


Expressão do MicroRNA 146a-5p em pacientes transplantados renais com disfunção inicial do enxerto

Micro RNA 146a-5p expression Kidney transplant recipients with delayed graft function

Autores

Patricia Milhoransa¹ 
Carolina Caruccio Montanari¹
Rosângela Montenegro²
Roberto Ceratti Manfro^{1,2}

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Unidade de Transplante Renal, Divisão de Nefrologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

RESUMO

Introdução: O desenvolvimento de novos biomarcadores não invasivos para disfunção do enxerto renal, especialmente no decurso da disfunção inicial do enxerto, seria de enorme valia para a prática clínica do transplante renal. **Métodos:** A técnica de RT-PCR foi utilizada para avaliar a expressão de microRNA 146a-5p no sangue periférico e no tecido renal de receptores de transplante submetidos a biópsia renal de controle no decurso de disfunção inicial do enxerto. **Resultados:** A expressão de miR-146a-5p estava significativamente aumentada nas amostras de biópsia do grupo de pacientes com disfunção inicial do enxerto (DIE) (n = 33) em relação aos pacientes estáveis (n = 13) e aos com rejeição aguda (RA) (n = 9) ($p = 0,008$). Foi detectado aumento não significativo da expressão de miR-146a-5p nas amostras de sangue periférico do grupo com DIE em comparação aos pacientes estáveis e com RA ($p = 0,083$). Não foi identificada correlação significativa entre os níveis de expressão no plasma e na biópsia. A análise da curva COR revelou uma ASC de 0,75 (IC 95%: 0,62-0,88) para a expressão no tecido renal e de 0,67 (IC 95% 0,52-0,81) no sangue periférico. **Conclusão:** A expressão de miR-146a-5p tem um padrão distinto no tecido renal e talvez no sangue periférico em cenários de DIE. Maiores refinamentos e estratégias adicionais de estudo devem ser desenvolvidos na área do diagnóstico molecular não invasivo da disfunção do enxerto renal.

Palavras-chave: Transplante renal; Rejeição de Enxerto; Função Retardada do Enxerto; Sangue; Biópsia; MicroRNAs; Biomarcadores; Técnicas de Diagnóstico Molecular.

ABSTRACT

Introduction: The development of novel non-invasive biomarkers of kidney graft dysfunction, especially in the course of the delayed graft function period would be an important step forward in the clinical practice of kidney transplantation. **Methods:** We evaluated by RT-PCR the expression of miRNA-146 to -5p ribonucleic micro-acids (miRNAs) in the peripheral blood and renal tissue obtained from kidney transplant recipients who underwent a surveillance graft biopsy during the period of delayed graft function. **Results:** In biopsy samples, the expression of miR-146a-5p was significantly increased in the group of patients with delayed graft function (DGF) (n = 33) versus stable patients (STA) (n = 13) and patients with acute rejection (AR) (n = 9) ($p = 0.008$). In peripheral blood samples, a non-significant increase of miR-146a-5p expression was found in the DGF group versus STA and AR groups ($p = 0.083$). No significant correlation was found between levels of expression in biopsy and plasma. ROC curve analysis revealed an AUC of 0.75 (95% CI: 0.62-0.88) for the renal tissue expression and 0.67 (95% CI 0.52-0.81) for the peripheral blood expression. **Conclusion:** We conclude that miR-146a-5p expression has a distinct pattern in the renal tissue and perhaps in the peripheral blood in the setting of DGF. Further refinements and strategies for studies should be developed in the field of non-invasive molecular diagnosis of kidney graft dysfunction.

Keywords: Kidney transplantation; Graft Rejection; Delayed Graft Function; Blood; Biopsy; MicroRNAs; Biomarkers; Molecular Diagnostic Techniques.

Data de submissão: 24/04/2018.
Data de aprovação: 06/08/2018.

Correspondência para:

Patricia Milhoransa.
E-mail: milhoransa@ig.com.br

DOI: 10.1590/2175-8239-JBN-2018-0098



INTRODUÇÃO

O transplante renal é o tratamento de escolha para muitos pacientes com doença renal terminal^{1,2}. O procedimento proporciona um aumento significativo na expectativa e na qualidade de vida dos indivíduos com doença renal terminal³. Contudo, como evidenciado desde o início dos transplantes de órgãos, tecidos e órgãos de indivíduos geneticamente distintos perdem suas funções por meio de um processo de rejeição mediado pelo sistema imunológico. Tal processo é apenas parcialmente controlado pela modificação da resposta imune do receptor com medicamentos imunossupressores e agentes biológicos³⁻⁵.

No último século, os mecanismos da resposta aloimune foram elucidados e medicamentos imunossupressores capazes de prevenir a rejeição foram desenvolvidos, tornando o transplante de órgãos uma realidade clínica^{6,7}.

No transplante renal, a lesão por isquemia-reperfusão é um processo inevitável, que em muitos casos resulta em disfunção inicial do enxerto (DIE), atualmente caracterizada pela necessidade de diálise na primeira semana após o transplante. A lesão por isquemia-reperfusão (LIR) também promove a ativação das respostas inata e adaptativa do sistema imune, levando a processos que podem gerar grandes danos ao enxerto. Acredita-se que essas lesões também facilitem os mecanismos de rejeição aguda (RA) e atuem na programação de alterações gênicas, metabólicas e teciduais que culminam com fibrose tecidual e perda crônica da função do enxerto^{8,9}.

A RA, uma frequente e preocupante complicação do transplante de órgãos, ainda é considerada como fator de risco para perda precoce ou tardia do enxerto¹⁰. Atualmente, os fenótipos clínicos da rejeição estão bem descritos na prática clínica. A rejeição é geralmente evidenciada pela disfunção do órgão, caracterizada por alterações histológicas identificadas na biópsia do enxerto¹¹. Sua evolução é de difícil previsão e os achados histológicos observados no tecido renal colhido ainda são considerados os melhores preditores^{11,12}. A biópsia, por outro lado, está associada a uma variedade de complicações. Trata-se de um procedimento dispendioso que apresenta problemas de representatividade, além de estar sujeito a variabilidade de interpretação. Não obstante, na prática atual a biópsia ainda é vista como o padrão-ouro para o diagnóstico das disfunções do enxerto renal^{12,13}.

A classificação de Banff é utilizada para avaliar os danos encontrados no enxerto. O método é fruto de um consenso internacional padronizado de nomenclaturas e critérios específicos para a caracterização histológica da rejeição de órgãos, nos quais a rejeição mediada por linfócitos T ou anticorpos é diagnosticada com base em regras

empíricas, enquanto as lesões são classificadas de forma semi-quantitativa¹⁴. Resumidamente, os diagnósticos segundo essa classificação podem ser agrupados em rejeição limítrofe, aguda, tubulointerstitial ou de células vasculares de diferentes gravidades, ou como rejeição aguda mediada por anticorpos, caracterizada por achados histológicos, presença de anticorpos anti-HLA no doador e pela marcação por C4d nos capilares peritubulares¹⁴.

Biomarcadores não invasivos precisos são uma necessidade não satisfeita na prática clínica do transplante de órgãos. A maior parte do trabalho com biomarcadores moleculares foi realizada pela análise da expressão de RNA mensageiro^{15,16}. Uma importante recente descoberta da biologia molecular são os microRNAs (miRNAs)^{17,18}, pequenos fragmentos conservados e não codificadores de RNA com aproximadamente 25 nucleotídeos que inibem a transcrição de RNAm induzidos pela depressão translacional ou degradação de RNAm, responsáveis pela regulação da expressão gênica¹⁸⁻²⁰.

Vários microRNAs estão envolvidos no desenvolvimento ou progressão da doença renal crônica ou aguda em pacientes e modelos animais. Foi observada regulação para cima do hsa-miR-146a-5p em pacientes com glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) e glomerulonefrite membranoproliferativa (GNMP) em comparação a pacientes com nefropatia diabética (ND). O miR-146a foi modulado em um modelo experimental de lesão por isquemia-reperfusão renal em camundongos e em pacientes com nefropatia por IgA, exibindo correlação entre seus níveis no tecido renal e na urina e gravidade da lesão. Devemos enfatizar que o miR-146a-5p, que demonstrou elevado valor diagnóstico em pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI), apresenta uma forte e significativa regulação para baixo em cenários de insuficiência renal aguda (IRA) precoce. Assim, o miR-146a-5p pode ser considerado como um instrumento diagnóstico preciso e precoce de IRA em diversos contextos clínicos¹⁸⁻²¹.

Os microRNAs circulantes livres de células estão presentes em vários fluidos corporais, incluindo soro, plasma e urina. Em casos de ND, eles podem sinalizar as reações a vários estresses fisiopatológicos. A urina é uma fonte ideal de biomarcadores de doenças renais. Vários estudos sugerem miRNAs como potenciais biomarcadores para o diagnóstico e monitoramento da nefropatia por IgA (NIgA). Os miRNAs estão presentes na urina em uma forma notavelmente estável, embalados em vesículas extracelulares, predominantemente exossomos. Os exossomos urinários foram isolados com sucesso para a coleta de miRNAs

exossômicos, e o miR-146a pode servir como um novo biomarcador não invasivo para NIgA.

O microRNA 146a-5p atua como mediador da resposta tubular renal à lesão por isquemia-reperfusão, limitando o processo inflamatório nesse cenário²¹. No presente estudo, avaliamos quantitativamente a expressão de miR-146a-5p nos tecidos renais e linfócitos do sangue periférico de receptores de transplante renal com disfunção inicial do enxerto. Segundo nossa hipótese, o miR-146a-5p apresentaria sinalização de transcrição aumentada no sangue periférico e tecido do enxerto renal de receptores com DIE em comparação a pacientes com função estável e indivíduos com RA em dois compartimentos.

MÉTODOS

PACIENTES

De forma a obter o poder estatístico adequado com incidência estimada de RA de 40% em pacientes com disfunção aguda do enxerto e 20% em pacientes sem disfunção aguda do enxerto, foi calculado um tamanho amostral de 55 pacientes submetidos a biópsia de enxerto renal. O tamanho da amostra foi calculado segundo os seguintes parâmetros: a) poder do estudo de 80%; b) $p\alpha = 0,05$; c) $p\beta: 0,20$; d) ordem de grandeza da diferença: 50%.

Sangue periférico também foi colhido para análise de miRNA. Trinta e três pacientes tinham DIE no momento da biópsia de controle, nove apresentavam disfunção aguda do enxerto (com indicação de biópsia) atribuída a RA e 13 foram submetidos a biópsias protocolares normais realizadas três meses após o transplante. O estudo foi realizado na Unidade de Transplante Renal da Divisão de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de maio de 2013 a abril de 2017. Todos os pacientes incluídos no estudo assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

Todos os pacientes estavam em regime imunossupressor com combinações de corticosteroides, micofenolato sódico e inibidores da calcineurina. Terapia de indução com anticorpos anti-receptor da IL2 (Basiliximab®) ou globulina antitímocítica de coelho (Thymoglobulin®) foi prescrita para todos os receptores de enxerto de doadores falecidos e receptores de enxerto de doadores vivos com risco aumentado de rejeição.

Os aspectos éticos e metodológicos do presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

AMOSTRAS

As biópsias foram realizadas por via percutânea e guiadas por ultrassom em tempo real, utilizando uma

pistola de biópsia semiautomática com agulha 16G. No momento da biópsia, todos os pacientes tinham pressão arterial sob controle e parâmetros do painel de coagulação (obtidos não mais do que 24 horas antes) dentro dos limites da normalidade. Antes da biópsia renal, foi realizada propedêutica abrangente para descartar problemas obstrutivos ou vasculares, fístula urinária, infecção ou toxicidade medicamentosa como causas de disfunção do enxerto.

COLETA E PREPARAÇÃO DAS PEÇAS

Dois fragmentos de córtex renal foram colhidos durante cada procedimento de biópsia. Um terço dos fragmentos foi colocado em um microtubo, congelado por imersão em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C . As amostras de sangue periférico (5 mL armazenados em tubos contendo EDTA) foram colhidas imediatamente antes da realização das biópsias.

Para a separação dos grupos de células, os dois tipos de amostra foram lavados e processados de modo a concentrar as células de interesse (sangue). No caso das amostras de sangue, alíquotas de 2 mL foram transferidas para tubos estéreis Falcon de 12 mL, às quais foram adicionados 10 mL de tampão de hemólise (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, EUA), seguido por 21 minutos de incubação em gelo e agitação em vórtex intermitente a cada 7 minutos. Após este passo, as amostras foram centrifugadas a 1800 rpm por 10 minutos, produzindo um pellet que continha as células de interesse no fundo do tubo. O pellet foi preservado e o sobrenadante descartado. O pellet foi então ressuspensão em 1,5 mL de tampão de hemólise, transferido para microtubos e centrifugado novamente por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o concentrado de células resultante congelado a -80°C .

PROCESSAMENTO DO MICRORNA

MicroRNAs foram extraídos das amostras com o auxílio do kit comercial mirVana™ PARIS™ (Ambion®, Life Technologies Corporation). Em resumo, o concentrado/sedimento celular foi dissolvido ou fragmentado em 500 μL de solução tampão em um dispersor (ULTRA-TURRAX T 10 básica - IKA, Campinas, SP) e eluído em 60 μL de água para injeção pré-aquecida a 95°C segundo as instruções do fabricante.

As amostras foram ressuspensas em 500 μL de tampão de lise celular gelado e homogeneizadas com o auxílio de uma pipeta. O lisado foi transferido para microtubos de 2 mL, aos quais foram somados 500 μL de desnaturante pré-aquecido a 37°C . O material foi novamente homogeneizado e incubado em gelo por 5 minutos. Após a

incubação, foi adicionado 1 mL da fase inferior do ácido-fenol-clorofórmio fornecido no kit. O lisado foi agitado vigorosamente por um minuto e depois centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos para separação da fase orgânica. A fase de interesse (fase superior) foi então colhida, medida (volume máximo de 600 µL) e transferida para um novo microtubo, ao qual foi adicionado etanol 100% à temperatura ambiente correspondente a um terço do volume obtido. A solução resultante foi homogeneizada e 700 µL transferidos para o aparato de filtragem fornecido no kit. O aparato foi então centrifugado a 10.000 rpm por 30 segundos. O filtrado resultante continha os miRNAs desejados. Etanol (466 mL) foi somado a esse fluido, que foi então passado por um segundo filtro antes do início do processo de lavagem. Esse processo consistiu na adição de 700 µL de solução de lavagem 1, centrifugação por 15 segundos a 10.000 rpm, adição de 500 µL de solução de lavagem 2/3 e repetição dos dois passos anteriores. Após descartar o material escoado, o aparato foi centrifugado por 1 minuto para remover qualquer reagente residual, a coluna transferida para um novo tubo de coleta e os miRNAs colhidos por eluição com 60 µL de água para injeção aquecida a 95°C. O eluato foi então centrifugado a 10.000 rpm por 50 segundos e armazenado a -80°C até o próximo estágio.

A concentração do miRNA extraído foi quantificada em um espectrofotômetro por varredura de espectro total (220-750nm) com tecnologia de retenção de amostras (Nanodrop 1000, Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE, EUA). A concentração de ácidos nucleicos é expressa em ng/µL com base na densidade óptica a 260 nm e a pureza é calculada com base nas relações A260/280 e A260/230. Uma relação de aproximadamente 2,0 é geralmente aceita como RNA “puro”. As amostras foram consideradas viáveis quando apresentavam concentração de pelo menos 2 ng/µL. Todas as amostras com concentração mais elevada foram diluídas para esta concentração em 50 µL de água livre de nucleases.

AMPLIFICAÇÃO E DETECÇÃO

Os seguintes iniciadores específicos TaqMan (Applied Biosystems®) foram utilizados na reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR): miR146a-5p 4427975/000468; RNU-48 4427975/001006 e Cel-miR-39-5p 4427975/464312. O controle endógeno utilizado para a normalização da amostra foi o controle exógeno sintético Cel-miR-39 de *C. elegans* (Qiagen, número de catálogo MSY0000010), que foi adicionado às amostras antes do estágio de transcrição reversa em volume de 0,5 µL e concentração de 50 pM.

DNA COMPLEMENTAR

O estágio de formação de DNA complementar (cDNA) foi realizado com o kit TaqMan MicroRNA RT (Applied Biosystems®) conforme as instruções do fabricante, utilizando 8 µL de mistura de reação: 0,12 µL de dNTPs 100 mM; 0,8 µL de transcriptase reversa MultiScribe™ (50 U/µL); 1,2 µL de tampão enzimático; 0,144 µL de inibidor de RNase (20 U/µL); 3,40 µL de água livre de nucleases; e 2,4 µL de iniciador específico para o alvo, aos quais foram adicionados 4 µL de miRNA, chegando ao volume total de 12 µL. Para síntese, as amostras foram incubadas a 16°C por 30 minutos, a 42°C por 30 minutos e a 85°C por 5 minutos, e então armazenadas a -20°C até o momento da RT-PCR.

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE VIA TRANSCRIPTASE REVERSA

A RT-qPCR consistiu na amplificação de 2µL de cDNA usando 5,0µL de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®), 0,5 µL de iniciadores específicos e 2,5 µL de água livre de nucleases, resultando numa reação final com volume de 10 µL. As análises da expressão de miRNA foram realizadas utilizando o TaqMan MicroRNA Assay e kits individuais TaqMan MicroRNA Assays (TaqManMicroRNA Assay, Applied Biosystems, Foster City CA, EUA) para miR-146a-5p e com o sistema Step-One de PCR em tempo real com placa óptica de 48 poços (Applied Biosystems, Foster City CA, EUA)²².

Um miRNA endógeno (RNU48) foi analisado, e os dados da biópsia de expressão foram normalizados em relação a RNU48. Os dados foram apresentados em termos da quantidade relativa do miRNA alvo normalizado para endógeno. O controle exógeno utilizado foi o cel-miR-39 de amostras de sangue.

Os controles e normalizadores foram selecionados de acordo com a literatura e com o auxílio dos pareceres científicos da Thermo Fischer Scientific (<https://www.thermofisher.com/br>).

O cycle threshold (Ct) foi calculado automaticamente pelo software. A expressão de miRNAs foi normalizada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak e Schmittgen²².

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis distribuídas assimetricamente foram relatadas como medianas e intervalos interquartis, enquanto as variáveis distribuídas simetricamente foram descritas como média ± desvio padrão. Os testes de Kruskal-Wallis e o teste U de Mann-Whitney foram usados na análise de variância de amostras pareadas e na análise entre grupos. O coeficiente de correlação de Spearman

foi utilizado para analisar a associação entre duas variáveis. Os dados qualitativos foram expressos em valores absolutos e relativos. O teste do qui-quadrado e o teste exato de Fisher foram usados para análises entre grupos. Todos os testes foram bicaudais e um valor de $p < 0,05$ foi definido como estatisticamente significativo. Todas as análises foram realizadas no PASW Statistics 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

RESULTADOS

A classificação diagnóstica resultou da avaliação conjunta dos dados da avaliação clínica, da resposta à terapia específica e dos achados de biópsia, segundo interpretação da classificação de Banff de 2013¹⁴. Cinquenta e cinco pacientes foram divididos em três grupos em função

do diagnóstico definido. Trinta e três pacientes apresentavam DIE, nove tinham RA e treze tinham função estável do enxerto e foram submetidos a biópsia protocolar. Foram realizadas biópsia, coleta de amostra de sangue periférico e análise de expressão de miRNA 146-5p para todos os pacientes. Os dados demográficos constam da Tabela 1. Apenas creatinina sérica ($p = 0,022$) e tempo decorrido do transplante até a biópsia ($p = 0,001$) diferiram significativamente entre os grupos. A creatinina sérica estava significativamente elevada no grupo com DIE e o tempo até a biópsia foi maior no grupo com DIE em relação ao grupo estável. Como esperado, o tempo até a biópsia também foi maior no grupo estável em comparação aos dois outros grupos. As diferenças observadas nos regimes imunossupressores iniciais não alcançaram significância estatística ($p = 0,069$).

TABELA 1 PERFIL DEMOGRÁFICO DOS PACIENTES ESTUDADOS E VARIÁVEIS DO TRANSPLANTE

Variáveis	Estável n = 13	FTE n = 33	RA n = 9	p
Idade (anos; média ± DP)	48.3±12.2	46.8±14.5	42.8±11.6	0.632*
Sexo (masculino/feminino)	9/4	15/18	4/5	0.318**
Etnia (branca/não branca)	11/2	28/5	8/1	0.950**
Idade do doador (anos; média + DP)	45.6±10.4	46±16.9	42.8±17	0.864*
Sexo do doador (masculino/feminino)	4/9	17/16	4/5	0.444**
Disfunção precoce do enxerto (sim/total grupo)	9/4	29/4	7/2	0.434**
Incompatibilidade HLA (A, B, DR; média+DP)	2.53±0.5	2.2±0.8	2.5±0.5	0.252*
Último ARP (%; mediana (IIQ))				
Classe I	1 (0-23.5) ^a	7.0 (0-21.5) ^a	11 (0-24.1) ^a	0.430*
Classe II	2 (0-28.5) ^a	1.5 (0-22) ^a	2.5 (0-24) ^a	0.930*
Imunossupressão inicial (n; %)				0.069**
Sem indução	6 (46.2)	10 (30.3)	4 (44.4)	0.518*
Globulina antitimocítica de coelho	1 (7.7)	16 (50)	4 (44.4)	0.029*
Basiliximab	6 (46.2)	6 (18.8)	1 (11.1)	0.091*
Tempo de isquemia fria (h; média+ DP)	20+5.1	25.2+7.7	21.8+7.4	0.196*
Doença renal subjacente (n; %)				0.509**
Desconhecida	6 (46.2)	7 (22.6)	4 (50)	0.165*
HTN	5 (38.5)	13 (39.4)	4 (44.4)	0.955*
DM	3 (23.1)	8 (24.2)	0 (0)	0.259*
HTN+DM	1 (8.3)	4 (12.5)	0 (0)	0.554*
DRPAD	2 (16.7)	4 (12.5)	1 (12.5)	0.934*
Outra	0 (0)	8 (25.8)	2 (25)	0.147*
Creatinina sérica na biópsia (mg/dL; média ± DP)	2.5±1.9 ^a	5.7±4 ^b	3.8±3.3 ^{ab}	0.022*
Tempo até biópsia (dias; mediana [IIQ])	99 [86-116] ^b	14 [12-26] ^a	58 [14-331] ^{ab}	0.001***

DP: desvio padrão; HLA: antígeno leucocitário humano; HTN: hipertensão; DM: diabetes mellitus; DRPAD: doença renal policística autossômica dominante; * Análise de variância (ANOVA); ** Qui-quadrado de Pearson; *** teste de Kruskal-Wallis; ^{a,b} Letras iguais representam ausência de diferença significativa (5%) pelos testes de Tukey (ANOVA) ou Dunn (Kruskal-Wallis).

A expressão de microRNA 146a-5p no tecido renal foi diferente entre os grupos. Níveis mais elevados foram observados no grupo com DIE (mediana [IIQ], 3,23 [1,46-5,74]) em comparação ao grupo estável (mediana [IIQ], 0,78 [0,57-1,99], $p = 0,019$). As diferenças observadas nas comparações entre os grupos com DIE (mediana [IIQ], 3,23 [1,46-5,74]) e RA (mediana [IIQ], 1,07 [0,43-2,11], $p = 0,106$) e a comparação entre os grupos com RA e os indivíduos estáveis (mediana [IIQ], 0,78 [0,57-1,99]; $p = 1,0$) não apresentaram diferença estatística (Tabela 2 e Figura 1A).

No sangue periférico, a expressão de microRNA 146a-5p foi aumentada no grupo com DIE (mediana [IIQ], 0,96 [0,46-3,88]) em relação ao grupo com RA (mediana [IQR], 0,27 [0,15-1,47]) e ao grupo estável (mediana [IIQ], 0,62 [0,31-0,90]), mas as diferenças não foram estatisticamente significativas ($p = 0,083$) (Tabela 2 e Figura 1B).

Conforme ilustrado na Figura 2, não foi identificada correlação significativa entre o nível de expressão de miR-146a-5p nos diferentes compartimentos, seja na biópsia ou no sangue periférico ($r = 0,084$; $p = 0,541$).

Foi produzida uma curva da característica de operação do receptor (ROC) a partir da análise da biópsia para avaliar os parâmetros diagnósticos da expressão do gene miRNA 146a-5p em relação ao diagnóstico DIE. A área sob a curva (ASC) foi de 0,75 (IC 95%: 0,62-0,88). Utilizando um ponto de corte de 1,64 na curva ROC, ou seja, um aumento de 64% na expressão gênica em relação aos controles, os parâmetros obtidos foram: sensibilidade de 67,0%; especificidade de 64,0%; valor preditivo positivo de 73,3%; e valor preditivo negativo de 56% ($p = 0,002$, teste do qui-quadrado de Pearson) (Figura 3A). A curva ROC feita a partir da análise do sangue periférico foi utilizada para avaliar os parâmetros

Figura 1. (A) Comparação da expressão do nível do miR-146a-5p no tecido renal em categorias de diagnóstico (B) Comparação da expressão dos níveis de miR-146a-5p no sangue periférico em categorias de diagnóstico.

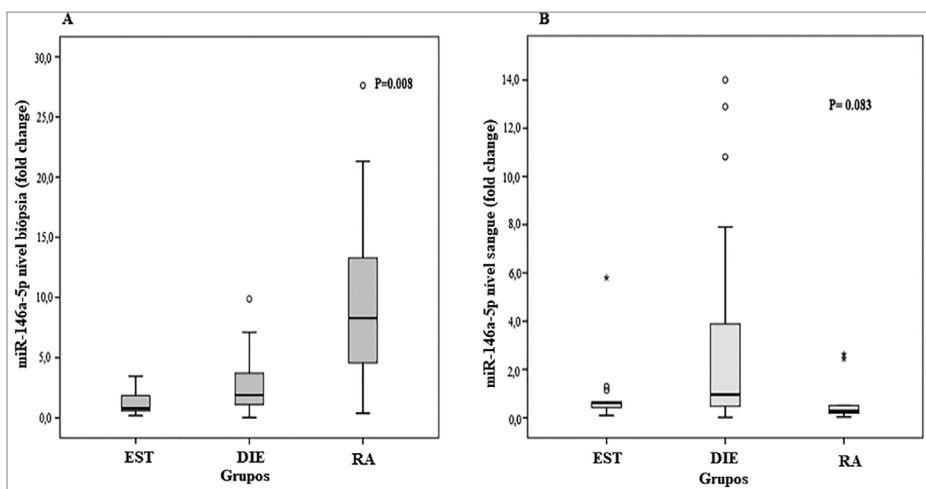
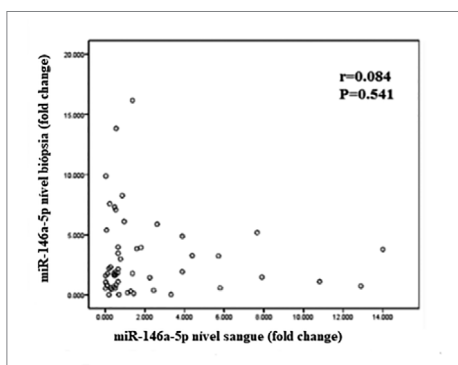


TABELA 2 EXPRESSÃO DE MI R-146A-5P* NO TECIDO RENAL E SANGUE PERIFÉRICO NOS GRUPOS DE PACIENTES

	ESTÁVEL (n = 13)	FTE (n = 33)	RA (n = 9)	p-valor
Biópsia miR-146a-5p	0.78 [0.57 - 1.99]	3.23 [1.46 - 5.74]	1.07 [0.43 - 2.11]	0.008
Sangue periférico miR-146a-5p	0.62 [0.31 - 0.90]	0.96 [0.46 - 3.88]	0.27 [0.15 - 1.47]	0.083

*Mediana [IIQ]; p-valores determinados pelo teste de Kruskal-Wallis/ e teste U de Mann-Whitney.

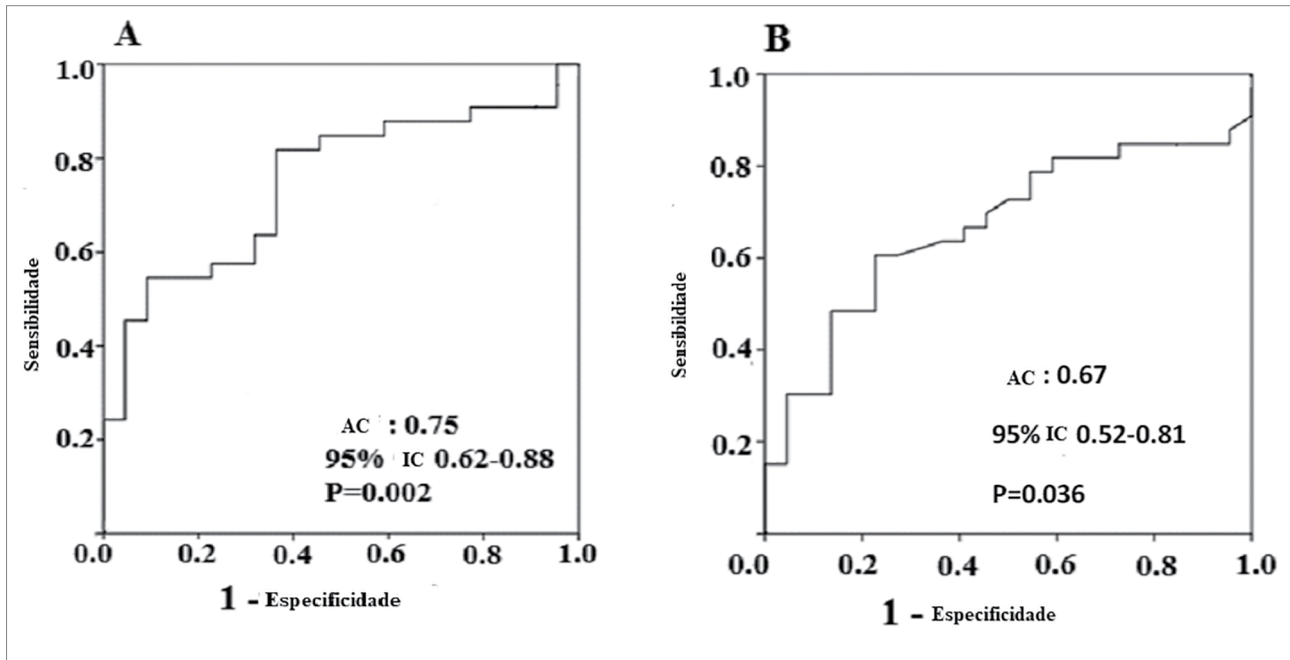
Figura 2. Correlação entre níveis de expressão de miR-146a-5p no tecido renal e no sangue periférico.



diagnósticos da expressão do gene miRNA 146a-5p em relação ao diagnóstico de DIE. A ASC do miR-146a-5p foi 0,67 (IC 95% 0,52-0,81). Utilizando um ponto de corte de 0,63 na curva ROC, ou seja, um aumento de 63% na expressão gênica em relação aos controles, os parâmetros obtidos foram: sensibilidade de 64%; especificidade de 64%; valor preditivo positivo de 72,4%; e valor preditivo negativo de 53,8% ($p = 0,036$, teste do qui-quadrado de Pearson) (Figura 3B).

Os miRNAs têm sido utilizados como biomarcadores de processos fisiopatológicos, como o

Figura 3. (A) Curva ROC de miR-146a-5p níveis de expressão no diagnóstico de disfunção inicial do enxerto em tecido renal; (B) Curva ROC de miR-146a-5p níveis de expressão no diagnóstico de disfunção inicial do enxerto no sangue periférico.



estabelecimento de insuficiência cardíaca e neoplasias. A utilidade dos miRNAs como biomarcadores depende de vários fatores relacionados ao cuidado durante a coleta, processamento e armazenamento das amostras. As condições presentes no processamento e armazenamento dos miRNAs são de extrema importância para preservar a integridade dessas moléculas até o momento de sua análise. Dessa forma, os resultados obtidos não são alterados em função de problemas metodológicos. Embora a necessidade de cuidados no manuseio das amostras seja bem conhecida na literatura, ainda é necessário estabelecer protocolos padronizados para coleta, processamento e armazenamento desse tipo de amostra. Além disso, a estabilidade dos miRNAs durante o armazenamento sob diferentes condições não desfruta de consenso na comunidade científica. A heterogeneidade entre procedimentos pode ser uma importante fonte de discordância e questionamento em relação à utilidade dos miRNAs como biomarcadores de doença.

DISCUSSÃO

A disfunção inicial do enxerto é uma frequente e peculiar manifestação de insuficiência renal aguda (IRA) que ocorre imediatamente após o transplante renal. Sua incidência é de cerca de 25% segundo a United Network for Organ Sharing (UNOS) da América do Norte, mas os números no Brasil são substancialmente

mais elevados⁸. Além disso, o Brasil tem pior prognóstico e possivelmente menor sobrevida do enxerto. Assim como nos sobreviventes de IRA com rins nativos, a DIE introduz risco significativo de desenvolvimento de doença renal crônica (DRC) e aceleração da evolução para doença renal terminal^{8,23-26}.

A lesão por isquemia-reperfusão (LIR) que ocorre após o transplante renal é o principal fator no fenótipo clínico da DIE. Em suas formas mais graves, a LIR pode levar a disfunção primária do enxerto. A LIR também promove a ativação das respostas inatas e adaptativas do sistema imunológico, levando a processos potencialmente prejudiciais para o enxerto renal. Acredita-se que essas lesões também potencializem ou desencadeiem mecanismos de rejeição aguda (RA). Posteriormente, por reprogramação gênica, alterações metabólicas e teciduais podem culminar com fibrose do tecido do enxerto e perda crônica da função^{8,9}.

Biomarcadores precisos e clinicamente úteis para IRA e LIR continuam a ser descobertos. Expressão precoce e precisão são, portanto, parâmetros críticos a serem buscados nos biomarcadores para IRA e LIR²⁷. Muitos estados patológicos com inflamação significativa, como LIR e rejeição aguda, têm sido associados a alterações nos perfis de expressão de miR²⁷. Os microRNAs são importantes reguladores das respostas celulares a muitos estímulos que podem

ser secretados no ambiente extracelular. Portanto, podem ser detectados em fluidos corporais e essa característica, entre outras, contribui para a grande atenção devotada aos microRNAs enquanto biomarcadores de patologia em circunstâncias as mais variadas²⁷. A busca por biomarcadores não-invasivos que ilustrem os eventos intra-enxerto abre importantes possibilidades para o diagnóstico, prognóstico e monitoramento terapêutico na ciência dos transplantes. O presente estudo avaliou o possível papel do miR-146a-5p como biomarcador para LIR na DIE ocorrida após transplante renal^{21,27}.

O precursor pré-miR, miR-146a demonstrou ser modulado em um modelo experimental de LIR renal em camundongos e pacientes com nefropatia por IgA. No estudo em questão, os níveis de miR no tecido renal foram correlacionados com a gravidade da lesão²¹. Este precursor é processado em miR-146a-5p maduro, que apresentou relação com isquemia e LIR renal.

No presente estudo, a expressão de miR-146a-5p no tecido renal foi significativamente aumentada nas biópsias de pacientes com DIE. Nas análises de subgrupos, o grupo com DIE apresentou expressão mais elevada em relação aos pacientes com função estável do enxerto. Foi identificada uma diferença não significativa na comparação entre os grupos com DIE e RA. Níveis muito próximos de expressão foram encontrados na comparação entre os grupos com RA e indivíduos estáveis. Na análise do miR-146a-5p obtido a partir das amostras de sangue periférico, os níveis de expressão também foram mais elevados no grupo com DIE em relação ao grupo de pacientes estáveis, com significância estatística limítrofe. Numericamente, o grupo com DIE apresentou níveis mais elevados de expressão.

Os miRNAs estão envolvidos em uma ampla gama de processos fisiológicos e patológicos, incluindo resposta ao estresse, inflamação, doença cardíaca, doenças neurodegenerativas (ex.: doença de Alzheimer e Parkinson), autofagia, apoptose e vários tipos de câncer. No caso específico do papel dos miRNAs na regulação de células cancerígenas, essas pequenas moléculas de RNA podem atuar tanto como oncogenes (ativando o ciclo celular) ou genes supressores de tumor (inibindo a divisão celular), dependendo da natureza do miRNA e da via metabólica em que estão associados. A associação de características como função biológica, presença em fluidos biológicos e estabilidade, posiciona os miRNAs como biomarcadores

promissores para o diagnóstico e prognóstico de várias patologias.

Amrouche *et al.* descobriram que esta molécula pode atuar como reguladora geral da resposta imune inata, não apenas nas células imunológicas, mas também nas células que são alvo de inflamação no tecido renal humano e na urina. Os autores observaram um aumento na expressão do biomarcador em pacientes com necrose tubular aguda logo após o transplante em comparação aos que apresentaram resultados normais na biópsia de aloenxerto²¹. Experimentalmente, os autores demonstraram que a isquemia renal induziu a expressão tubular de miR-146a em rins de camundongos após LIR unilateral e que, em relação aos rins contralaterais, níveis elevados de expressão ainda eram identificados até 7 dias após a LIR. Os autores também descobriram que o miR-146a foi predominantemente superexpresso em células tubulares. Esses resultados destacam o miR-146a como importante efector da patogênese da resposta renal à lesão do LIR²¹.

Baker *et al.* estudaram as contribuições relativas do microRNA para o estabelecimento da doença renal. Ao comparar as biópsias renais de pacientes com nefropatia diabética, glomeruloesclerose segmentar e focal, nefropatia por IGA, glomerulonefrite membranoproliferativa e as de indivíduos saudáveis, os autores descobriram que o miR-146a-5p distinguiu a nefropatia diabética das outras patologias, concluindo que a molécula pode ser usada como biomarcador de doenças renais e que talvez esteja imbricada nos mecanismos da doença²⁸. Fraile *et al.* analisaram os níveis de expressão de miR-146a-5p no soro de pacientes com IRA e em indivíduos saudáveis. Os autores identificaram superexpressão de miR-146a-5p no soro de pacientes com IRA em relação a controles saudáveis. Além disso, os níveis de expressão no tecido renal e na urina foram correlacionados com gravidade da lesão²⁹⁻³¹.

Dziedic *et al.* investigaram a correlação entre concentração de renalase plasmática e expressão de miR-146a-5p em pacientes em hemodiálise. Pacientes com baixa expressão de miR-146a e níveis elevados de renalase tiveram sobrevida significativamente mais prolongada do que outros pacientes. Os níveis de miRNA-146a e renalase foram identificados como fatores prognósticos independentes do tempo de sobrevida de pacientes em hemodiálise³². O microRNA está envolvido na regulação e controle de processos

inflamatórios, assim como na regulação do sistema imune, atuando em loop regulatório negativo ou em um sistema de feedback que interfere nas respostas inflamatórias^{33,34}. A renalase é secretada por muitos tecidos, incluindo tecido adiposo, cardiomiócitos, músculo esquelético, fígado, sistema nervoso central e endotélio, além de ser produzida nos rins³⁵. Em geral, é concebível que a regulação exercida pelo miRNA sobre os genes da renalase possa ter um papel na fisiopatogenia de doenças cardiovasculares e metabólicas, alterando sua base molecular³⁶.

Os autores investigaram o papel do miR-146a na patogênese do lúpus eritematoso sistêmico e descobriram que esse microRNA, entre outros, atua como regulador negativo da imunidade inata nesses pacientes. Análises posteriores mostraram que a subexpressão de miR-146a apresentou correlação negativa com a atividade clínica da doença e com os escores de interferon (IFN) em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. O microRNA miR-146a é um regulador negativo da via do IFN. A subexpressão de miR-146a contribui para alterações na via do IFN tipo I em pacientes com lúpus ao visar as principais proteínas de sinalização. Os autores sugeriram que seus achados possibilitam a adoção de novas estratégias de intervenção terapêutica³⁷.

Pesquisas anteriores mostram que os miRNAs conseguem sair das células através dos exossomos para serem transportados pelos fluidos corporais até outros compartimentos, onde podem atuar como reguladores locais^{38,39}. Tal propriedade biológica pode, pelo menos em parte, explicar as discrepâncias entre os níveis de expressão no tecido e no sangue periférico observadas no presente estudo. Por outro lado, talvez seja plausível imaginar que os valores mais elevados encontrados no tecido permitam uma detecção melhor e mais confiável do microRNA. Também é possível que a avaliação da urina forneça resultados interessantes em termos de aplicabilidade da expressão dessa molécula como biomarcador não invasivo. Contudo, receptores com DIE são frequentemente anúricos, o que imporia uma limitação relevante para sua aplicação como biomarcador não invasivo no transplante renal.

Dentre as fragilidades do presente estudo, talvez a mais importante seja o número limitado de indivíduos avaliados, o que pode ter contribuído para os resultados negativos nas comparações dos subgrupos, especialmente na análise do sangue periférico.

Embora ainda não haja um painel de miRNA capaz de distinguir entre as várias etiologias da disfunção que pode afetar os aloenxertos renais, identificamos o miR-146a-5p como um potencial biomarcador para diferenciar LIR com fenótipo clínico de DIE de outras manifestações como a rejeição aguda. Sugerimos que a análise combinada de microRNAs pode levar ao diagnóstico não invasivo preciso de lesões do enxerto renal.

Em resumo, estudos posteriores com outros biomarcadores potenciais de LIR e rejeição aguda, talvez envolvendo os microRNAs já pesquisados como miR-146a-5p e miR-142-3 em diferentes amostras não invasivas, poderão contribuir para o desenvolvimento de biomarcadores precisos não invasivos para uso em transplantes clínicos de órgãos⁴⁰.

REFERÊNCIAS

- Harmath CB, Wood CG 3rd, Berggruen SM, Tantisattamo E. Renal Pretransplantation Work-up, Donor, Recipient, Surgical Techniques. *Radiol Clin North Am* 2016;54:217-34.
- Wilflingseder J, Regele H, Perco P, Kainz A, Soleiman A, Mühlbacher F, et al. miRNA profiling discriminates types of rejection and injury in human renal allografts. *Transplantation* 2013;95:835-41.
- Muduma G, Shupo FC, Dam S, Hawken NA, Aballéa S, Odeyemi J, et al. Patient survey to identify reasons for non-adherence and elicitation of quality of life concept associated with immunosuppressant therapy in kidney transplant recipients. *Patient Prefer Adherence* 2016;10:27-36.
- Doi K, Rabb H. Impact of acute kidney injury on distant organ function: recent findings and potential therapeutic targets. *Kidney Int* 2016;89:555-64.
- Saat TC, van den Akker EK, IJzermans JN, Dor FJ, de Bruin RW. Improving the outcome of kidney transplantation by ameliorating renal ischemia reperfusion injury: lost in translation? *J Transl Med* 2016;14:20.
- Denecke C, Tullius SG. Innate and adaptive immune responses subsequent to ischemia-reperfusion injury in the kidney. *Prog Urol* 2014;24:S13-9.
- Menon MC, Keung KL, Murphy B, O'Connell PJ. The Use of Genomics and Pathway Analysis in Our Understanding and Prediction of Clinical Renal Transplant Injury. *Transplantation* 2016;100:1405-14.
- Helfer MS, Vicari AR, Spaldaro F, Gonçalves LF, Manfro RC. Incidence, risk factors, and outcomes of delayed graft function in deceased donor kidney transplantation in a Brazilian center. *Transplant Proc* 2014;46:1727-9.
- Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med* 2010;363:1451-62.
- Bandari J, Fuller TW, Turner Li RM, D'Agostino LA. Renal biopsy for medical renal disease: indications and contraindications. *Can J Urol* 2016;23:8121-6.
- Broecker V, Mengel M. The significance of histological diagnosis in renal allograft biopsies in 2014. *Transpl Int* 2015;28:136-43.
- Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Chang J, Hidalgo LG, Beuscart T, et al. Molecular microscope strategy to improve risk stratification in early antibody-mediated kidney allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2014;25:2267-77.
- Bhatt K, Kato M, Natarajan R. Mini-review: emerging roles of microRNAs in the pathophysiology of renal diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* 2016;310:F109-18.
- Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al.; Banff meeting report writing committee. Banff meeting report writing committee. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant* 2014;14:272-83.

15. Aquino-Dias EC, Joelsons G, da Silva DM, Berdichevski RH, Ribeiro AR, Veronese FJ, et al. Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney Int* 2008;73:877-84.
16. Suthanthiran M, Schwartz JE, Ding R, Abecassis M, Dadhania D, Samstein B, et al.; Clinical Trials in Organ Transplantation 04 (CTOT-04) Study Investigators. Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *N Engl J Med* 2013;369:20-31.
17. Liu J. Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20:214-21.
18. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-97.
19. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 2003;9:277-9.
20. Wei Q, Mi QS, Dong Z. The regulation and function of microRNAs in kidney diseases. *IUBMB Life* 2013;65:602-14.
21. Amrouche L, Desbuissons G, Rabant M, Sauvaget V, Nguyen C, Benon A, et al. MicroRNA-146a in Human and Experimental Ischemic AKI: CXCL8-Dependent Mechanism of Action. *J Am Soc Nephrol* 2017;28:479-93.
22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
23. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest* 2011;121:4210-21.
24. Srisawat N, Kellum JA. Acute kidney injury: definition, epidemiology, and outcome. *Curr Opin Crit Care* 2011;17:548-55.
25. 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.
26. Haase M, Shaw A. Acute kidney injury and cardiopulmonary bypass: special situation or same old problem? *Contrib Nephrol* 2010;165:33-8.
27. Li JY, Yong TY, Michael MZ, Gleadle JM. Review: The role of microRNAs in kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 2010;15:599-608.
28. Baker MA, Davis SJ, Liu P, Pan X, Williams AM, Iczkowski KA, et al. Tissue-Specific MicroRNA Expression Patterns in Four Types of Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2017;28:2985-92.
29. Aguado-Fraile E, Ramos E, Conde E, Rodríguez M, Martín-Gómez L, Lietor A, et al. A Pilot Study Identifying a Set of microRNAs As Precise Diagnostic Biomarkers of Acute Kidney Injury. *PLoS One* 2015;10:e0127175.
30. Wang G, Kwan BC, Lai FM, Chow KM, Li PK, Szeto CC. Elevated levels of miR-146a and miR-155 in kidney biopsy and urine from patients with IgA nephropathy. *Dis Markers* 2011;30:171-9.
31. Godwin JG, Ge X, Stephan K, Jurisch A, Tullius SG, Iacomini J. Identification of a microRNA signature of renal ischemia reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:14339-44.
32. Dziejczak M, Powrózek T, Orłowska E, Koch W, Kukula-Koch W, Gawel K, et al. Relationship between microRNA-146a expression and plasma reninase levels in hemodialyzed patients. *PLoS One* 2017;12:e0179218.
33. Sonkoly E, Stähle M, Pivarcsi A. MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol* 2008;18:131-40.
34. Quinn SR, O'Neill LA. A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling. *Int Immunol* 2011;23:421-5.
35. Zbroch E, Małyszko J, Małyszko J, Koc-Zórawska E, Myśliwiec M. Reninase, kidney function, and markers of endothelial dysfunction in renal transplant recipients. *Pol Arch Med Wewn* 2012;122:40-4.
36. Kalyani A, Sonawane PJ, Khan AA, Subramanian L, Ehret GB, Mulasari AS, et al. Post-Transcriptional Regulation of Reninase Gene by miR-29 and miR-146 MicroRNAs: Implications for Cardiometabolic Disorders. *J Mol Biol* 2015;427:2629-46.
37. Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, et al. MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum* 2009;60:1065-75.
38. Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* 2009;11:1143-9.
39. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2010;31:2765-73.
40. Domenico TD, Joelsons G, Montenegro RM, Manfro RC. Upregulation of microRNA 142-3p in the peripheral blood and urinary cells of kidney transplant recipients with post-transplant graft dysfunction. *Braz J Med Biol Res* 2017;50:e5533.