhibitor (CNI)-based therapies are the most common protocols used to maintain kidney transplants. However, they are associated with nephrotoxicity and might contribute to chronic allograft nephropathy (7). On the other hand, CNI-free protocols are associated with a higher risk of acute rejection (AR), delayed graft function (DGF), primary nonfunctioning kidneys and other adverse effects compared with CNI-based immunosuppression regimens (ISRs) (16).

In the present study, we tried to understand why patients who received ECD kidneys fared worse than those who received SCD kidneys. We sought to identify gene expression molecular profiles in preimplantation Bxs taken from SCD and ECD kidneys. Next, we studied the intragraft gene expression from serial Bxs and searched for associations between clinical outcomes and specific molecular profiling to evaluate the molecular transcriptional changes associated with an ISR.

Materials and Methods

Study design and sample

In this exploratory, prospective, single-center study, 80 patients were enrolled between January 2012 and December 2013. Of these patients, 13 were excluded because of primary non-function (n = 4), technical losses (n = 2), consent withdrawn (n = 5) or investigator decision (n = 2). A total of 67 patients were in the intention-to-treat population (SCD = 43; ECD = 24) and were randomized by treatment with either tacrolimus (Tac) or *de novo* everolimus (Eve) (Figure 1). The major exclusion criteria included re-transplant patients with previous multiple organ transplants, previous liver

transplant, HIV positive and a panel of reactive antibodies > 30% at the most recent assessment.

Written informed consent was obtained from all the patients before inclusion in the study that was approved by the Institutional Ethics Committee of Cardiovascular Diseases Institute of Sao Jose do Rio Preto in accordance with current standards for human research.

Immunosuppressive Regime (ISR)

Thirty recipients were randomly assigned to receive 1.5 mg/d of Eve (Certican®; Novartis, Basel, Switzerland) starting on the day of Tx with a target trough concentration of 3–8 ng/mL or 0.15 mg/kg/d Tac (Tarfic®; Libbs, Sao Paulo, Brazil), with a target trough concentration of 8–12 ng/mL over the first 3 months and 5-10 ng/mL thereafter. All patients received an induction therapy of 20 mg x 2 doses Basiliximab® (Simulect, Novartis) and a maintenance therapy of 1440 mg/dL Enteric Coated Sodium Mycophenolate (Myfortic®, Novartis) and Prednisone administered according to the practice of the center.

Definitions

ECD was defined in accordance with previous reports. DGF was defined as the need for dialysis within the first week after Tx (8, 17).

AR was diagnosed in the clinical setting of graft dysfunction and via histology (biopsy-proven rejection; BPAR) according to the Banff 2007 histopathological criteria (18). A post-transplant diabetes mellitus (PTDM) diagnosis was performed based on descriptions from the World Health Organization (WHO) and the American Diabetic

Association (ADA) (19, 20). A cytomegalovirus (CMV) infection was defined when the CMV DNA load-testing cutoff was $> \log 2.1$ or > 150 copies. CMV disease was defined as the presence of CMV DNA in the plasma and clinical signs of disease (21). Graft failure was defined as the return date to chronic dialysis. Glomerular filtration rate (GFR) was measured by the 24 hour creatinine clearance

Protocol Bx and histological study

A wedge Bx was performed immediately before each kidney implantation (T0) and at 15 (T15) and 90 (T90) days after Tx. Bxs were obtained under ultrasound guidance using a cannula Biocore II MG (16 Ga X 15 cm) semi-automatic biopsy gun. Half of each Bx was used for a histological analysis. The remaining section was immediately immersed in RNAlater (Ambion, Applied Biosystems) for molecular evaluation. A pathologist blinded to the genomic analysis assessed the histopathologic diagnosis. Histological lesions were classified using the Banff 2007 criteria (18).

Donor and recipient clinical variables

The demographics of the evaluated donors and recipients are shown in Table 1.

Intragraft gene expression according to quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Graft fragments were macerated and processed for RNA extraction using Trizol Reagent (Ambion, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Total RNA (2.0 μg) was reverse transcribed using high-

capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer`s instructions to a final volume of 20 µl.

To evaluate gene expression levels, a TaqMan® qRT-PCR was performed based on Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) protocols. The TaqMan Assay reagents for the detection and quantification of the FOXP3, IL-10, TGF-β1, CCL5/RANTES and CCL2/MCP-1 genes were designed using Applied Biosystems. All samples were conducted in triplicate using a StepOnePlus RT-PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and normalized to the expression of GAPDH and β-ACTIN. Relative quantification was performed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Ct threshold cycle). The reference group consisted of samples obtained from SCD kidney recipients without DGF or AR. The results are expressed as medians of relative expression.

Statistical Analyses

The data are presented as absolute numbers, means ± SD, medians or percentages. The gene quantifications are shown as boxplots with logarithmic data transformations. mRNA levels were analyzed using the Kruskal-Wallis test for all treatment groups. Tukey`s test was used for between-group multiple comparisons. The Mann-Whitney U test was used for between-group comparisons. Fisher`s exact test was used to compare the qualitative variables. A multivariate linear regression analysis was performed to determine the independent factors that influence the relative expression in the Bxs after one year. Multiple bivariated logistic regressions were performed to analyze the clinical variables associated with a relative expression risk that included a term for the randomized treatment group (Eve vs. Tac) and adjustment for other covariates including donor age, cold-ischemia time (CIT), and donor type (SCD vs. ECD). Graft survival

analyses were based on the time between Tx and graft failure (censoring of death). The patient survival analyses were based on the time between Tx and death with a functioning kidney (censoring of dialysis returns) and calculated using the Kaplan-Meier method for log-rank comparison tests.

All analyses were performed using Stats Direct version 2.5.7 (Stats Direct Ltd.). The established significance level was a p-value of < 0.05 .

RESULTS

Donor and recipient demographics

The variables analyzed for the 44 SCDs and 23 ECDs are summarized in Table 1. After one year, three patients were lost to follow up. A between-group comparison showed that the ECDs were significantly older than the SCDs (mean age = 57 ± 6 vs. 37 ± 13 year, $p = 0.0001$) and had higher rates of death due to cerebrovascular accident ($p = 0.02$) and arterial hypertension ($p = 0.001$). CIT, the number of diabetic donors and hospitalization length were similar for both groups.

The demographics of the recipients based on type of kidney received and clinical outcomes are shown in Table 1. Tac and Eve were administered to 51% and 49% of the SCD patients, respectively, and to 57% and 43% of the SCD recipients, respectively. The ECD recipients were older than the SCD recipients (45 ± 12 vs. 52 ± 9 years; $p = 0.01$) and had more HLA-DR mismatches. No differences in race, gender, CMV status, or pre-Tx diabetes mellitus were observed between the groups. Similar rates of AR (12% vs. 14%; $p = \text{NS}$), DGF (67% vs. 71%; $p = \text{NS}$) and DGF duration (15 ± 6.7 vs. 14 ± 6 days; $p = \text{NS}$) were found in the SCDs and ECDs, respectively. Both serum creatinine (Scr; SCD = 1.4 ± 0.55 mg/dL vs. ECD = 1.72 ± 0.65 mg/dL; $p = 0.04$) and

the glomerular filtration rate (GFR; SCD = 68 ± 25 mL/min vs. ECD = 51 ± 17 mL/min; $p = 0.02$) at 12 months post-Tx were worse for the ECD group than the SCD group. The one-year patient ($p = 0.04$) and graft ($p = 0.016$) survival rates were significantly lower for the ECD than the SCD recipients (Table 1).

The clinical outcomes of the patients treated with Tac or Eve within the recipient population are shown in Table 2. The age and DGF rates were similar between the Tac and Eve groups. However, the patients treated with Eve showed a longer duration of DGF (Tac = 12 ± 5 days vs. Eve = 16 ± 7.3 days; $p = 0.04$). The AR rates were approximately threefold higher in the Eve group than the Tac group (Tac = 6% vs. Eve = 17%; $p = \text{NS}$). After one year, the Scr and GFR were similar between the groups, although lower 24-h proteinuria levels were observed among the Tac-treated patients (Tac = 0.37 ± 0.59 g/24 h vs. Eve = 0.53 ± 0.67 g/24 h; $p = 0.02$). The CMV infection rate was higher in the Tac group than the Eve group (Tac = 71% vs. Eve = 40%; $p = 0.02$). PTDM was twofold higher among the patients receiving Tac ($p = \text{NS}$).

To study the clinical outcomes based on donor type combined with ISR, we stratified the cohort into four subgroups of patients: SCD-Tac = 22, ECD-Tac = 12, SCD-Eve = 21, and ECD-Eve = 9 (Table 2).

We did not identify differences with regard to age or the rate and duration of DGF among the four subgroups. The AR rates were similar; however, a trend toward higher AR rates was observed among the patients treated with Eve (SCD-Tac = 4.5%; ECD-Tac = 8%; SCD-Eve = 19%; ECD-Eve = 11%; $p = \text{NS}$). The one-year Scr was significantly lower for the ECD-Tac group than the ECD-Eve group (1.6 ± 0.3 vs. 1.9 ± 0.9 mg/dL; $p = 0.03$). Those receiving SCD kidneys had similar one-year serum creatinine levels regardless of the ISR (SCD-Tac = 1.36 ± 0.48 vs. SCD-Eve = $1.45 \pm$

0.6 mg/dL; $p = \text{NS}$). The GFR did not differ among the four subgroups, although the SCD recipients showed GFR values at least 15 mL/min higher than the ECD recipients (Table 2). Similarly, the 24-hour proteinuria levels did not differ among the subgroups. However, the levels tended to be higher in the subgroups treated with Eve (Table 2). CMV was significantly less frequently associated with Eve compared with Tac (ECD-Tac = 83% vs. ECD-Eve = 33%, $p = 0.03$; SCD-Tac = 59% vs. SCD-Eve = 24%; $p = 0.03$). No patient in the ECD-Eve group had PTDM, whereas a 33% occurrence rate was observed within the ECD-Tac group ($p = 0.01$; Table 2).

The complications resulting from surgical wounds were marginally more frequent in the Eve group ($p = 0.06$). Infectious complications were similar across both groups (Table 3). The most frequent infections were urinary tract infections, followed by respiratory tract and herpes virus infections.

Histological findings

A normal histology of the T0 Bxs was observed in 33% and 14% of the SCD and ECD kidneys, respectively ($p = \text{NS}$). Mild interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA ≤ 1) were similar across both groups. IFTA values > 1 were almost threefold more common for the ECD kidneys than the SCD kidneys ($p = \text{NS}$; Table 4).

At T15, no ECD recipient showed normal graft histology, whereas 26.5% of the SCD group had normal graft histology. IFTA values ≤ 1 occurred at similar rates among the patients from the SCD group using either Tac (63%) or Eve (68%) and was higher among the ECD-Tac (73%) patients compared with the ECD-Eve (44.5%) patients. No SCD kidney showed an IFTA value > 1 . However, 20% of the ECDs were diagnosed with IFTA (Tac = 9% vs. Eve = 11%; $p = \text{NS}$; Table 4).

BPAR IA/IB was twofold more common in 20% of the ECD recipients (Tac = 9%; Eve = 11%) compared with the SCD group (10%). However, this difference was not significant (Table 4). Only one patient from the SCD-Eve group had BPAR Banff III.

At T90, a normal histology was found in 10.5% of the SCD-Tac and 12.5% of ECD-Eve groups. A large majority of the Bxs presented with IFTA values ≤ 1 for all subgroups, whereas IFTA values > 1 were detected in 17.5% and 11% of the SCD and ECD groups, respectively. Only one patient from the ECD-Eve group had BPAR IA/IB (Table 4).

Molecular profile of the pre-implantation Bxs

To assess the inflammatory burden of the SCD and ECD kidneys, we studied the cytokine gene expression of 80 T0 Bxs (ECD = 28; SCD = 52). The pro-inflammatory molecules MCP-1 ($p = 0.016$), RANTES ($p = 0.008$), TGF- β 1 ($p = 0.04$) and anti-inflammatory IL-10 ($p = 0.0005$) were significantly upregulated in the ECD kidneys compared with the SCD kidneys. The FOXP3 gene was similarly expressed in both types of kidneys (Figure 2). A multivariate linear regression analysis showed that the duration of donor hospitalization was independently associated with the upregulation of MCP-1 ($p = 0.04$), RANTES ($p = 0.05$) and FOXP3 ($p = 0.01$). ECD kidneys showed a high expression of both inflammatory cytokines MCP-1 ($p = 0.02$) and RANTES ($p = 0.006$), whereas increased TGF- β 1 expression was only associated with serum creatinine at recovery ($p = 0.04$). Donor age and CIT were not associated with any of the transcripts studied (Table 5).

Molecular profiles of the T15 and T90 Bxs, donor type and ISR

A total of 64 T15 Bxs and 51 T90 Bxs were stratified based on the kidney donor type and ISR. Figures 3 and 4 show that the cytokine genes transcripts were not differently expressed throughout the sample.

A subgroup analysis showed that regardless of the Bx time and ISR, MCP-1 and RANTES were significantly upregulated in the SCD-Eve group (Figures 3 and 4); however, no differences were observed in the expression of IL-10 and TGF- β 1. The FOXP3 transcripts at T15 were upregulated in both groups (SCD and ECD) treated with Eve, whereas only the SCD-Eve group showed an increase in FOXP3 gene expression at T90 (Figures 3 and 4).

A multinomial logistic regression analysis showed that the FOXP3, MCP-1 and RANTES transcripts in the Bxs at T15 were strongly correlated with Eve immunosuppression. However, no correlations were found with regard to IL-10 or TGF- β 1 expression. Donor type, age, CIT, DGF and AR were not associated with any individual transcript (Table 6). The T90 Bxs exhibited different patterns in which the upregulation of FOXP3 was only correlated with the use of Eve and MCP-1, and IL-10 gene expression was correlated with DGF. No relationships with the TGF- β 1 and RANTES transcripts were found (Table 7).

Distinct molecular profiles for SCD and ECD arose when we subtracted the gene expression observed in the Bx at T0 from the post-Tx transcripts. Except for TGF- β 1, all of the transcripts in the SCD remained upregulated regardless of the ISR, with higher gene expression occurring in the Eve-treated patients (Figures 5A and B). However, the ECD kidneys showed a downregulation of all molecules, except for a mild upregulation of FOXP3 and RANTES observed at T15 (Figures 5A and 5B).

DISCUSSION

Overall, our clinical results confirmed previous reports showing that ECD recipients showed inferior renal function as well as lower graft and survival than SCD recipients (6,7,9,10). The subgroups based on donor type and ISR did not show significant differences with regard to DGF and renal function over the first year post-Tx, although a trend toward higher AR rates was observed among the Eve subgroups. We found that Eve-treated patients showed a longer duration of DGF, higher proteinuria and lower rates of CMV infection. However, more PTDM was found in the Tac-treated patients, corroborating previous data obtained from large clinical studies (22, 23).

Because we hypothesized that the worst outcomes associated with ECD kidneys were because of a different inflammatory burden compared with SCD kidneys, we examined whether the molecular transcripts found in ECD pre-implantation Bxs differed from those found in SCD kidneys. We found striking differences in the gene expression of the T0 Bxs from ECD and SCD kidneys. Pro-inflammatory MCP-1 and RANTES as well as anti-inflammatory IL-10 and TGF- β 1 were significantly more expressed in ECD than SCD kidneys (Figure 2).

These data support experimental and human studies showing that deceased brain donors (DBDs) develop a systemic pro-inflammatory state that predisposes their peripheral organs (e.g., the kidneys) to injury (24-27). This proinflammatory environment seems to be specific for DBDs because deceased cardiac donor kidneys with similar CITs do not have the same inflammatory profile.

Systemic inflammation has been attributed to hormonal changes, hemodynamic instability, age, CIT and the duration of hospitalization of a potential DBD (28, 29).

In our study, no differences were found regarding these variables between the SCD and ECD groups, except those inherent to the ECD classification (Table 1). However, the association found in the multivariate analysis among the upregulation of MCP-1, RANTES, donor type (ECD) and length of hospitalization (Table 5) reinforce the data suggesting an evolving inflammatory process beginning prior to organ retrieval (30).

Higher expression of IL-10 and TGF- β 1 might be because of an anti-inflammatory response generated against the pro-inflammatory milieu of these kidneys and as an attempt to repair ischemia tissue damage. Interestingly, both the independent associations between the length of hospitalization and the upregulation of FOXP3 gene as well as between TGF- β 1 and donor creatinine at recovery might be related to repair activity and the trafficking of different protective cell types, especially the CD4+ Tregs phenotype involved in the process to resolve ongoing kidney ischemia (31-33).

Donor and recipient age, possible confounds for the ECD outcomes, were not significantly associated with cytokine expression in the Bxs at T0 (Table 5).

Although systemic inflammation and the pro-inflammatory profile found in the T0 Bxs might be explained as the response to the insult occurring in DBDs during organ recovery, it does not explain why the molecular profile of the ECD kidneys had a much more robust inflammatory response than the SCD kidneys (Figure 2).

We suggest that this difference is related to the ischemia-driven, MHC-independent activation of innate immunity because dying cells are known to release damage-associated molecular patterns (DAMPs) into the extracellular environment and trigger sterile inflammation under conditions of cellular stress (34-36).

Another non-mutually exclusive hypothesis involving DAMPs is that the degree of hypoxia occurring before organ retrieval leads to the enhancement of pathways related to hypoxia, coagulation cascades, and a consequent release of DAMPs (30).

In this context, non-ideal organs (e.g., those from ECD who have longer stays in the hospital and more tissue damage) might release higher amounts of cellular debris and endogenous signaling molecules that activate innate immunity and result in a more potent sterile stimulus translated by the higher production of cytokines and chemokines (35, 37, 38).

Moreover, changes in the number of neutrophils, resident dendritic cells as well as CD4+, CD8+ and $\gamma\delta$ T cells infiltrating ECD kidneys might also influence the intensity of sterile inflammation and the T-cell-mediated adaptive immune response (39, 40).

After Tx, the transcript profiles found in the Bxs at T15 and T90 were similar and marked by an increased FOXP3 expression only in the Eve-treated subgroups, suggesting a causal relationship with drugs. In the T15 Bxs, the use of Eve was associated with the upregulation of FOXP3, MCP-1 and RANTES. At T90, however, the relationship was only with Eve. Given that high inflammatory activity events (e.g., DGF) and AR occur more frequently at T15, these results suggest both a balanced physiological inflammatory response and an effect of the mTOR inhibitor. T90 represents a more stable post-Tx period; therefore, the FOXP3 upregulation might be predominantly due to the activity of the Tregs cells reacting to injury/repair. The massive release of inflammatory cytokines detected via in situ hybridization or in plasma was reported in the pre-implantation kidney Bxs of living donors, DBDs and deceased cardiac donors; however, differences in the molecular profiles of SCDs and ECDs were not investigated (27, 41).

Because the pre-implantation Bxs of the SCD and ECD kidneys exhibited massive molecular gene expression, we reevaluated the intragraft transcripts without their respective T0 Bx inflammatory activity. Based on this analysis, two distinct gene expression profiles for the SCD and ECD kidneys emerged. Although the molecular transcripts of the SCD kidneys remained upregulated at T15 and T90, almost all of the molecules were downregulated in the ECD kidneys, except for the Bxs from the ECD-Eve patients who showed mild upregulations of FOXP3 and RANTES at T15 as well as IL-10 at T90 (Figures 3 and 4). Interestingly, the SCD-Eve Bxs exhibited patterns characterized by much higher levels of gene expression than the SCD-Tac Bxs at both periods, especially with regard to FOXP3. This unphysiological state of impaired cytokine production in the ECD kidneys might represent a poor functional state of activated T cells that are unable to mount an immunological response with an adequate balance between inflammatory and anti-inflammatory molecules (42).

The data presented in this paper suggest that ECD kidneys have tissue-specific characteristics that result in distinct molecular transcripts from SCD kidneys. We suggest that the difference in the molecular gene expression between the ECD and SCD kidneys are related to the innate immunity and intensity of sterile inflammation. After Tx, regardless of the ISR used, the SCD molecular profile remained predominantly pro-inflammatory, whereas the ECD kidneys generated an “exhausted” gene expression profile.

We acknowledge the limitations of this study, such as the small cohort sampled, the potential bias related to the transcriptome analysis, and the cost and feasibility of molecular tests performed in a clinical setting. Therefore, larger studies with more predictive power are needed to confirm our results.

In conclusion and to the best of our knowledge, this study is the first demonstrate that ECD kidneys have a molecular profile that indicates significantly more inflammation than that of SCD kidneys. The ECD molecular pattern at 3 months after Tx is also distinct from SCD, regardless of the ISR used.

These observations provide new insights for revisiting donor pretreatment strategies aimed at modifying the inflammatory molecular profile of ECD kidneys and consequently improving the clinical Tx outcomes of ECD recipients.

Acknowledgments

This research has been partially funded with resources from Novartis Pharma AG. We would like to thank CAPES – Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education within the Ministry of Education of Brazil for granting scholarships to CMMF.

Disclosure

MAF, IMMFC and MASFB received grants for research and congresses from Novartis.

References

1. García-Rubio JH, García JR, Hernández PC, López JM, Curado FA, Vallejo ML, et al. Correlation between dual kidney biopsy in expanded-criteria donors and transplant survival. *Transplant Proc* 2013; 45: 3606-3608.
2. Barba J, Zudaire JJ, Robles JE, Rosell D, Berian JM, Pascual I. Complications of kidney transplantation with grafts from expanded criteria donors. *World J Urol* 2013; 31: 893-900.

3. Assis-Borba L, Cristelli MP, Paula MI, Franco MF, Tedesco-Silva H, Medina-Pestana JO. Expanding the use of expanded criteria donors in kidney transplantation. *Int Urol Nephrol*. 2014; 46: 1663-1671.
4. Grifasi C, D'Alessandro V, D'Armiento M, Campione S, Scotti A, Pelosio L, Renda A. Can only histological evaluation determine the allocation of ECD kidneys? *BMC Nephrol*. 2014; 15:207.
5. 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.
6. 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. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 589-597.
7. Pascual J, Zamora J, Pirsch JD. A systematic review of kidney transplantation from expanded criteria donors. *Am J Kidney Dis* 2008; 52: 553-586.
8. Devarajan P, Mishra J, Supavekin S, Patterson LT, Steven Potter S. Gene expression in early ischemic renal injury: clues towards pathogenesis, biomarker discovery, and novel therapeutics. *Mol Genet Metab* 2003; 80: 365-376.
9. Merion RM, Ashby VB, Wolfe RA, Distant DA, Hulbert-Shearon TE, Metzger RA, et al. Deceased-donor characteristics and the survival benefit of kidney transplantation. *JAMA* 2005; 294: 2726-2733.
10. Fraser SM, Rajasundaram R, Aldouri A, Farid S, Morris-Stiff G, Baker R, et al. Acceptable outcome after kidney transplantation using "expanded criteria donor" grafts. *Transplantation* 2010; 89: 88-96.

11. Hribova P, Kotsch K, Brabcova I, Vitko S, Volk HD, Lacha J. Cytokines and chemokine gene expression in human kidney transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 760-763.
12. 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. *Mol Med* 2011; 17: 1311-1322.
13. Mas VR, Archer KJ, Dumur CI, Scian MJ, Suh JL, King AL, et al. Reduced expression of inflammatory genes in deceased donor kidneys undergoing pulsatile pump preservation. *PLoS One* 2012; 7: e35526.
14. Mueller TF, Reeve J, Jhangri GS, Mengel M, Jacaj Z, Cairo L, et al. The transcriptome of the implant biopsy identifies donor kidneys at increased risk of delayed graft function. *Am J Transplant* 2008; 8: 78-85.
15. Mas VR, Le TH, Maluf DG. Epigenetics in Kidney Transplantation: Current Evidence, Predictions, and Future Research Directions. *Transplantation*. 2016;100(1):23-38.
16. 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.
17. Baskin-Bey ES, Kremers W, Stegall MD, Nyberg SL. United Network for Organ Sharing's expanded criteria donors: is stratification useful? *Clin Transplant* 2005; 19: 406-412.
18. 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.

19. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998; 15: 539-553.
20. American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 35(1), S14. 2012.
21. Rollag H, Ueland T, Asberg A, Hartmann A, Jardine AG, Humar A, et al. Characterization of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients by markers of inflammation in plasma. *PLoS One* 2013; 8: e60767.
22. Budde K, Becker T, Arns W, Sommerer C, Reinke P, Eisenberger U, et al. Everolimus-based, calcineurin-inhibitor-free regimen in recipients of de-novo kidney transplants: an open-label, randomised, controlled trial. *Lancet* 2011; 377:837-47.
23. Salvadori M, Scolari MP, Bertoni E, Citterio F, Rigotti P, Cossu M, et al. Everolimus with very low-exposure cyclosporine a in de novo kidney transplantation: a multicenter, randomized, controlled trial. *Transplantation* 2009, 88:1194.
24. Nijboer WN, Schuurs TA, van der Hoeven JA, Fekken S, Wiersema-Buist J, Leuvenink HG, et al. Effect of brain death on gene expression and tissue activation in human donor kidneys. *Transplantation* 2004; 15: 978-986.
25. Schuurs TA, Gerbens F, van der Hoeven JA, Ottens PJ, Kooi KA, Leuvenink HG, et al. Distinct transcriptional changes in donor kidneys upon brain death induction in rats: insights in the processes of brain death. *Am J Transplant* 2004; 4(12):1972-81.
26. Kusaka M, Kuroyanagi Y, Kowa H, Nagaoka K, Mori T, Yamada K, et al. Genomewide expression profiles of rat model renal isografts from brain dead donors. *Transplantation* 2007; 83(1):62-70

27. de Vries DK, Lindeman JH, Ringers J, Reinders ME, Rabelink TJ, Schaapherder AF. Donor brain death predisposes human kidney grafts to a proinflammatory reaction after transplantation. *Am J Transplant* 2011; 11: 1064-1070.
28. Barklin A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand* 2009; 53: 425-35.
29. Westendorp WH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Brain death induced renal injury. *Curr Opin Organ Transplant* 2011;16: 151-156.
30. Damman J, Bloks VW, Daha MR, van der Most PJ, Sanjabi B, van der Vlies P, et al. Hypoxia and Complement-and-Coagulation Pathways in the Deceased Organ Donor as the Major Target for Intervention to Improve Renal Allograft Outcome. *Transplantation* 2015; 99: 1293-1300.
31. Kinsey GR, Sharma R, Huang L, Li L, Vergis AL, Ye H, et al. Regulatory T cells suppress innate immunity in kidney ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 1744-1753.
32. Gandolfo MT, Jang HR, Bagnasco SM, Ko GJ, Agreda P, Satpute SR, et al. Foxp3+ regulatory T cells participate in repair of ischemic acute kidney injury. *Kidney Int* 2009; 76: 717-729.
33. Kinsey GR, Huang L, Vergis AL, Li L, Okusa MD. Regulatory T cells contribute to the protective effect of ischemic preconditioning in the kidney. *Kidney Int* 2010; 77: 771-780.
34. Shen H, Kreisel D, Goldstein DR. Processes of sterile inflammation. *J Immunol* 2013; 191: 2857-2863.

35. Otterbein LE, Fan Z, Koulmanda M, Thronley T, Strom TB. Innate immunity for better or worse govern the allograft response. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015; 20: 8-12.
36. Zhuang Q, Lakkis FG. Dendritic cells and innate immunity in kidney transplantation. *Kidney Int* 2015; 87: 712-718.
37. Iyer SS, Pulskens WP, Sadler JJ, Butter LM, Teske GJ, Ulland TK, et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 20388-20393.
38. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10: 826-837.
39. Hoffmann SC, Kampen RL, Amur S, Sharaf MA, Kleiner DE, Hunter K, et al. Molecular and immunohistochemical characterization of the onset and resolution of human renal allograft ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*. 2002; 74: 916-923.
40. Schwacha MG, Rani M, Zhang Q, Nunez-Cantu O, Cap AP. Mitochondrial damage-associated molecular patterns activate $\gamma\delta$ T-cells. *Innate Immun*. 2014; 20: 261-268.
41. Kaminska D, Tyran B, Mazanowska O, Rabczynski J, Szyber P, Patrzalek D, et al. Cytokine gene expression in kidney allograft biopsies after donor brain death and ischemia-reperfusion injury using in situ reverse-transcription polymerase chain reaction analysis. *Transplantation*. 2007; 84: 1118-1124.
42. Thorp EB, Stehlik C, Ansari MJ. T-cell exhaustion in allograft rejection and tolerance. *Curr Opin Organ Transplant* 2015; 20: 37-42.

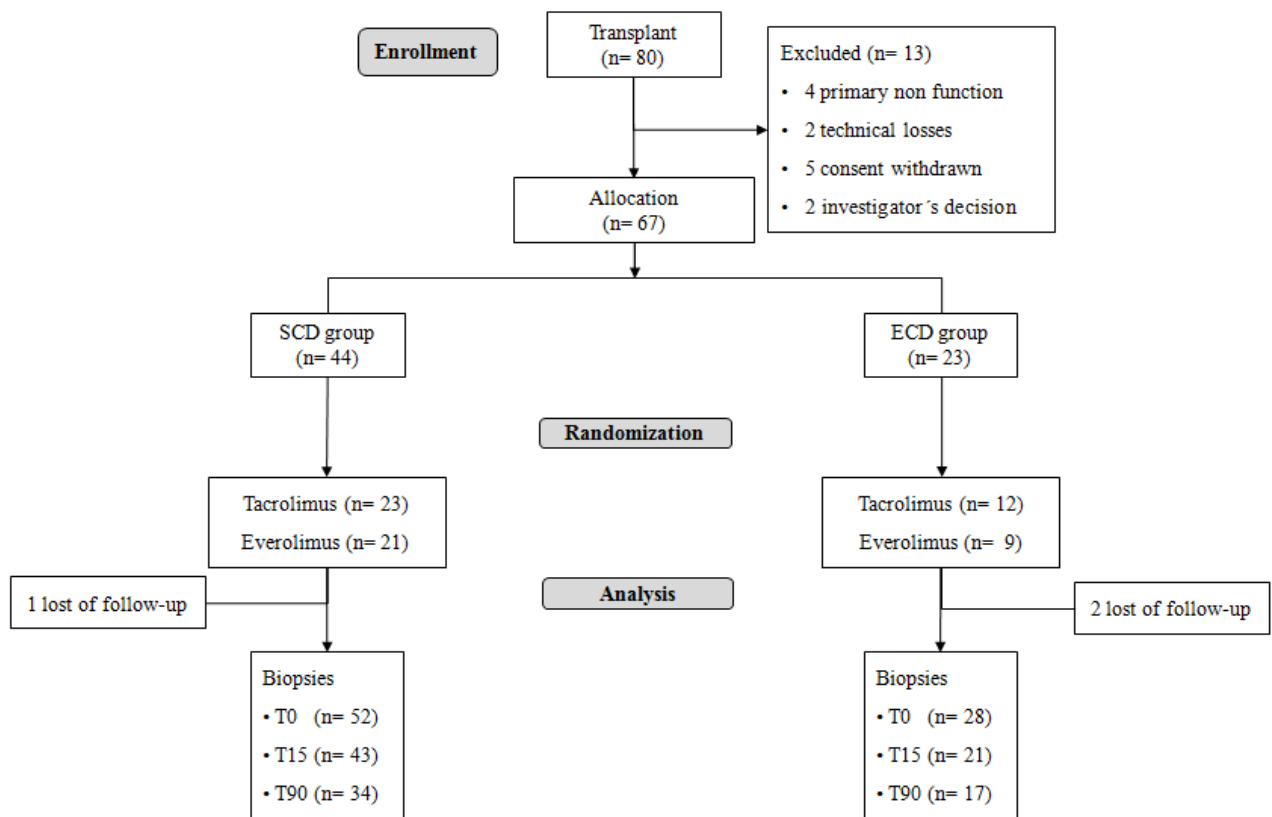


Figure 1. Patient populations and dispositions. A total of 80 patients were included in this study. Each patient had an adequate pre-implantation kidney Bx. At 12 months, 64 patients (43 in the SCD group and 21 in the ECD group) completed follow-up visits and had an adequate protocol Bx.

Table 1: Donor and recipient demographic characteristics and transplant data

Parameter	SCD (n = 43)	ECD (n = 21)	p- value
Donor characteristics			
Age, yr (mean \pm SD)	37 \pm 13	57 \pm 6	0.0001
Gender M(F)	22(21)	10(11)	NS
Cause of death			
Trauma [n (%)]	24 (56)	-	-
Cerebrovascular accident [n (%)]	17 (40)	21 (100)	0.02
Other cause of death [n (%)]	2 (4.5)	-	-
Last donor serum creatinine (mg/dL) (mean \pm SD)	1.55 \pm 1.12	1.65 \pm 1.07	NS
CIT (h) (mean \pm SD)	24 \pm 3.5	25.7 \pm 3.9	NS
Arterial hypertension [n (%)]	8 (17)	18 (56)	0.001
Diabetes Mellitus [n (%)]	2 (4.6)	2 (9.5)	NS
Time hospitalization (d) (mean \pm SD)	5.7 \pm 5	4.3 \pm 3	NS
Recipient characteristics			
Age, yr (mean \pm SD)	45 \pm 12	52 \pm 9	0.01
Race (Caucasian/non-Caucasian)	26/17	13/8	NS
Gender M(F)	31 (12)	16 (5)	NS
CMV [positive, n (%)]	18 (42)	13 (62)	NS
DGF [n (%)]	29 (67)	15 (71)	NS
DGF duration (d) (mean \pm SD)	15 \pm 6.7	14 \pm 6	NS
AR [n (%)]	5 (12)	3 (14)	NS
HLA Mismatch-AB (mean \pm SD)	2.75 \pm 0.3	2.79 \pm 0.7	NS
HLA Mismatch-DR (mean \pm SD)	0.35 \pm 0.5	0.75 \pm 0.6	0.01
Serum creatinine 12 mo (mg/dL)	1.4 \pm 0.5	1.72 \pm 0.6	0.04
GFR 12 mo (mL/min) (mean \pm SD)	68 \pm 25	51 \pm 17	0.02
Immunosuppression			
Tacrolimus [n (%)]	22 (51)	12 (57)	NS
Everolimus [n (%)]	21 (49)	9 (43)	NS
PTDM [n (%)]	6 (14)	4 (19)	NS
Patient survival 1 yr (%)	97.6	84.6	0.04
Graft survival 1 yr (%)	97.6	76.2	0.016

M: male; F: female; CIT: Cold ischemia time; CMV: Cytomegalovirus; DGF: Delayed graft function; AR: Acute rejection; HLA: Human leukocyte antigen; GFR: Glomerular filtration rate; PTDM: Post-transplant diabetes mellitus.

Table 2. Demographic and relevant clinical information based on immunosuppression and donor type.

	Tac (n = 34)	Eve (n = 30)	ECD-Tac (n = 12)	SCD-Tac (n = 22)	ECD-Eve (n=9)	SCD-Eve (n=21)
Receptor age, yr (mean ± SD)	48 ± 10	47 ± 12.5	51 ± 9.4	46.4 ± 10	54.2 ± 8.2	44 ± 13
DGF [n(%)]	22 (65)	22 (73.3)	8 (67)	14 (64)	7 (78)	15 (71)
Duration of DGF (d) (mean ± SD)	12 ± 5 ^a	16 ± 7.3	13 ± 7	12 ± 3.7	15.4 ± 5	16.6 ± 8.3
AR [n(%)]	2 (6)	5 (17)	1 (8)	1 (4.5)	1 (11)	4 (19)
Proteinuria 12 mo (mean ± SD)	0.37 ± 0.59 ^b	0.53 ± 0.67	0.26 ± 0.22	0.41 ± 0.67	0.60 ± 0.8	0.51 ± 0.6
GFR 12 mo (mean ± SD)	64 ± 23	63 ± 26	52.4 ± 13	67.6 ± 24.5	50.6 ± 21	67 ± 26.6
Serum creatinine 12 mo (mg/dl) (mean ± SD)	1.43 ± 0.4	1.60 ± 0.7	1.6 ± 0.3 ^d	1.36 ± 0.48	1.9 ± 0.9	1.45 ± 0.6
PTDM [n(%)]	7 (21)	3(10)	4 (33) ^e	3(14)	0	3(14)
CMV infection [n(%)]	24 (71) ^c	12 (40)	10(83) ^f	13(59) ^g	3(33)	5(24)
Patient survival 1 year (%)	93.8	90	90	100	90	95
Allograft survival 1 year (%)	91	87	70	100	82	95

^aTac vs. Eve (p= 0.04); ^bTac vs. Eve (p= 0.02); ^cTac vs. Eve (p= 0.02); ^dECD-Tac vs. ECD-Eve (p= 0.03); ^eECD-Tac vs. ECD-Eve (p= 0.01); ^fECD-Tac vs. ECD-Eve (p= 0.03); ^gSCD-Tac vs. SCD-Eve (p= 0.03). SCD: standard criteria donor; ECD: extended criteria donor; AR: acute rejection; DGF: delayed graft function; PTDM: new-onset diabetes after transplantation; CMV: Cytomegalovirus; NS: Not significant.

Table 3. Infectious and surgical complications

Complications	Tac (n=34)	Eve (n=30)	ECD-Tac (n=12)	SCD-Tac (n=22)	ECD-Eve (n=9)	SCD-Eve (n=21)
<i>Infections, n (%)</i>						
Herpes simples	1 (3)	2 (6)	0	1 (4.5)	1 (11)	1 (5)
Herpes zoster	2 (6)	3 (10)	2 (17)	0	2 (22)	1 (5)
Urinary tract infection	10 (29)	8 (26)	5 (42)	5 (23)	5 (55) ^b	3 (14)
Pneumonia	6 (17)	6 (20)	4 (33)	2 (9)	3 (33)	3 (14)
Others	7 (20.6)	5 (16.5)	2 (16)	5 (23)	2 (22)	3 (14)
Sepsis	1 (3)	3 (10)	1 (8)	0	2 (22)	1 (5)
Fungal infection	5 (15)	1 (3)	2 (16)	3 (25)	0	1 (5)
<i>Surgical Complications, n (%)</i>						
Surgical wound	4 (12) ^a	9 (30)	2 (16)	2 (9)	2 (22)	7 (33)
Lymphocele	7 (21)	7 (23)	2 (16)	5 (23)	2 (22)	5 (24)

^aTac vs. Eve (p= 0.04); ^bECD-Eve vs. SCD-Eve (p= 0.03).

Table 4: Kidney biopsies histological findings

<i>Histological grade, n(%)</i>	<i>T0</i>			<i>T15</i>						<i>T90</i>					
	SCD (n=52)	ECD (n=28)	p value	Tac (n=19)	SCD Eve (n=19)	p value	Tac (n=11)	Eve (n=9)	p value	Tac (n=19)	SCD Eve (n=15)	p value	Tac (n=9)	Eve (n=8)	p value
Normal histology	17 (33)	4 (14)	NS	3 (16)	2 (10.5)	NS				2 (10.5)				1 (12.5)	
IF/TA ≤ I	33 (63)	21 (75)	NS	12 (63)	13 (68)	NS	8 (73)	4 (44.5)	NS	13 (68)	13 (87)	NS	7 (78)	6 (75)	NS
IF/TA > I	2 (4)	3 (11)	NS				1 (9)	1 (11)	NS	2 (10.5)	1 (7)	NS	1 (11)		
AR – IA e B				1 (5)	1 (5)	NS	1 (9)	1 (11)	NS					1 (12.5)	
AR – III					1 (5)										
Borderline changes				1 (5)	1 (5)	NS	1 (9)	1 (11)	NS	1 (5.5)	1 (7)	NS	1 (11)		
Other changes				2 (10.5)	1 (5)	NS	1 (9)	1 (11)	NS	2 (10.5)			1 (11)	1 (12.5)	NS

SCD: standard criteria donor; ECD: extended criteria donor; Tac: tacrolimus; Eve: everolimus; IF/TA: interstitial fibrosis and tubular atrophy; AR: acute rejection; NS: Not significant.

Table 5. Multiple linear regression of the association among donor variables and gene expression in T0 biopsies

Independent variables	FOXP3		TGF-β1		MCP-1		RANTES		IL-10	
	Coefficients (Beta)	p-value	Coefficients (Beta)	p-value	Coefficients (Beta)	p-value	Coefficients (Beta)	p-value	Coefficients (Beta)	p-value
ECD kidney	4.8	NS	-0.02	NS	42	0.02	22.8	0.006	8.9	NS
Donor age	-0.01	NS	0.23	NS	-0.48	NS	-0.2	NS	0.02	NS
Last donor Creatinine	-1	NS	3.14	0.04	-1.25	NS	-2.7	NS	1.7	NS
CIT (hours)	-0.04	NS	0.4	NS	-1.9	NS	-0.7	NS	0.36	NS
Length of hospitalization	1	0.01	0.009	NS	2.8	0.04	1.18	0.05	0.65	NS

ECD: extended criteria; CIT: cold ischemic time; NS: Not significant.

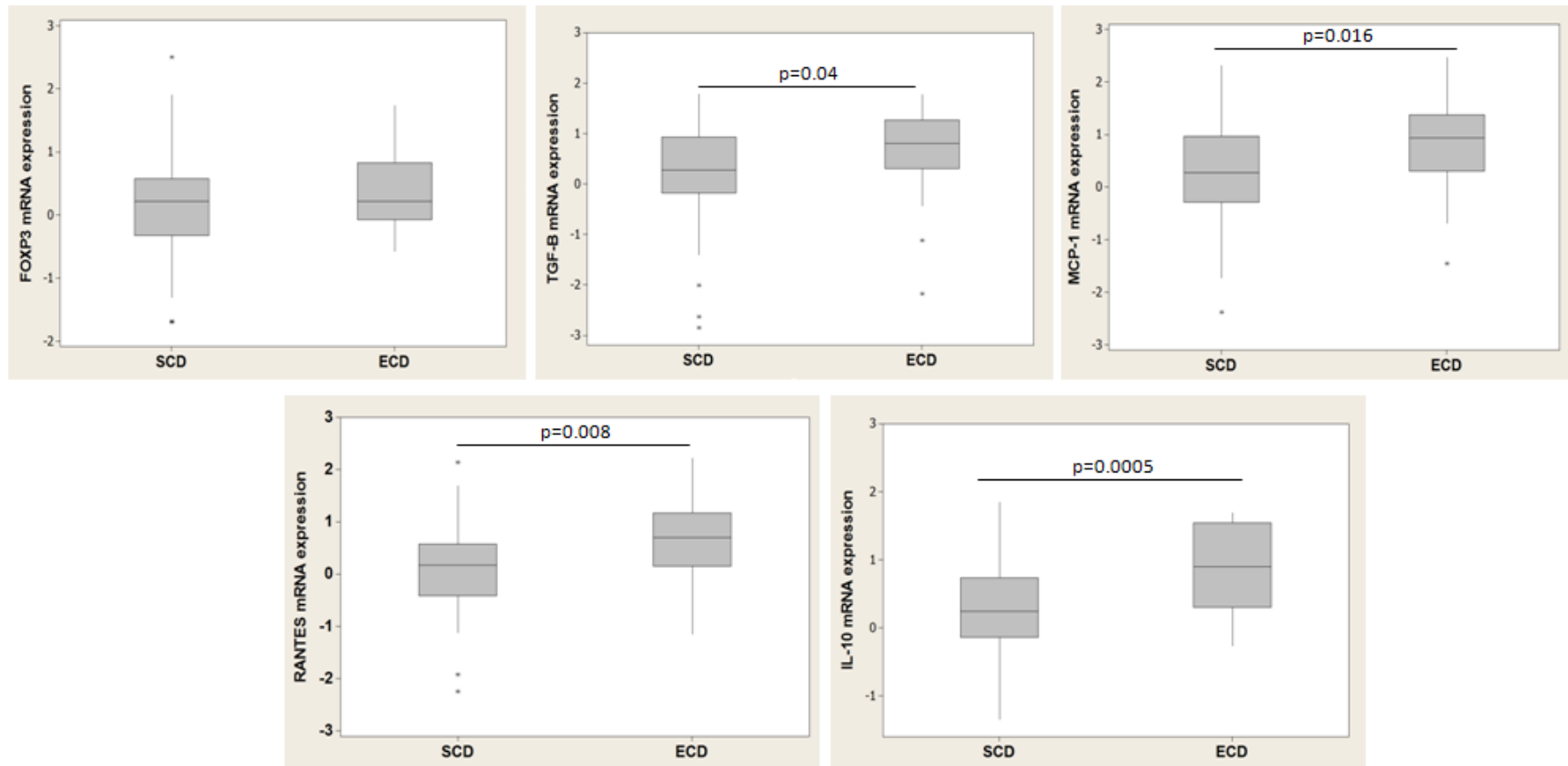


Figure 2. Relative mRNA expression of FOXP3, TGF-B, MCP-1, RANTES and IL-10 genes in pre-implantation biopsies (T0). Box-plots representation of median and quartile values. The whiskers are indicating range and asterisks represent outliers. SCD: standard kidneys; ECD: extended criteria donor.

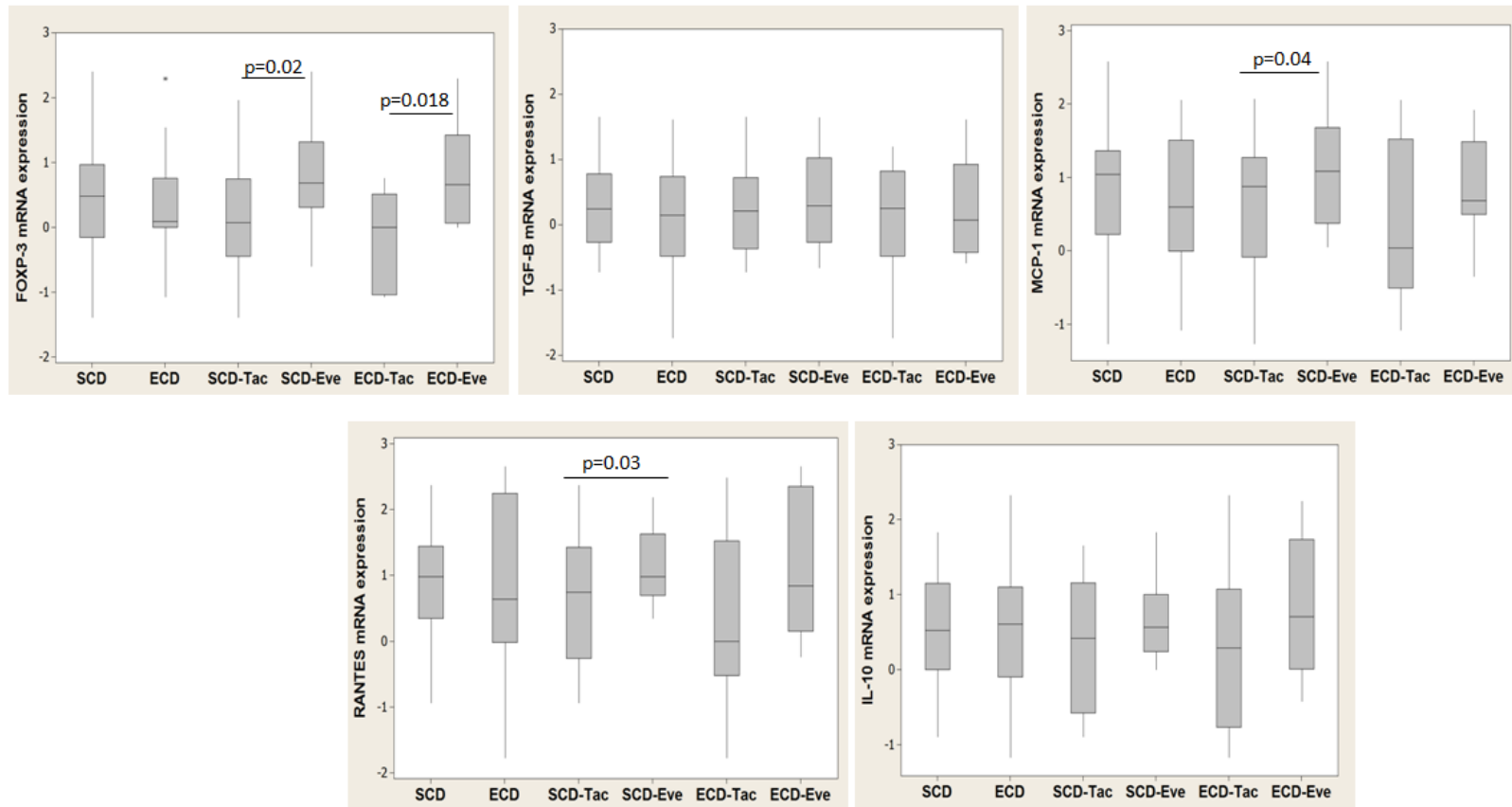


Figure 3. Relative mRNA expression of FOXP3, TGF-B, MCP-1, RANTES and IL-10 genes in biopsies after 15th (T15). Box-plots representation of median and quartile values. The whiskers are indicating range and asterisks represent outliers. SCD: standard kidneys; ECD: extended criteria donor. SCD: standard kidneys; ECD: extended criteria donor; Tac: tacrolimus; Eve: Everolimus.

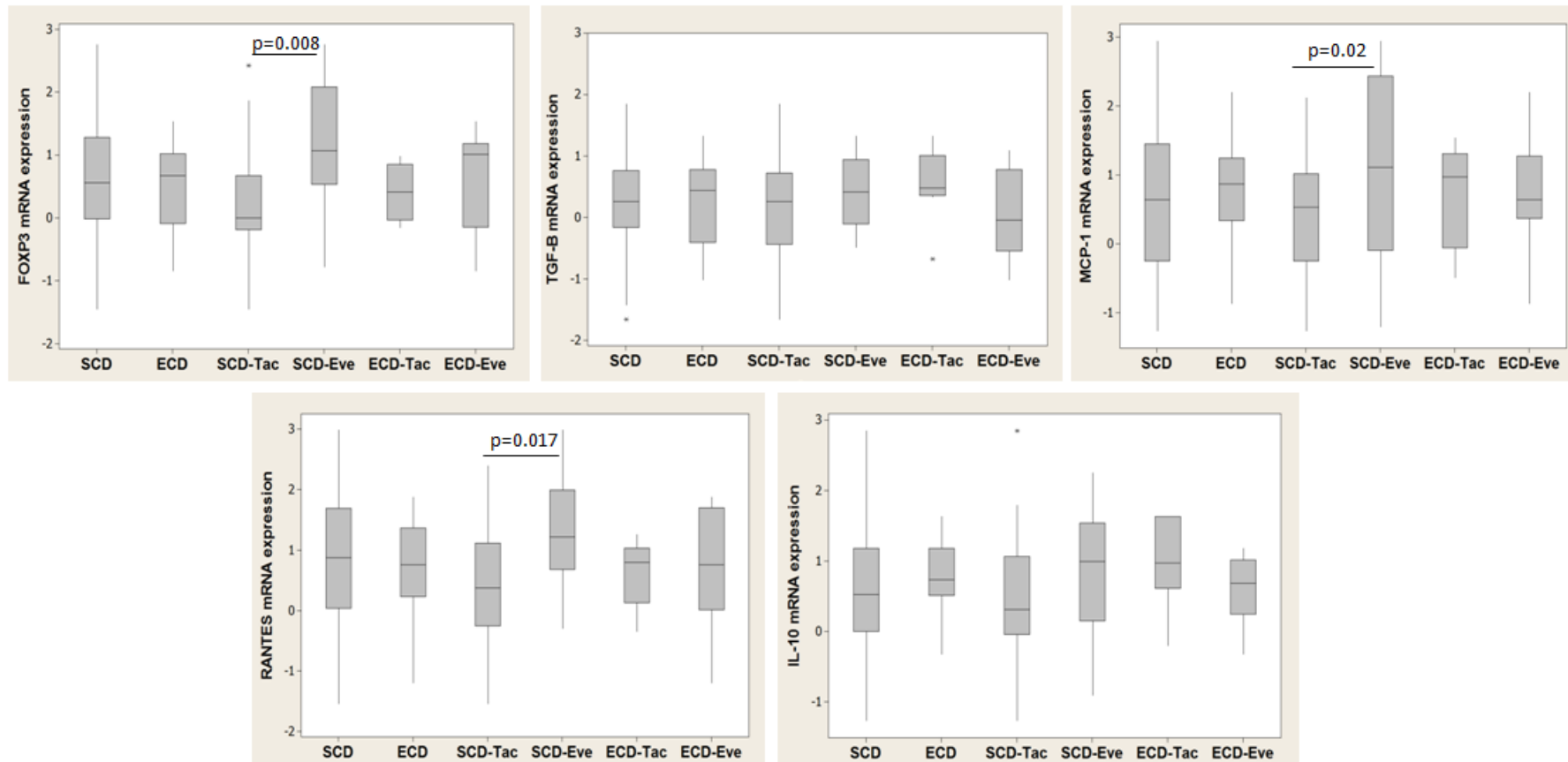


Figure 4. Relative mRNA expression of FOXP3, TGF-B, MCP-1, RANTES and IL-10 genes in biopsies after 90th (T90). Box-plots representation of median and quartile values. The whiskers are indicating range and asterisks represent outliers. SCD: standard kidneys; ECD: extended criteria donor; Tac: tacrolimus; Eve: Everolimus.

Table 6. Logistic regression analysis of risk factors and gene expression in **T15** biopsies.

Covariate	FOXP3			TGF- β 1			MCP-1			RANTES			IL-10		
	OR	95%IC	p-value	OR	95%IC	p-value	OR	95%IC	p-value	OR	95%IC	p-value	OR	95%IC	p-value
ECD kidney	0.60	0.07-4.9	NS	0.53	0.08-3.4	NS	0.86	0.09-8.3	NS	0.7	0.05-9	NS	0.85	0.12-5.6	NS
Donor age	0.7	0.08-5.3	NS	1.8	0.3-11	NS	0.37	0.03-3.5	NS	0.3	0.02-3.8	NS	0.64	0.09-4.1	NS
CIT (hours)	2.5	0.6-10.5	NS	1.6	0.5-5.3	NS	1.6	0.28-9.1	NS	0.85	0.12-5.9	NS	1.75	0.46-6.6	NS
Length of hospitalization (days)	1.5	0.3-7.0	NS	1.63	0.43-6.1	NS	7.2	0.8-64.6	NS	618	0.008-44	NS	1.14	0.27-4.8	NS
DGF	1.7	0.4-7.0	NS	0.53	0.15-1.9	NS	3.3	0.5-20.1	NS	1.6	0.19-14	NS	0.32	0.07-1.4	NS
AR	2.7	0.2-32.8	NS	2.55	0.4-17.2	NS	0.38	0.02-7.3	NS	11.8	1.4-5.3	NS	3.6	0.3-36.3	NS
Eve	11.8	2.5-55.1	0.0017	1.06	0.32-3.5	NS	30.5	2.7-343	0.005	41.6	3.7-465	0.002	3.5	0.9-13.2	NS

ECD: extended criteria; CIT: Cold ischemia time, DGF: delayed graft function; AR: acute rejection; Eve: Everolimus; NS: not significant.

Table 7. Logistic regression analysis of risk factors and gene expression in **T90** biopsies.

Covariate	FOXP3			TGF- β 1			MCP-1			RANTES			IL-10		
	OR	95%IC	p-value	OR	95%IC	p-value	OR	95%IC	p-value	OR	95%IC	p-value	OR	95%IC	p-value
ECD kidney	0.18	0.02-1.7	NS	0.23	0.01-2.8	NS	1.1	0.1-13.5	NS	1.8	0.15-22.2	NS	3.2	0.12-85.3	NS
Donor age	2.5	0.27-23	NS	4.3	0.3-56.1	NS	1.5	0.1-16.9	NS	0.5	0.04-6	NS	1.3	0.07-24	NS
CIT (hours)	1.5	0.36-6.2	NS	1.6	0.4-6.3	NS	0.9	0.2-4.2	NS	1.4	0.2-7.4	NS	0.9	0.15-5.4	NS
Length of hospitalization (days)	0.97	0.1-8.9	NS	0.64	0.07-5.6	NS	1.0	0.1-10.6	NS	0.9	0.06-14.7	NS	1.5	0.07-28.4	NS
DGF	1.7	0.4-6.9	NS	1.04	0.28-3.9	NS	4.9	1.2-19.9	0.02	0.4	0.06-2.3	NS	8	1.5-42.5	0.01
AR	5.6	0.4-81.1	NS	0.79	0.13-4.5	NS	0.9	0.1-7.8	NS	127	0.0008-19,1	NS	65.8	0.0005-7802	NS
Eve	6.6	1.4-31.1	0.01	0.87	0.22-3.4	NS	2.9	0.6-14.2	NS	2.3	0.4-12.5	NS	2.3	0.37-14.4	NS

ECD: extended criteria; CIT: Cold ischemia time, DGF: delayed graft function; AR: acute rejection; Eve: Everolimus; NS: not significant.

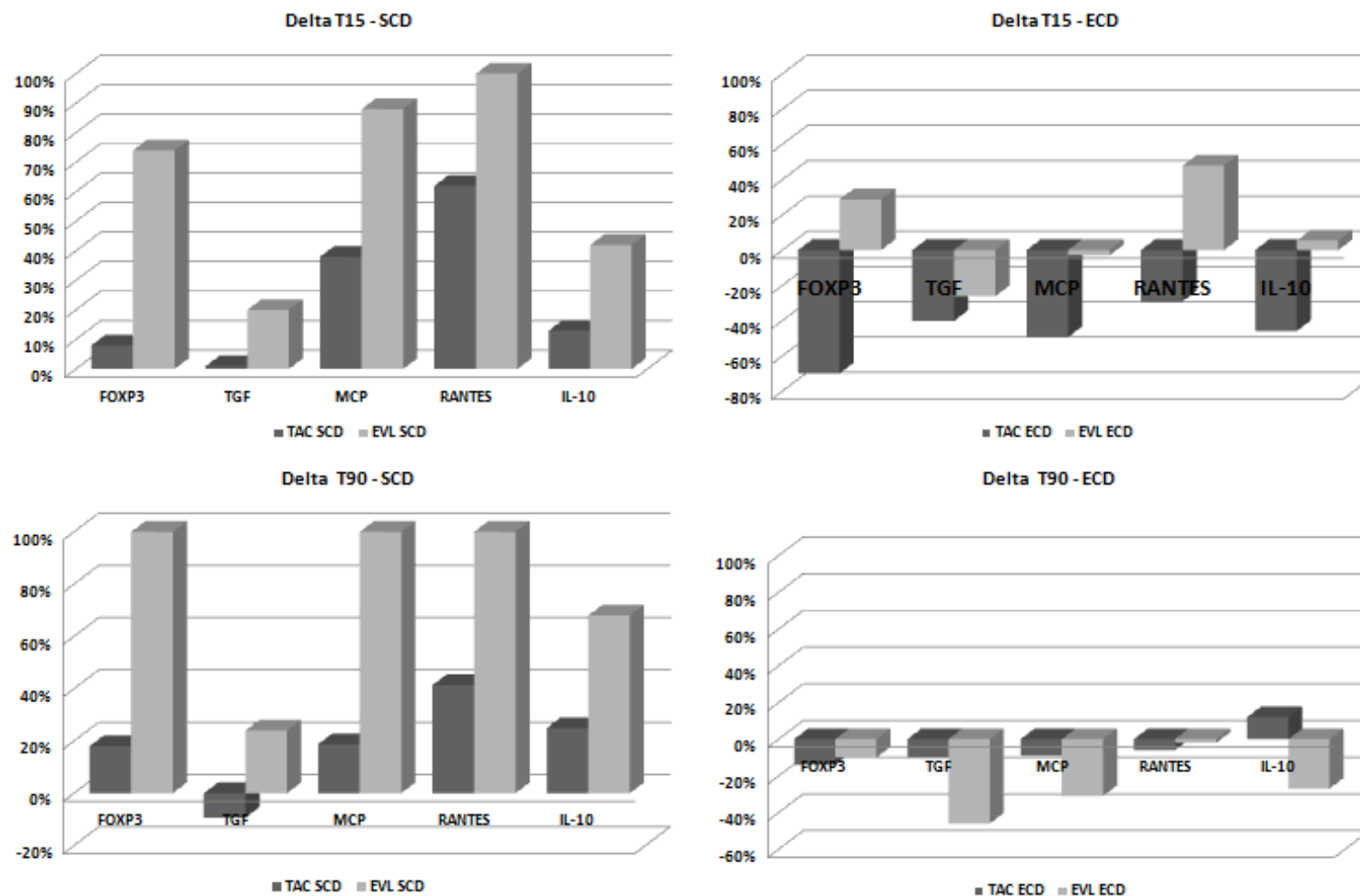


Figure 5. Molecular profiles of SCD and ECD kidneys and immunosuppression when subtracted the T15 and T90 gene expression from the T0 gene expression. Data are presented as percentage of increase.

8. ANEXOS

Anexo I. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

**FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DO IMC**

São José do Rio Preto, 07 de dezembro 2011.

TÍTULO: Efeitos do uso "de novo" de Everolimus na expressão de citocinas em rins de doadores com critérios estendidos e com disfunção tardia do enxerto

Investigador Principal : Mário Abbud Filho.

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Moléstias Cardiovasculares – IMC analisou e aprovou sem restrições em reunião no dia 06 de dezembro de 2011 os seguintes documentos do projeto supracitado:

- ↓ Protocolo em Português;
- ↓ Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE;
- ↓ Termo de Esclarecimento e Aceitação de Transplante com Rim de doador com outros riscos;
- ↓ Termo de Esclarecimento e Aceitação de Transplante com Rim de doador de Critérios Estendidos
- ↓ Cronograma do Estudo;
- ↓ Formulário de Solicitação de Avaliação de Projeto de Pesquisa;
- ↓ Folha de Rosto;
- ↓ Curriculum do Investigador Principal;

OSWALDO TADEU GRECO
COORDENADOR DO CEP



Instituto de moléstias cardiovasculares

Equipamentos Cardiovasculares Rio Preto Ltda. - CNPJ/ME: 45.111.077/0001-77 - CRM: 17.382
Rua Castelo D'Água, 3030 - Fones: (17) 3203-4000 - 3203-4022 - Fax: (17) 3203-4055 - CEP 15015-210 - São José do Rio Preto - SP - e-mail: imc@imccardio.com.br

06-107-4

Anexo II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDONOME DO INVESTIGADOR/ ENDEREÇO DA INSTITUIÇÃO:

Dr. Mário Abbud Filho
Instituto de Urologia e Nefrologia – IUN
End. Rua Voluntários de São Paulo, 3826 – Redentora
CEP: 15015-200
São José do Rio Preto - SP

TÍTULO DO ESTUDO: Efeitos do uso “*de novo*” de Everolimus na expressão de citocinas em rins de doadores com critérios estendidos e com disfunção tardia do enxerto.

1. INTRODUÇÃO

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa clínica e laboratorial. Antes de concordar em participar é importante que você leia e entenda todas as explicações a seguir sobre os procedimentos, os benefícios potenciais e os riscos envolvidos. Por favor, peça para seu médico ou a alguma pessoa da equipe do estudo que explique qualquer palavra ou informação que não seja entendida de maneira bem clara. Não assine este termo de consentimento a não ser que você tenha tido a oportunidade de fazer perguntas e de receber respostas que esclareçam todas as suas dúvidas. Se escolher assinar e participar, caso queira, uma cópia deste documento poderá ser entregue a você.

2. OBJETIVOS DO ESTUDO

O objetivo principal desta pesquisa é o de avaliar o tipo de rim de doador falecido (Tradicional ou Com Critérios Estendidos) que você decidir receber e o efeito de uma medicação chamada de EVEROLIMO (Certican®) na função do rim transplantado. Você receberá o EVEROLIMO (Certican®) ou TACROLIMO, (Prograf®) juntamente Basiliximabe (Simulect®), Micofenolato de Sódio (Myfortic®) e Prednisona. Esses

Qua
Comitê de Ética em Pesquisa IMC
Rua Castelo D'Água, n.º 3030
São José do Rio Preto - SP.



Instituto de Urologia e Nefrologia

remédios já são utilizados para diminuir o risco de rejeição do rim transplantado e não são drogas usadas experimentalmente.

Neste estudo será feita uma **comparação de 2 protocolos de imunossupressão**, com **Everolimo (Certican®)**, Micofenolato de Sódio (Myfortic®) e Prednisona **OU com Tacrolimo (Prograf)**, Micofenolato de Sódio (Myfortic®) e Prednisona, com relação à função e às possíveis mudanças que ocorrem no rim transplantado com um ou outro tipo de protocolo. O critério para receber o Tacrolimo ou o Everolimo será aleatório (semelhante a um cara-ou-coroa) e será feito no dia que você receber o transplante.

3. O QUE ACONTECERÁ COM VOCÊ / PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

O estudo irá durar aproximadamente 24 meses. Depois de sua alta hospitalar, após a sua cirurgia de transplante, será pedido que você compareça em várias visitas ao seu médico, durante o período de 24 meses.

Se concordar em participar, dentro de uma semana antes da data de sua cirurgia de transplante, você precisará realizar um teste de gravidez (somente para mulheres com potencial de gravidez), exame físico, revisão de sinais vitais (pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura) e exames de sangue. Aproximadamente 15 ml de sangue (cerca de 1 colher de sopa) serão colhidos na visita de triagem (Visita 1). Você não deve comer ou tomar líquidos além de água, por no mínimo 12 horas antes da coleta de sangue da Visita 1. Um raio-X de tórax será realizado se você não tiver feito um nos 3 meses anteriores. Você não poderá participar se tiver um histórico positivo para HIV ou tiver Hepatite B ou C ativa. Mulheres que tiverem teste positivo para gravidez também não poderão participar do estudo.

O Simulect (Basiliximabe) será dado na hora do transplante e após 4 dias. As **primeira doses** de Tacrolimo (Prograf - 0,1 a 0,3 mg/kg/dia ou de Everolimo (Certican® - 3mg/d) juntamente com Myfortic® (dose de 1440mg por dia) e Prednisona (30 mg/dia) serão administradas no dia ou até 24 horas após o Transplante. Nos próximos 12 meses as doses serão divididas em até 2 vezes /dia.

As **doses de manutenção** do Tacrolimo será ajustada para manter os níveis no sangue entre 5-10 ng/ml e do Everolimo entre 4 – 8ng/dl. A dose diária do Myfortic deverá ser

Comitê de Ética em Pesquisa IMC
Rua Castelo D'Água, n.º 3030
São José do Rio Preto - SP.



Instituto de Urologia e Nefrologia

mantida no mínimo em 1080mg/d e a da Prednisona deverá ser reduzida para 10 mg/dia até o terceiro mês.

Após o seu transplante renal, até sua alta hospitalar, assim como nos meses 1 a 3, 6, 7, 9, 12, 18 e 24 após a sua cirurgia de transplante, você será submetido a exame físico, revisão dos sinais vitais e exames de sangue. Você será instruído a anotar a quantidade de medicação de estudo que toma por dia. Aproximadamente 25 ml de sangue (duas colheres de sopa) serão coletados em cada uma destas visitas. Você não pode comer ou tomar líquidos além de água, por no mínimo 12 horas antes da coleta de sangue. Para estudar a inflamação que poderá existir no rim transplantado que está recebendo um pequeno fragmento (**biópsia**) será retirado do rim antes do transplante e após, entre os dias 10 e 15, no 3º e no 6º mês.

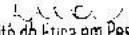
Se seu(s) médico(s) suspeitar(em) de que você tem rejeição você também deverá ser submetido a uma biópsia renal, procedimento comum no pós-operatório de transplantes. A **biópsia renal** consiste em retirar uma amostra do seu rim transplantado através de uma agulha. A área onde se fará a biópsia é localizada através de ultrassom e anestesiada localmente.

Caso você venha a rejeitar o rim transplantado, você receberá o tratamento padrão utilizado para tratar a rejeição do rim e sua medicação de estudo poderá ser interrompida. Um exame físico, avaliação de sinais vitais e exames sanguíneos serão realizados no momento da interrupção da medicação de estudo e no 6º e 12º mês após a data de sua cirurgia de transplante renal.

Uma vez que alguns medicamentos afetam os níveis de Everolimo (Certican®) e do Tacrolimo (Prograf®) no sangue, você deve concordar em não tomar nenhum novo medicamento antes que este medicamento seja aprovado e indicado por seu médico.

4. RISCOS POSSÍVEIS E/OU EFEITOS SECUNDÁRIOS

Alguns medicamentos e até mesmo alimentos podem afetar as concentrações sanguíneas de Certican®, Prograf®) e Myfortic® aumentando os efeitos colaterais. É conhecido


Comitê de Ética em Pesquisa IMC
Rua Castelo D'Água, n.º 3030
São José do Rio Preto - SP.



Instituto de Urologia e Nefrologia

que os imunossupressores (remédios que diminuem o sistema imune) estão associados com um aumento

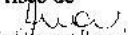
do risco de contrair infecções e câncer. Esse risco é comum para todos os remédios que previnem a rejeição dos órgãos transplantados. Além disso, em pacientes que utilizam Everolimo® pode haver ocorrência de pneumonite grave (inflamação dos pulmões), danos ao fígado e/ou perda de proteína pela urina para os pacientes que estiverem com níveis sanguíneos muito elevados.

Os efeitos secundários mais comuns de Everolimo® observados em alguns pacientes que receberam o medicamento incluem aumento do colesterol e triglicerídeos (gordura no sangue) e desidrogenase láctica (enzima que indica se tem algum dano ao fígado, músculos ou outros órgãos onde ele é produzido), diminuição de plaquetas (células que auxiliam na coagulação do sangue) e leucócitos (células que combatem infecção), febre, mudanças na função do fígado, anemia (diminuição do número de células vermelhas), demora na cicatrização da ferida operatória, acne, dor nas articulações e nos ossos, diarreia, diminuição dos níveis de potássio e fósforo no sangue, edema (acúmulo do excesso de líquido nos tecidos), taquicardia (aumento dos batimentos do coração), pancreatite (inflamação do pâncreas), sangramento pelo nariz, irritação da boca e infecções, afinamento dos ossos, alergia e linfocelose (acúmulo de líquido ao redor do rim).

Os efeitos secundários mais comuns do Tacrolimo (Prograf®) são: tremor, dor de cabeça, diarreia, hipertensão, náusea e disfunção renal, hiperglicemia, hipermagnesemia, hipopotassemia, vômitos.

Os efeitos secundários mais comuns do Myfortic® são: anemia (diminuição do número de células vermelhas), diarreia, mudanças na função do fígado, tosse, dor abdominal, fadiga (cansaço), leucopenia (redução anormal do número de leucócitos no sangue) e trombocitopenia (diminuição do número de plaquetas no sangue).

A Prednisona apresenta como efeitos colaterais mais comuns aumento do apetite e ganho de peso, mudança na aparência ("face de lua"), retenção de água, hipertensão, diminuição da tolerância ao açúcar, afinamento dos ossos aumentando o risco de


Comitê de Ética em Pesquisa IMC
Rua Casarão D'Água, n.º 3030
São José do Rio Preto - SP.



Instituto de Urologia e Nefrologia

fraturas, catarata (alteração na visão), glaucoma (aumento da pressão dentro do olho), petéquias (pequenos hematomas na pele), náuseas e vômitos.

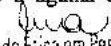
Você será informado de qualquer informação nova e significativa que possa afetar na sua continuação do estudo.

Se forem realizados, os raios-X irão expô-lo a radiação. Para a realização de alguns exames de imagem talvez seja necessário a injeção de um contraste. O contraste pode causar alergia.

Os riscos associados à coleta de sangue são: hemorragia, lesão com hematoma, inchaço ou infecção no local de onde o sangue foi colhido. Todos os cuidados serão tomados para diminuir esses riscos. Você também poderá sentir-se fraco. A quantidade máxima de sangue coletado em cada visita será de aproximadamente 25 ml (2 colheres de sopa). O efeito de Certican[®], Myfortic[®] e Tacrolimo no desenvolvimento do bebê em uma mulher grávida ainda não são conhecidos.

Portanto, a segurança do uso de Everolimo (Certican[®]) durante a gravidez é desconhecida. As mulheres grávidas e as mães que estão amamentando não devem participar neste estudo. Se você for uma mulher com capacidade de engravidar, você será submetida a um teste de gravidez antes de receber qualquer medicação de estudo e deverá praticar métodos que evitam a gravidez indicados por seu médico durante os 12 meses do período de tratamento, e nos três meses seguintes à interrupção da medicação de estudo. Se você apresentar atraso menstrual ou achar que pode estar grávida durante o estudo, você deve informar ao seu médico imediatamente, uma vez que você pode ser retirada do estudo. Se você engravidar a qualquer momento durante o estudo, sua medicação de estudo será interrompida e o(s) médico(s) da pesquisa participará(ão) na avaliação dos riscos envolvidos nesta gravidez.

A biópsia renal, que é o método padrão para diagnosticar uma rejeição aguda e é normalmente realizado quando há suspeita diagnóstica, acarreta um risco de sangramento. Todos os cuidados serão tomados para minimizar este risco. Esse procedimento pode ser dolorido no local onde é feita a injeção da agulha, formar um hematoma ou até haver sangramento no local onde a agulha é inserida no rim e fazer com que esse sangue apareça na urina.


Comitê de Ética em Pesquisa IMC
Rua Castelo D'Água, nº 3030
São José do Rio Preto - SP.

**5. NOVOS ACHADOS SIGNIFICANTES**

Qualquer informação importante, que for obtida no decorrer deste estudo, que possa influenciar a sua vontade de continuar participando neste estudo, lhe será comunicado.

6. BENEFÍCIOS

Você pode beneficiar-se da participação deste estudo clínico. Tais benefícios incluem a possibilidade de que sua condição possa melhorar e que este estudo possa ajudar a desenvolver novas terapias para outros pacientes em estado parecido. Todos os procedimentos e serviços profissionais para esta pesquisa médica são fornecidos a você sem qualquer despesa.

7. PAGAMENTO

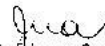
Você não será pago por sua participação neste estudo

8. TRATAMENTOS ALTERNATIVOS

Se você decidir não participar ou abandonar o estudo depois de tê-lo começado, você continuará a ser acompanhado e tratado normalmente no ambulatório pós-transplante.

Por favor, converse com o seu médico a respeito das alternativas. Os medicamentos utilizados no esquema proposto estão entre os mais modernos e embasados em muitos trabalhos científicos. Ambos medicamentos são aprovados no Ministério da Saúde do Brasil para uso em transplantes renais. Todos os tratamentos imunossupressores diminuem a habilidade do organismo em combater infecções e isto pode ser variável em cada paciente. Não é preciso que você participe deste estudo para ser tratado.

**9. PERMISSÃO PARA REVISÃO DOS REGISTROS /
CONFIDENCIALIDADE**


Comitê de Ética em Pesquisa IMC
Rua Castelo D'Água, n.º 3030
São José do Rio Preto - SP.



Instituto de Urologia e Nefrologia

Os seus registros da pesquisa são confidenciais. Assim as informações coletadas serão codificadas somente com as iniciais do seu nome e um número de identificação.

Exceto se exigido por lei, seu nome ou outras informações pessoais de identificação não serão utilizados em nenhum relato ou publicação que resulte deste estudo. As autoridades de saúde e os membros do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) desta Instituição terão permissão de rever e copiar qualquer registro médico pertinente a sua participação no estudo, mas apenas para cumprir suas obrigações em relação a esta pesquisa ou se exigido por lei. Assinando este documento, você concorda com esta revisão.

10. DIREITO A FAZER PERGUNTAS/ESCLARECIMENTOS ADICIONAIS

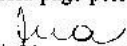
Se você tiver qualquer dúvida sobre o estudo, precisar de quaisquer informações adicionais, ou ainda achar que sofreu algum dano relacionado à pesquisa, por favor, entre em contato a qualquer momento com o seu médico Dr. Mário Abbud Filho nos telefones: 17 - 4009 9191 ou 17- 91540999.

Se você tiver qualquer pergunta em relação aos seus direitos como participante neste estudo, você deve entrar em contato com um representante imparcial no Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição para quem você pode comunicar qualquer queixa e fazer qualquer pergunta.

11. COMPENSAÇÃO POR LESÃO/TRATAMENTO MÉDICO

Todos os cuidados adequados serão tomados para garantir a sua segurança no decorrer deste estudo. Se você sofrer uma lesão durante este estudo, e sua lesão *for* um resultado direto dos efeitos do medicamento de estudo, o centro médico irá proporcionar-lhe cuidado médico adequado sem qualquer despesa.

Se você sofrer uma lesão durante o estudo e a lesão *não for* resultado direto da medicação de estudo, o tratamento médico poderá ser proporcionado em qualquer centro médico de sua escolha. Entretanto, o custo deste tratamento, não será pago pelo centro aonde você vem sendo acompanhado.


Comitê de Ética em Pesquisa IMC
Rua Custódio D'Água, n.º 3030
São José do Rio Preto, SP



12. CUSTOS ADICIONAIS

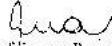
Você não terá custos adicionais como resultado de sua participação nesta pesquisa médica. Todos os exames do estudo e testes laboratoriais de acompanhamento e os exames físicos realizados para esta pesquisa serão gratuitos durante sua participação.

13. PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA E CONDIÇÕES DE ABANDONO

Sua participação nesta pesquisa médica é inteiramente voluntária. Você pode recusar-se a participar nesta pesquisa ou poderá desistir de sua participação em qualquer momento. Sua decisão não resultará na perda dos benefícios ou tratamento médico para o qual estava designado. Não lhe será negado o cuidado pós-transplante que receberia normalmente tenha você abandonado o estudo voluntária ou involuntariamente ou ainda se escolher não participar nesta pesquisa médica.

14. CONTATO EM SITUAÇÕES DE EMERGÊNCIA

Em casos de emergência, favor contactar a qualquer momento com o seu médico Dr. Mário Abbud Filho nos telefones: 17- 4009-9191 ou 17- 9154.0999.


Comitê de Ética em Pesquisa IMC
Rua Castelo D'Água, n.º 3030
São José do Rio Preto - SP.


**CONSENTIMENTO**

Eu, _____, li as informações acima e entendi o objetivo do estudo, assim como os riscos e benefícios esperados com minha participação nesta pesquisa clínica. Eu tive a oportunidade de esclarecer todas as minhas dúvidas, e todas as minhas perguntas foram respondidas. Assinando este termo, eu forneço meu consentimento informado em participar neste estudo e não abro mão de nenhum dos meus direitos como paciente. Eu entendo que há riscos e efeitos secundários com a medicação em estudo. Eu receberei uma cópia datada e assinada deste termo de consentimento antes de iniciar qualquer avaliação ou procedimento de estudo.

Assinatura_____
Data

Eu, abaixo assinado, expliquei todos os detalhes deste estudo para o paciente acima identificado e/ ou para o representante legal autorizado a consentir pelo paciente.

Nome Investigador ou Co-Investigador_____
Assinatura_____
Data


Comitê de Ética em Pesquisa IMC
Rua Castelo D'Aguiar, n.º 3030
São José do Rio Preto - SP.


**Instituto de
Urologia e
Nefrologia**

20

TERMO DE ESCLARECIMENTO E ACEITAÇÃO DE TRANSPLANTE COM RIM DE DOADOR,
COM CRITÉRIOS ESTENDIDOS.

Você deve saber que a oferta de rins e transplantes obtidos de doadores falecidos é muito pequena e por isso a lista de espera para transplantes aumenta a cada ano.

Uma possível maneira de diminuir a fila de espera é utilizar rins obtidos de doadores falecidos chamados de rins com critérios estendidos. Esses rins recebem esse nome porque são retirados de doadores com mais de sessenta anos de idade ou com idade entre cinquenta e cinquenta e nove anos que apresentavam história de hipertensão arterial e/ou "derrame cerebral" (acidente vascular cerebral hemorrágico) e/ou apresentavam creatinina maior que 1.5 mg/dl no momento da retirada do rim.

Esses órgãos tem risco 70% maior de ter um funcionamento lento após o transplante e/ou de funcionar por menos tempo quando comparadas com os rins "ideais".

É sugerido que esses rins sejam doados para receptores com mais de quarenta anos de idade, e/ou receptores que estejam há mais de quatro anos em lista de espera. Entretanto, caso você não preencha esses critérios, você também pode receber um rim com critérios expandidos desde que aceite o órgão e esteja ciente dos riscos que estamos lhe informando neste Termo.

Estamos lhe oferecendo essa possibilidade antecipadamente para que possa pensar, esclarecer as dúvidas com seu médico e decidir com calma juntamente com sua família.

Dessa forma, quando surgir uma oferta de rim com critérios expandido você possa tomar a decisão que julgar mais apropriada.

É importante saber que mesmo se não aceitar um órgão desse tipo, você NÃO será excluído da lista de espera e continuará concorrendo para receber outros rins que forem ofertados pela Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo.


Este termo visa apenas saber se podemos ou não lhe oferecer esse tipo de rim.

Ainda, em qualquer momento que quiser mudar sua decisão, positiva ou negativa, expressa neste Termo, você poderá fazê-lo bastando apenas comunicar seu médico e assinar novo Termo.

Eu _____ li e entendi o termo acima e concordo em receber o órgão proposto.

Nome: _____

Data / / .


 Comitê de Ética em Pesquisa IMC
 Rua Castelo D'Água, n.º 3030
 São José do Rio Preto - SP.



Instituto de Urologia e Nefrologia

19

TERMO DE ESCLARECIMENTO E ACEITAÇÃO DE TRANSPLANTE COM RIM DE DOADOR COM OUTROS RISCOS

Você deve saber que a oferta de rins e transplantes obtidos de doadores falecidos é muito pequena e por isso a lista de espera para transplantes aumenta a cada ano.

Uma possível maneira de diminuir a fila de espera é utilizar rins obtidos de doadores falecidos que são considerados "não ideais" porque podem ser provenientes de doadores com sorologia positiva para o vírus da hepatite B, e/ou terem ficado refrigerado por mais de 33 horas e/ou terem sido retirados quando a creatinina do doador era maior que o valor normal ($> 1,5$ mg/dl), e/ou retirado de doador considerados "de risco" para doenças infecciosas (presidiários, tatuados, usuários de drogas como maconha ou cocaína) ou portadores de doenças como diabetes e hipertensão arterial.

É sugerido que esses rins sejam doados para receptores com mais de quarenta anos de idade, e/ou receptores que estejam há mais de quatro anos em lista de espera. Entretanto, caso você não preencha esses critérios, você também pode receber um rim desse tipo desde que aceite o órgão e esteja ciente dos riscos relacionados com esse tipo de transplante. Estamos lhe oferecendo essa possibilidade antecipadamente para que possa pensar, esclarecer as dúvidas com seu médico e decidir com calma juntamente com sua família.

Dessa forma, quando surgir uma oferta de rim com outros riscos como aqui listados você poderá tomar a decisão que julgar mais apropriada.

É importante saber que mesmo se não aceitar um órgão desse tipo, você NÃO será excluído da lista de espera e continuará concorrendo para receber outros rins que forem ofertados pela Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo.

Este termo visa apenas saber se podemos ou não lhe oferecer esse tipo de rim.

Ainda, em qualquer momento que quiser mudar sua decisão, positiva ou negativa, expressa neste Termo, você poderá fazê-lo bastando apenas comunicar seu médico e assinar novo Termo.

Os casos onde o doador tiver sorologia positiva para hepatite B o rim somente será transplantado se você tiver sido vacinado contra hepatite B e tiver proteção contra a doença (presença de anticorpos) ou se você for um portador do vírus da doença.

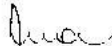
Aceito receber rim de doadores:

1. com sorologia positiva para hepatite B (anti-Hbc+)
2. com tempo de isquemia (espera > 33 h)
3. com creatinina $> 1,5$ mg/dl na retirada do órgão
4. usuários de drogas não injetáveis e/ou "de risco".

Eu _____ li e entendi o termo acima e concordo em receber o órgão proposto.

Nome: _____

Data ____/____/____


Comitê de Ética em Pesquisa IMC
Rua Castelo D'Água, n.º 3030
São José do Rio Preto - SP.