

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NO GENE
NLRP3 E DESFECHOS PÓS-TRANSPLANTE RENAL: MUDANÇAS DE PESO E
REJEIÇÃO AGUDA**

TESE DE DOUTORADO

MARJORIÊ PIUCO BUFFON

PORTO ALEGRE, JULHO DE 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NO GENE
NLRP3 E DESFECHOS PÓS-TRANSPLANTE RENAL: MUDANÇAS DE PESO E
REJEIÇÃO AGUDA**

MARJORIÊ PIUCO BUFFON

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIS HENRIQUE CANANI

CO-ORIENTADORA: PROFa. DRa. DAISY CRISPIM MOREIRA

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS MÉDICAS: ENDOCRINOLOGIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
DO SUL (UFRGS) COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR
EM ENDOCRINOLOGIA.

PORTO ALEGRE, JULHO DE 2020

DEDICO AO MEU FILHO

*“Eu não poderia te dizer
Que os choros serão constantes
As noites mal dormidas também*

Só posso dizer

Que o belo está por vir

Que tudo vai mudar

E pra melhor

Você vai ser o colo dele

E ele vai ser o seu também

Quando te pedir atenção

Na verdade é você que precisa dele

E não ele de você

No fim vai entender

Que nada foi em vão

Que tudo foi aprendido

E era pra você, pra você

Então descobre

Que você precisa dele

E não ele de você

O meu colo

O teu colo

O nosso colo

Medo de ter

Virou agora o medo de perder

Você é pra sempre

E sempre vai ser

O meu colo

O teu colo

O nosso colo”

Marjorie Elisa

AGRADECIMENTOS

O conhecimento adquirido ao longo da trajetória desde a entrada no Serviço de Endocrinologia antes do mestrado até os dias de hoje, é uma das maiores riquezas que levo. Nada seria possível sem as orientações do Professor Canani e da Professora Daisy Crispim.

Professor Canani, exemplo de profissional e pessoa, confere oportunidade e abre as portas do conhecimento. Exemplo de persistência, dedicação, incentivo, sabedoria, empatia, apoio, crescimento e ensinamento. Expertise inigualável ao analisar resultados desenvolvidos ao longo da tese. Esteve sempre apoiando nos momentos mais difíceis desta trajetória. O orgulho da endocrinologia e da pesquisa científica. Tenho profunda e eterna admiração e gratidão. A sua orientação e seus conhecimentos científicos foram essenciais para os bons resultados desse trabalho.

Professora Daisy, pelo apoio científico, ensinamentos laboratoriais, oportunidade de trabalhar com uma nova experiência - cultura celular durante o doutorado, e principalmente pela dedicação e acompanhamento em todos os trabalhos realizados ao longo de tantos anos. O seu amplo conhecimento e domínio sobre as técnicas teórico-práticas de genética e biologia molecular, além da sua perspicácia como docente da pós-graduação foram imprescindíveis para o desenvolvimento desta tese.

Professor Dr. Manfro, pela oportunidade e apoio, por abrir as portas da Nefrologia, acompanhar todo o processo, somando desta forma a este trabalho e à Endocrinologia. A todos os colaboradores deste trabalho.

Seria um erro não citar e com tantos detalhes o apoio crucial da minha colega Denise Alves Sortica. Surgiu como um anjo na nova vida em Porto Alegre, dividindo casa,

comida e trabalho. De uma forma ou de outra, esteve sempre comigo. Apenas com a presença foi capaz de dizer “siga em frente, falta pouco, você consegue”. Todos os trabalhos executados vieram logo depois do seu plantio.

Um carinho especial por todos os colegas de trabalho que passaram por mim ao longo de todos esses anos. Ao Rodrigo por me ensinar a técnica de Western Blot e a Bianca pelos ensinamentos com células. Aos antigos, Aninha, Jake, Tais, Leticia, Gui, Nati, pelas inúmeras celebrações e convivência diária, e principalmente aos colegas novos que gostaria de ter convivido mais: Mayara, Felipe, Aline, Eloísa, e a todos os demais. Muito obrigada pelo apoio incondicional.

Às todas as colegas do grupo da tiroide. À todas as professoras presentes no serviço de Endocrinologia, especialmente professora Andrea Bauer e Cris Leitão. À secretária da Endocrinologia, Rose. Um agradecimento muito especial à professora Joíza Camargo por me receber com tamanho carinho na primeira busca pelo Mestrado e por ter ajudado a traçar o melhor caminho.

Obrigada às pessoas externas, amizades que deram suporte quando tanto precisei: Brenda, Monique, Pessoa, Maranga, Loli, Alemão, Zeppy, Diogo e Alessandro. Só assim foi possível permanecer em Porto Alegre após o mestrado e ter a oportunidade de fazer o doutorado. Um abraço especial na etapa final a minha mana de coração, Silvia.

Agradecer a minha família, me proporcionou todo o auxílio para fazer uma graduação e poder estar encerrando um doutorado hoje. Meus amados pais, Enio e Madalena, por sempre me incentivarem em todas as decisões, desde que a minha felicidade e independência viesse em primeiro lugar. Ao meu companheiro, Alessandro, sempre junto em cada escolha e desafio que a vida nos colocou. Por me incentivar e apoiar na concretização de vários sonhos. Foi crucial nos momentos mais difíceis e, graças a ele, tive

todo o suporte para me dedicar a esta tese. O agradecimento especial é ao meu filho, Victor, que surgiu em meio ao turbilhão e para uma grande causa: ensinar-me todos os dias sobre o sentido da vida, os sacrifícios e o valor de formar uma família.

Por fim, e nada menos importante quero agradecer a música, por ser a minha válvula de escape, inspiração e estímulo em todas as etapas percorridas até aqui.

Esta tese de doutorado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo apresentada na forma de uma breve introdução geral sobre o assunto e dois manuscritos sobre o tema da tese, seguidos de perspectivas e conclusão.

-Artigo original 1: “The G allele of the *NLRP3* rs10754558 polymorphism is associated with post-kidney transplant weight changes”

-Artigo original 2: “*NLRP3* rs10754558, rs6672995 and rs4353135 polymorphisms are not associated with acute rejection in kidney transplantation”

LISTA DE ABREVIATURAS PARA A INTRODUÇÃO

ASC	apoptosis-associated speck like protein
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
IC	intervalo de confiança
DAMPs	<i>danger-associated molecular patterns</i>
DGF	delayed graft function
ERO	espécies reativas de oxigênio
<i>HLA</i>	<i>human leukocyte antigen</i>
HR	hazard ratio
IMC	índice de massa corpórea
IL	interleucine
KIR	<i>Killer Immunoglobulin-like Receptor</i>
<i>LRR</i>	<i>leucine-rich repeat</i>
<i>NBS</i>	<i>nucleotide-binding site</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor Kappa B subunit 1</i>
NLRP3	<i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3</i>
NLRs	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors</i>
OR	odds ratio
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
pro-IL-18	pro-interleucina-18
pro-IL-1β	pro-interleucina-1 β
PRRs	<i>pattern-recognition</i>
RA	rejeição aguda
<i>RLHs</i>	<i>retinoic acid-inducible gene I-like helicases</i>

TA	tecido adiposo
<i>TGF-β</i>	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TLRs	<i>toll- like receptors</i>

LISTA DE ABREVIATURAS PARA OS ARTIGOS ORIGINAIS

CI	confidence intervals
AR	acute rejection
ASC	apoptosis-associated speck like protein
AT	adipose tissue
BMI	body mass index
CMV	cytomegalovirus
CPPD	calcium pyrophosphate dehydrate
Δ	delta
DAMPs	danger-associated molecular patterns
DGF	delayed graft function
DM	diabetes mellitus
DSA	donor specific antibodies
HCV	hepatitis C virus
HFD	high fat diet
HLA	human leukocyte antigen
HR	Hazard ratio
HWE	Hardy–Weinberg equilibrium
IL	interleukin
IRI	ischemia-reperfusion injury
miRNA	microRNA
NF κ B	<i>Nuclear Factor Kappa B subunit 1</i>
NLRP3	<i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3</i>

NLRs	nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors
non-AR	non-acute rejection individuals
ORs	odds ratios
<i>OR2B11</i>	olfactory receptor gene
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PRA	panel reactive antibody class I/II
pro-IL-18	pro-interleukin-18
pro-IL-1 β	pro-interleukin-1 β
PRRs	pattern-recognition receptors
PTDM	post-transplant diabetes mellitus
RLHs	retinoic acid-inducible gene I-like helicases
ROS	reactive oxygen species
T2DM	type 2 diabetes mellitus
TLRs	toll-like receptors
UTR	untranslated region
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	19
<i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3)</i>	19
<i>GENE NLRP3 E MUDANÇAS DE PESO</i>	23
<i>GENE NLRP3 E REJEIÇÃO AGUDA</i>	25
2 REFERÊNCIAS	30
3 OBJETIVOS	38
4 CAPÍTULO I	39
5 CAPÍTULO II	67
6 PERSPECTIVAS	94
7 CONCLUSÃO	95
8 ANEXOS	97

RESUMO

O NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) é uma das proteínas mais bem caracterizadas do inflamassoma e é de particular interesse nas doenças autoimunes e inflamatórias. O complexo inflamassomal é responsável pela ativação das interleucinas (IL)-1 β e IL-18. Na década de 90, polimorfismos envolvendo os genes responsáveis pela codificação de componentes do inflamassoma NLRP3 foram associados com um background sistêmico inflamatório. Desde então, as pesquisas envolvendo o complexo NLRP3 tem aumentado, assim como o leque de doenças associadas. Entre elas, doença de Crohn, infecção por HIV, diabetes tipo 1 e 2, resistência à insulina, lúpus eritematoso sistêmico, artrite, doença arterial coronariana, preeclampsia, doença celíaca e, recentemente, obesidade e rejeição aguda no transplante renal. O *NLRP3* é altamente expresso em células epiteliais e células do sistema imune, como leucócitos, monócitos, granulócitos, células dendríticas, células B e células T. Estudos experimentais cada vez mais demonstram que a deficiência de NLRP3 previne a disfunção, o dano e a inflamação no rim em diversos modelos de doença renal crônica e aguda.

O papel do inflamassoma na obesidade tem sido estudado extensivamente. O excesso de nutrientes resulta em um ambiente inflamatório, com níveis elevados de citocinas e quimiocinas, as quais estão envolvidas na defesa do hospedeiro e podem perpetuar o estado inflamatório através da indução de respostas imune inata. A expansão do tecido adiposo (TA) é o primeiro evento que levaria a inflamação. Células do sistema imune, incluindo macrófagos, infiltram o TA e ativam o NLRP3. A maioria dos estudos da literatura mostram modificações da expressão do *NLRP3* no TA de pacientes com

obesidade. Entretanto, alguns resultados são controversos. Além disso, apenas um estudo avaliou a associação entre polimorfismos no gene *NLRP3* e alteração de peso na literatura.

Considerando que o ganho de peso é um desafio a ser enfrentado em pacientes transplantados renais e é associado à sobrevida do paciente e do aloenxerto, realizamos um estudo para avaliar se as alterações de peso pós-transplante poderiam estar associadas a variações em polimorfismos no gene *NLRP3*. Não há nenhum estudo avaliando a possível associação de polimorfismos neste gene e mudanças de peso pós-transplante renal até o momento. Sendo assim, em um estudo de coorte, polimorfismos no *NLRP3* [(rs6672995 (G/A), rs4353135 (G/T) e rs10754558 (G/C)] foram genotipados em 449 receptores de transplante renal no Sul do Brasil. O alelo G (CG/GG) do polimorfismo rs10754558 foi significativamente associado com Δ peso (Beta = -1,385, IC 95% -2,763 – -0,007, P = 0,049), ajustado para idade do receptor. Entretanto, os polimorfismos rs6672995 e rs4353135 não foram associados com mudanças de peso pós-transplante.

A rejeição aguda (RA) é um dos principais fatores deletérios do aloenxerto renal e pode levar à sua falha no primeiro ano após o transplante. Apesar de existir diversos estudos sobre o *NLRP3* em doenças imunológicas e inflamatórias, apenas um estudo foi realizado em receptores de transplante renal e mostrou associação entre o polimorfismo rs6672995 no *NLRP3* e a RA. Considerando o potencial papel desse gene como ferramenta de diagnóstico da RA, o objetivo do presente projeto foi verificar a associação entre os polimorfismos rs6672995 (G/A), rs4353135 (G/T) e rs10754558 (G/C) no gene *NLRP3* e RA em receptores de transplante renal. Em um estudo caso-controle aninhado a uma coorte, os polimorfismos de interesse no gene *NLRP3* foram genotipados em 449 receptores de transplante renal do Sul do Brasil, divididos em 98 indivíduos com RA e 351

indivíduos sem RA. Entretanto, os polimorfismos do *NLRP3* não foram associados à RA nessa população.

Em conclusão, nosso estudo investigou, pela primeira vez, a associação entre polimorfismos no *NLRP3* e mudanças de peso pós-transplante. O alelo G do polimorfismo rs10754558 foi significativamente associado com diminuição do Δ peso (CG/GG: 1.69 ± 7.31 kg vs. CC: 3.09 ± 7.92 kg, $P = 0.040$). O alelo G (CG/GG) conferiu uma diminuição de 1,38 kg na variável Δ peso aos seus portadores, controlado para idade. Além disso, demonstramos que os polimorfismos no *NLRP3* (rs6672995, rs4353135 e rs10754558) não parecem estar associados à RA em receptores renais.

ABSTRACT

NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) is one of the best characterized proteins of the inflammasome and is of particular interest in autoimmune and inflammatory diseases. The complex is responsible for the activation of interleukins (IL)-1 β and IL-18. Two decades ago, polymorphisms involving the genes responsible for encoding the components of NLRP3 inflammasome were associated with a systemic inflammatory background. Since these findings, the research regarding NLRP3 complex has increased and also the bunch of related disease. The NLRP3 was associated with several diseases including crohn's disease, HIV infection, type 1 and 2 diabetes, insulin resistance, systematic lupus erythematosus, arthritis, coronary artery disease, preeclampsia, celiac disease, and recently, obesity and acute rejection in kidney transplantation. *NLRP3* is highly expressed in kidney epithelial cells and immune system cells, such as leukocytes, monocytes, granulocytes, dendritic cells, T cells and B cells. Experimental studies increasingly show that NLRP3 deficiency prevents kidney dysfunction, damage and inflammation in various models of acute and chronic kidney disease.

Studies have demonstrated the important role of the NLRP3 inflammasome in obesity. Nutrients excess can result in an inflammatory environment, with elevated levels of cytokines and chemokines, which are involved in host defense and inflammation by inducing innate immune inflammatory responses. Previous studies proposed that massive expansion of adipose tissue (AT) is the first event that causes inflammation. Cells of immune system, including macrophages, infiltrate the AT and activate the NLRP3 inflamassome. The majority of studies show modifications in *NLRP3* expression in TA of patients with obesity. However, results are still controversial. In addition, only one study

evaluated an association between polymorphisms in the *NLRP3* gene and weight change in the literature.

Considering the weight gain has been a challenge in kidney transplant recipients and it was associated to patient's survival rate and poorer graft, we performed a study to evaluate if weight changes post-transplantation could be associated with *NLRP3* polymorphisms. There is no study evaluating the possible association of polymorphisms in this gene and weight changes post-transplantation until the moment. Thus, in a cohort study, the *NLRP3* polymorphisms [(rs6672995 (G/A), rs4353135 (G/T) and rs10754558 (G/C)] were genotyped in 449 kidney transplant recipients from Southern Brazil. The G allele (CG/GG) of the rs10754558 polymorphism was significantly associated with Δ weight (Beta = -1.385, IC 95% -2.763 – -0.007, P = 0.049), adjusting for age of the recipient. However, rs6672995 and rs4353135 polymorphisms were not associated with weight changes.

Acute rejection (AR) is one of the major deleterious factors of kidney graft and may lead to failure in the first year after transplantation. Despite the amount of studies regarding *NLRP3* in immune and inflammatory diseases, only one study was performed in kidney transplant recipients, showing an association between the rs6672995 polymorphism in the *NLRP3* gene and AR. Considering the potential role of this gene as diagnosis tool for AR, the aim of the study was to verify the association between the rs6672995 (G/A), rs4353135 (G/T) and rs10754558 (G/C) polymorphisms in the *NLRP3* gene and AR in kidney transplant recipients. In a nested cohort case-control study, *NLRP3* polymorphisms were genotyped in 449 kidney transplant recipients from Southern Brazil, divided into 98 individuals with AR and 351 individuals without AR. However, none of the *NLRP3* polymorphisms were associated with AR in this population.

In conclusion, our study investigated, for the first time, the association between *NLRP3* polymorphisms and weight changes post-transplantation. The G allele of the rs10754558 polymorphism was significantly associated with decreased Δ weight (CG/GG: 1.69 ± 7.31 kg vs. CC: 3.09 ± 7.92 kg, $P = 0.040$). The G allele (CG/GG) conferred a decrease of 1.38 kg in the Δ weight of their carriers, controlling for age. Moreover, we demonstrated that *NLRP3* polymorphisms (rs6672995, rs4353135 and rs10754558) seem not to be associated with AR in kidney recipients.

1 INTRODUÇÃO

NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3)

NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) é um dos componentes mais bem caracterizado do inflamassoma [1, 2]. O *NLRP3* codifica um domínio *pyrin-like protein containing a pyrin*, um domínio *leucine-rich repeat (LRR)* e um domínio *nucleotide-binding site (NBS)*. A proteína *NLRP3* interage com a proteína *apoptosis-associated speck like protein (ASC)* associada a apoptose celular, que contém um domínio de recrutamento de caspase, formando assim o inflamassoma [3]. O inflamassoma *NLRP3* possui um domínio N-terminal do tipo *PYD*, portanto não consegue ativar diretamente a caspase-1, sendo necessário recrutar a molécula adaptadora *ASC*, via seu domínio *PYD*. *ASC* contém um domínio *CARD* que se liga e recruta pró-caspase-1, via interações *CARD-CARD* [4]. O complexo atua como um ativador *upstream* da sinalização *Nuclear Factor Kappa B subunit 1 (NFκB)*, responsável pela ativação de *IL-18* e *IL-1β*, e desempenha um papel importante na regulação da inflamação, da resposta imune e da apoptose [5, 6].

Células do sistema imune podem desencadear respostas inflamatórias através da detecção de *pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)* ou *danger-associated molecular patterns (DAMPs)*. As *PAMPs* conhecidas incluem diversos ativadores, como microorganismos (*C. albicans*), vírus (*adenovirus*) e lipopolissacarídeos bacterianos. E as *DAMPs* incluem: ATP extracelular, ácido úrico, níveis elevados de glicose, cristais de colesterol, *calcium pyrophosphate dehydrate (CPPD)*, ceramida, palmitato e alguns poluentes (sílica, amianto, radiação ultravioleta) [7]. *PAMPs* ou *DAMPs* se ligam a

receptores de reconhecimento de padrões (*pattern-recognition receptors* - PRRs) [8, 9], tais como, *retinoic acid-inducible gene I-like helicases* (RLHs), *toll-like receptors* (TLRs) e *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors* (NLRs) [10-12]. Dois sinais são necessários para ativar o complexo inflamassomal. As PAMPs e DAMPs primeiramente ativam *Nuclear Factor Kappa B subunit 1* (*NFκB*) no núcleo (sinal 1) e após ocorre a ativação da transcrição de citocinas pró-inflamatórias: pro-interleucina-1 β (pro-IL-1β) e pro-interleucina-18 (pro-IL-18), as quais permanecem no citoplasma na forma inativa. O segundo sinal inclui uma série de outros eventos, como a ruptura lisossomal gerada pelas partículas fagocitadas; efluxo intracelular de íons de potássio (K⁺) e mobilização de íons cálcio (Ca²⁺) gerado pelo dano mitocondrial; e a indução de espécies reativas de oxigênio (ERO) pela mitocôndria e pelos ativadores citados anteriormente [13-16]. Sendo assim, outras DAMPs ativam o inflamassoma no citoplasma (sinal 2), os quais induzem a oligomerização e formação do complexo inflamassomal [17-20]. Após, ocorre a clivagem da procaspase-1 em caspase-1 seguido da conversão das citocinas das formas inativas, pro-IL-1β e pro-IL-18, para as formas ativas, IL-1β e IL-18 (**Figura 1**) [21, 22].

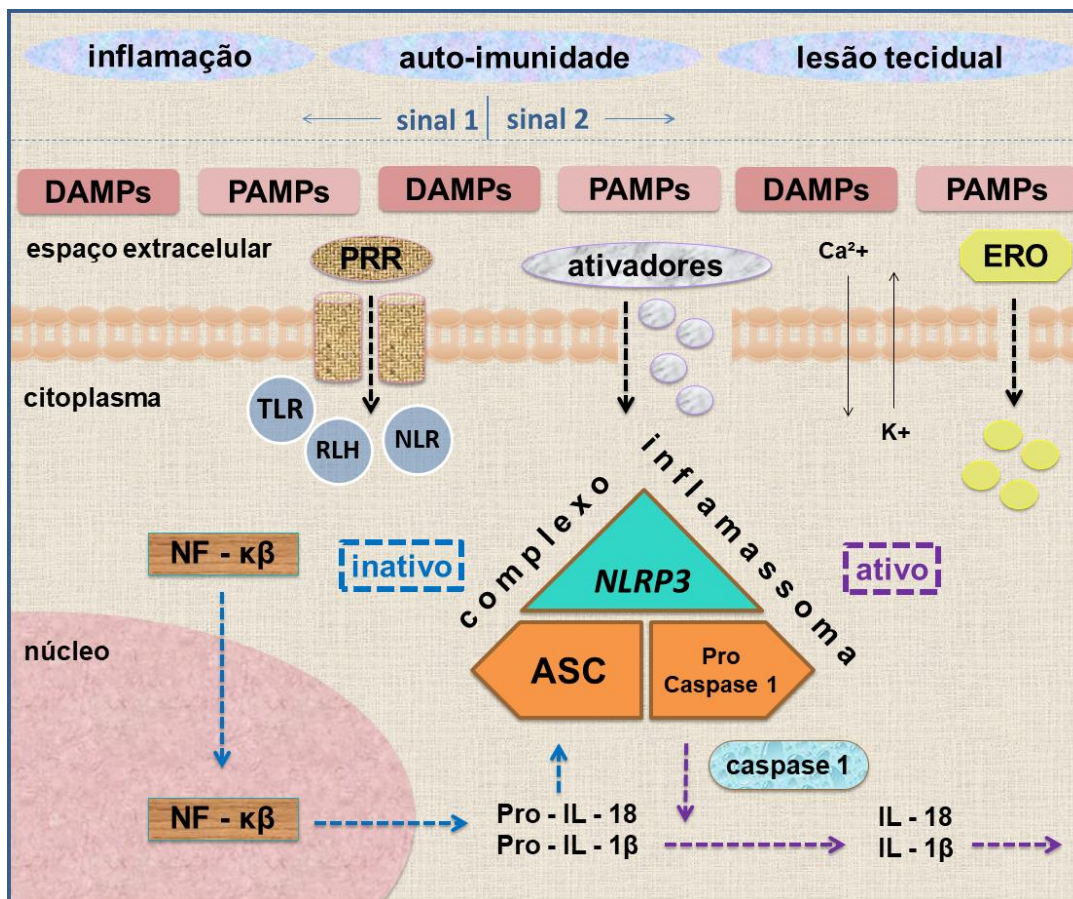


Figura 1. Ilustração da cascata de ativação do complexo inflamassomal

ASC, apoptosis-associated speck like protein; ATP, *adenosine triphosphate*; Ca^{2+} , cálcio; DAMPs, *danger-associated molecular patterns*; ERO, espécies reativas de oxigênio; K^{+} , potássio; NF κ B, *Nuclear Factor Kappa B subunit 1*; NLR, *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor*; PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*; pro-IL-18, pro-interleucina-18; pro-IL-1 β , pro-interleucina-1 β ; PRRs, *pattern-recognition receptors*; RLH, *retinoic acid-inducible gene 1-like helicase*; TLR, *toll-like receptor*.

O gene *NLRP3* está localizado no cromossomo 1q44 e possui 10 exons (Figura 2) [3]. Dentre os principais polimorfismos estudados estão o rs10457558, rs6672995 e o rs4353135. O gene apresenta 13 variantes de transcrição [3].

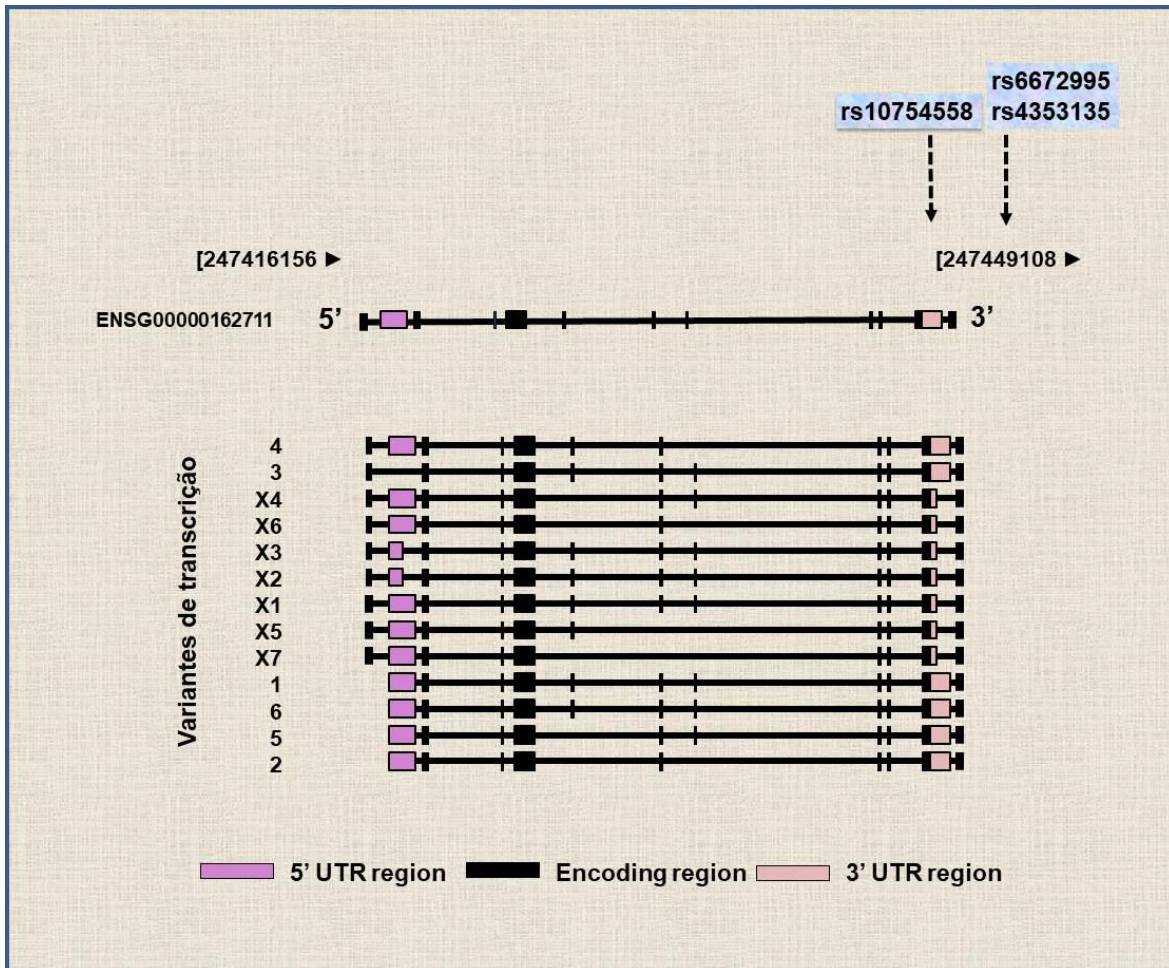


Figura 2. Ilustração do gene *NLRP3* no cromossomo 1q44, os polimorfismos mais estudados e as variantes de transcrição

Os exons (caixas) são mostrados da esquerda para a direita, de acordo com a região de transcrição. As caixas pretas representam as regiões de codificação, a caixa lilás representa o promotor (região 5'UTR) e a caixa rosa representa a região 3'UTR. Setas verticais representam a localização dos polimorfismos incluídos no estudo. Treze variantes de transcrição para o gene *NLRP3* também são mostradas nesta figura. Figura adaptada de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/114548> e <http://www.ensembl.org>.

O *NLRP3* é altamente expresso em células do sistema imune como monócitos, leucócitos, granulócitos, células dendríticas, células T e B e também em células epiteliais renais *in vivo* e *in vitro* [23, 24]. Estudos experimentais demonstram que a deficiência de

NLRP3 previne a inflamação, dano e disfunção renal em vários modelos de doença renal crônica e aguda [5, 25, 26].

Há duas décadas, polimorfismos envolvendo os genes responsáveis pela codificação dos componentes do inflamassoma foram associados com um background inflamatório sistêmico [27, 28]. Desde então, houve um crescimento nas pesquisas, ampliando assim, o leque de doenças relacionadas. Entre os desfechos associados ao *NLRP3* estão: doença de Crohn [29], infecção por HIV [30], diabetes tipo 1 [31] e tipo 2 [32], resistência à insulina [33], lúpus eritematoso sistêmico [34], artrite [35, 36], doença arterial coronariana [37], preeclampsia [38], doença celíaca [39], e recentemente, obesidade [40] e RA no transplante renal [41].

GENE NLRP3 E MUDANÇAS DE PESO

A ativação do inflamassoma *NLRP3* parece ter um papel importante nas doenças inflamatórias, principalmente na indução de uma resposta inflamatória no tecido adiposo e no desenvolvimento de comorbidades associadas à obesidade [42]. Estudos de expressão evidenciaram que a dieta rica em gordura pode estar associada a um aumento na expressão do *NLRP3* em tecido adiposo de um modelo de obesidade em murinos [43, 44]. Outros estudos experimentais demonstraram que camundongos knockout para o gene *Nlrp3*^{-/-} estariam protegidos da obesidade induzida por dieta rica em gordura [6, 45-47]. A maioria dos estudos em humanos evidenciou o aumento da expressão de *NLRP3* no tecido adiposo de indivíduos com obesidade quando comparado a indivíduos sem obesidade [43, 48-51], mas os estudos ainda são controversos [33, 45, 52].

Existe apenas um estudo que avaliou a associação de polimorfismos no gene *NLRP3* e obesidade [40]. Rodrigues *et al.* (2018) demonstraram que o polimorfismo rs10754558 foi significativamente associado com obesidade [OR 0,46, 95% IC (0,25 – 0,84), P = 0,009] e índice de massa corporal (IMC) (P = 0,007) [40]. O menor alelo (G) desse polimorfismo foi mais frequente em indivíduos sem obesidade quando comparados com indivíduos com essa doença (C/G+G/G: 0,68 vs. 0,55; OR = 0,46, modelo de herança dominante), sugerindo um papel protetor dessa variante contra o desenvolvimento da obesidade. O rs10754558 está localizado na região 3'UTR do gene *NLRP3* e o alelo G parece aumentar a estabilidade do mRNA do *NLRP3*, aumentando consequentemente sua expressão [53]. No entanto, Shen *et al.* [54] relataram que o alelo G está localizado na região de ligação para um microRNA (miR-4273). O estudo sugere que o alelo G poderia aumentar a ligação do microRNA ao mRNA do *NLRP3*. Dessa forma, o miR-4273 bloquearia mais o mRNA do *NLRP3* contendo o alelo G e, consequentemente, sua expressão proteica.

O excesso de peso é um grave problema de saúde pública e aumentou mundialmente ao longo dos anos [55]. O excesso de nutrientes pode resultar em um ambiente inflamatório, com níveis elevados de citocinas e quimiocinas, envolvidas na defesa e inflamação, através da indução de respostas inflamatórias desencadeada pela imunidade inata [56, 57]. Estas respostas podem estar relacionadas ao desenvolvimento de desfechos desfavoráveis. Distúrbios metabólicos são comuns em indivíduos pós-transplante renal e podem ser fatores de riscos para a função tardia do enxerto - *delayed graft function* (DGF), perda do aloenxerto, queda da taxa de filtração glomerular, morte por doença cardiovascular e de todas as causas de mortalidade [58-63]. Indivíduos com obesidade são estritamente selecionados para o transplante e o excesso de peso está

relacionado ao desenvolvimento de complicações pós-transplante [55]. Não há estudos na literatura avaliando a associação do gene *NLRP3* e alterações de peso pós-transplante renal. Tendo em vista as evidências sobre o papel do *NLRP3* na obesidade e a concomitante alteração de peso presente em pacientes pós-transplante renal, se torna fundamental o estudo destes fatores.

GENE NLRP3 E REJEIÇÃO AGUDA

A doença renal terminal necessitando de tratamento renal substitutivo infelizmente é uma condição muito prevalente. O transplante é uma das melhores alternativas de tratamento [64]. O transplante renal melhora a qualidade do paciente e a expectativa de vida quando comparado a diálise [65, 66]. No entanto, a taxa de sobrevivência em receptores de transplante renal é ainda significativamente menor do que controles na população geral. Isto ocorre devido a diversos fatores, entre eles, a presença de comorbidades, a duração do tratamento dialítico pré-transplante, além das complicações que podem surgir após o transplante, como infecções, hipertensão, diabetes mellitus, câncer e RA [67, 68]. Apesar da evolução do transplante renal na última década, a RA é a maior causa de perda precoce do aloenxerto [42, 69].

Atualmente, o padrão ouro para o diagnóstico da RA é a biópsia do aloenxerto, um procedimento invasivo com complicações relacionadas [70]. Os critérios de rejeição e de outras alterações associadas à disfunção do enxerto são definidos pela classificação de Banff e tem por objetivo identificar o nível de severidade das agressões ao aloenxerto [71]. Os escores de lesão de Banff avaliam a presença e o grau de alterações histopatológicas nas biópsias de transplante renal: grau de inflamação e lesão; classificação da rejeição em

hiperaguda, aguda ou crônica; classificação em celular intersticial, vasculares, anticorpo-endotelial. Além dos escores, o diagnóstico é determinado por outros parâmetros adicionais da classificação de Banff como moleculares, sorológicos (mecanismos imunológicos envolvidos como uma resposta do sistema imune adaptativo ou inato) e/ou clínicos (resposta ao tratamento como, por exemplo, presença ou ausência de resistência ao tratamento com glicocorticoides) [72].

Além dos fatores imunológicos envolvidos na RA, existem diversos fatores de risco associados à RA conhecidos na literatura, incluindo a idade do paciente, etnia, sensibilização ao antígeno leucocitário humano e DGF [73, 74]. É importante realizar a detecção precoce de uma RA para obtenção de uma resposta terapêutica eficaz com uma imunossupressão menos agressiva, prevenção da ocorrência da perda do aloenxerto, prolongando assim a sobrevida do aloenxerto, e diminuição da morbidade do receptor.

Na década de 90, estudos moleculares em transplantados renais já avaliavam a expressão *in situ* de citocinas e moléculas de adesão em rins [75-77]. Porém ainda eram procedimentos invasivos pela necessidade da biópsia do órgão transplantado. As ferramentas genéticas, como a detecção de polimorfismos de DNA, são procedimentos menos invasivos que o atual procedimento de detecção de RA (biópsia) e poderiam auxiliar a prever o risco desse desfecho e levar a estratégias para melhorar a vida do paciente e das complicações relacionadas ao transplante [78, 79]. A genotipagem de polimorfismos pode compor a seleção de pacientes para o transplante, sendo assim, podendo ser realizada anteriormente ao procedimento. Isso resultaria no manejo de terapias imunossupressoras mais eficazes e resultados mais favoráveis após o transplante. Nos últimos anos, estudos demonstraram a associação entre a RA e polimorfismos em genes de diversas rotas, como por exemplo: *Transforming Growth Factor Beta (TGF- β)* [80];

human leukocyte antigen (HLA) [81]; *ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (E-NPP1)* [82]; *Killer Immunoglobulin-like Receptor (KIR)* [83]; *bone morphogenetic protein (BMP)* [84], e *toll like receptors (TLRs)* [85].

Estudos experimentais demonstram a importância do inflamassoma NLRP3 nas doenças renais. O *NLRP3* é expresso no rim e a sua deficiência previne disfunção, lesão e inflamação nos rins [23, 25]. A RA é determinada por uma série de mecanismos imunológicos complexos e as interações entre as citocinas na regulação da resposta imune poderia afetar o rim enxertado. A ativação do complexo é crucial para a maturação de citocinas e, conseqüentemente, para a imunidade inata. Diversos fatores poderiam estimular a ativação da cascata além dos citados anteriormente na **Figura 1**. Recentemente, foi descoberto que ATP extracelular ativa o NLRP3 e é um dos sinais precoce de dano que pode levar a rejeição [86]. Toda a cascata, desde a ativação do complexo até a secreção de citocinas, resulta em uma série de eventos que possivelmente poderiam acarretar em conseqüentes episódios de RA (**Figura 3**) [86].

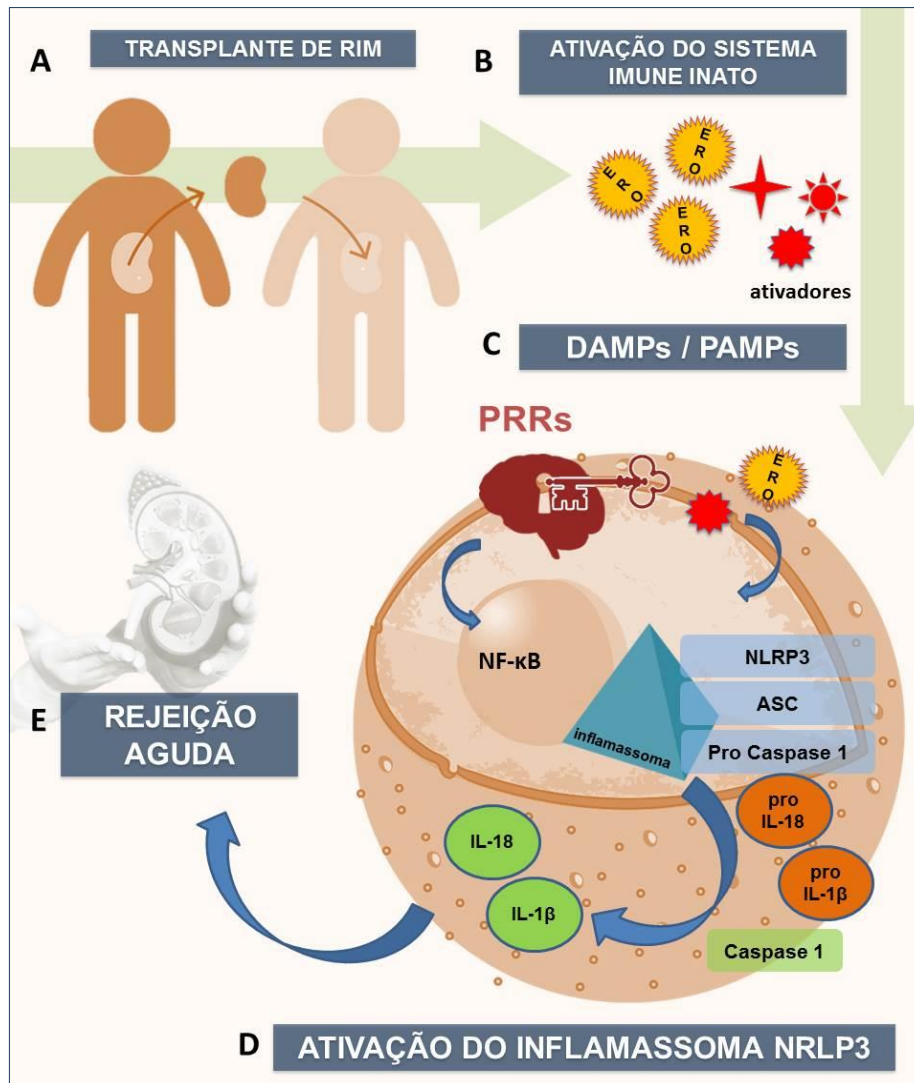


Figura 3. Ativação do complexo inflamassomal NLRP3 na rejeição renal aguda pós-transplante

Durante o transplante renal **A**, as células do sistema imunológico são expostas a *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) ou *danger-associated molecular patterns* (DAMPs). **B**. Na presença de vários eventos, incluindo ruptura lisossômica e os ativadores (um exemplo dos padrões moleculares), ocorre a indução de espécies reativas de oxigênio (ERO). **C**. Os padrões DAMPs e PAMPs se ligam aos *pattern-recognition receptors* (PRRs). Em primeiro lugar, uma forma inativada de NLRP3 é produzida através de NFκB no núcleo, levando à transcrição de NLRP3 inativo, pro-IL-1β e pró-IL-18 e, após a tradução, permanece em suas formas inativas no citoplasma. **D**. durante a ativação do

complexo NLRP3 ocorre a clivagem da procaspase-1 em caspase-1 ativa, seguida pela conversão de citocinas das formas inativas para ativas, IL-1 β e IL-18. E. Uma série de eventos imunológicos e a ativação do inflamasoma NLRP3 poderiam resultar em episódios de rejeição aguda.

Apesar da variedade de estudos relacionados ao *NLRP3* em doenças autoimunes e inflamatórias, os achados são controversos e escassos [87], especialmente na rejeição pós-transplante. Até o momento, um único estudo avaliou polimorfismos neste gene, Dessing *et al.* (2016) [41] demonstraram que o polimorfismo rs6672995 estava associado com um baixo risco para RA em um coorte de 1.269 receptores renais (HR 0,72, 95% IC 0,58-0,91, P = 0,005). Em contrapartida, o polimorfismo rs4353135 não foi associado com RA neste mesmo estudo (HR 1,04, 95% IC 0,96-1,25; P = 0,70). Até o momento, nenhum estudo avaliou a associação do polimorfismo rs10754558 e a RA em transplantados renais na literatura.

Desta forma, devido à escassez de estudos, são necessários estudos que investiguem a possível associação de polimorfismos no gene *NLRP3* com mudanças de peso pós-transplante renal; assim como com a RA em receptores de transplante renal.

2 REFERÊNCIAS

1. Leemans, J.C., S.L. Cassel, and F.S. Sutterwala, *Sensing damage by the NLRP3 inflammasome*. Immunol Rev, 2011. **243**(1): p. 152-62.
2. Ciraci, C., et al., *Control of innate and adaptive immunity by the inflammasome*. Microbes Infect, 2012. **14**(14): p. 1263-70.
3. NCBI, *NLRP3 NLR family pyrin domain containing 3 [Homo sapiens (human)]*. Gene ID: 114548. 2019.
4. Martinon, F. and J. Tschopp, *Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation*. Cell Death Differ, 2007. **14**(1): p. 10-22.
5. Vilaysane, A., et al., *The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(10): p. 1732-44.
6. Rheinheimer, J., et al., *Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: A systematic review*. Metabolism, 2017. **74**: p. 1-9.
7. Ratsimandresy, R.A., A. Dorfleutner, and C. Stehlik, *An Update on PYRIN Domain-Containing Pattern Recognition Receptors: From Immunity to Pathology*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 440.
8. Boutens, L. and R. Stienstra, *Adipose tissue macrophages: going off track during obesity*. Diabetologia, 2016. **59**(5): p. 879-94.
9. Chawla, A., K.D. Nguyen, and Y.P. Goh, *Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 738-49.
10. Pedra, J.H., S.L. Cassel, and F.S. Sutterwala, *Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(1): p. 10-6.
11. Assmann, T.S., et al., *Toll-like receptor 3 (TLR3) and the development of type 1 diabetes mellitus*. Arch Endocrinol Metab, 2015. **59**(1): p. 4-12.
12. Zhong, Y., A. Kinio, and M. Saleh, *Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 333.

13. Hornung, V., et al., *Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization*. Nat Immunol, 2008. **9**(8): p. 847-56.
14. Petrilli, V., et al., *Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration*. Cell Death Differ, 2007. **14**(9): p. 1583-9.
15. Shimada, K., et al., *Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis*. Immunity, 2012. **36**(3): p. 401-14.
16. Lee, G.S., et al., *The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP*. Nature, 2012. **492**(7427): p. 123-7.
17. Barbe, F., T. Douglas, and M. Saleh, *Advances in Nod-like receptors (NLR) biology*. Cytokine Growth Factor Rev, 2014. **25**(6): p. 681-97.
18. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
19. Singhal, G., et al., *Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review*. Front Neurosci, 2014. **8**: p. 315.
20. Lechtenberg, B.C., P.D. Mace, and S.J. Riedl, *Structural mechanisms in NLR inflammasome signaling*. Curr Opin Struct Biol, 2014. **29**: p. 17-25.
21. Agostini, L., et al., *NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder*. Immunity, 2004. **20**(3): p. 319-25.
22. Shao, B.Z., et al., *NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review*. Front Pharmacol, 2015. **6**: p. 262.
23. Iyer, S.S., et al., *Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(48): p. 20388-93.
24. Yang, C.S., D.M. Shin, and E.K. Jo, *The Role of NLR-related Protein 3 Inflammasome in Host Defense and Inflammatory Diseases*. Int Neurorol J, 2012. **16**(1): p. 2-12.

25. Shigeoka, A.A., et al., *An inflammasome-independent role for epithelial-expressed Nlrp3 in renal ischemia-reperfusion injury*. J Immunol, 2010. **185**(10): p. 6277-85.
26. Kim, Y.H., et al., *Association between a TGFBR2 gene polymorphism (rs2228048, Asn389Asn) and acute rejection in Korean kidney transplantation recipients*. Immunol Invest, 2013. **42**(4): p. 285-95.
27. Hoffman, H.M., et al., *Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome*. Nat Genet, 2001. **29**(3): p. 301-5.
28. Dode, C., et al., *New mutations of CIAS1 that are responsible for Muckle-Wells syndrome and familial cold urticaria: a novel mutation underlies both syndromes*. Am J Hum Genet, 2002. **70**(6): p. 1498-506.
29. Villani, A.C., et al., *Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility*. Nat Genet, 2009. **41**(1): p. 71-6.
30. Ravimohan, S., et al., *Common Variation in NLRP3 Is Associated With Early Death and Elevated Inflammasome Biomarkers Among Advanced HIV/TB Co-infected Patients in Botswana*. Open Forum Infect Dis, 2018. **5**(5): p. ofy075.
31. Pontillo, A., et al., *Two SNPs in NLRP3 gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from northeast Brazil*. Autoimmunity, 2010. **43**(8): p. 583-9.
32. Wang, S., et al., *Investigation into the association between NLRP3 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus*. Genet Mol Res, 2015. **14**(4): p. 17447-52.
33. Goossens, G.H., et al., *Expression of NLRP3 inflammasome and T cell population markers in adipose tissue are associated with insulin resistance and impaired glucose metabolism in humans*. Mol Immunol, 2012. **50**(3): p. 142-9.
34. Pontillo, A., et al., *Polimorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus*. Autoimmunity, 2012. **45**(4): p. 271-8.

35. Addobbati, C., et al., *Polymorphisms and expression of inflammasome genes are associated with the development and severity of rheumatoid arthritis in Brazilian patients*. *Inflamm Res*, 2018. **67**(3): p. 255-264.
36. Yang, C.A., S.T. Huang, and B.L. Chiang, *Association of NLRP3 and CARD8 genetic polymorphisms with juvenile idiopathic arthritis in a Taiwanese population*. *Scand J Rheumatol*, 2014. **43**(2): p. 146-52.
37. Zhou, D., et al., *The NLRP3 rs10754558 Polymorphism Is Associated with the Occurrence and Prognosis of Coronary Artery Disease in the Chinese Han Population*. *Biomed Res Int*, 2016. **2016**: p. 3185397.
38. Xu, L., et al., *The NLRP3 rs10754558 polymorphism is a risk factor for preeclampsia in a Chinese Han population*. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2019. **32**(11): p. 1792-1799.
39. Pontillo, A., et al., *A 3'UTR SNP in NLRP3 gene is associated with susceptibility to HIV-1 infection*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2010. **54**(3): p. 236-40.
40. de Moraes Rodrigues, J., et al., *Gain-of-function SNPs in NLRP3 and IL1B genes confer protection against obesity and T2D: undiscovered role of inflammasome genetics in metabolic homeostasis?* *Endocrine*, 2018. **60**(2): p. 368-371.
41. Dessing, M.C., et al., *Donor and recipient genetic variants in NLRP3 associate with early acute rejection following kidney transplantation*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 36315.
42. Parajuli, S., et al., *Histopathological characteristics and causes of kidney graft failure in the current era of immunosuppression*. *World J Transplant*, 2019. **9**(6): p. 123-133.
43. Yin, Z., et al., *Transcriptome analysis of human adipocytes implicates the NOD-like receptor pathway in obesity-induced adipose inflammation*. *Mol Cell Endocrinol*, 2014. **394**(1-2): p. 80-7.
44. Finucane, O.M., et al., *Monounsaturated fatty acid-enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome-mediated IL-1beta secretion and insulin resistance despite obesity*. *Diabetes*, 2015. **64**(6): p. 2116-28.

45. Vandanmagsar, B., et al., *The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance*. Nat Med, 2011. **17**(2): p. 179-88.
46. Stienstra, R., et al., *Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(37): p. 15324-9.
47. Wen, H., et al., *Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling*. Nat Immunol, 2011. **12**(5): p. 408-15.
48. Bando, S., et al., *Expression of NLRP3 in subcutaneous adipose tissue is associated with coronary atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2015. **242**(2): p. 407-14.
49. Esser, N., et al., *Obesity phenotype is related to NLRP3 inflammasome activity and immunological profile of visceral adipose tissue*. Diabetologia, 2013. **56**(11): p. 2487-97.
50. Kursawe, R., et al., *A Role of the Inflammasome in the Low Storage Capacity of the Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue in Obese Adolescents*. Diabetes, 2016. **65**(3): p. 610-8.
51. Serena, C., et al., *Obesity and Type 2 Diabetes Alters the Immune Properties of Human Adipose Derived Stem Cells*. Stem Cells, 2016. **34**(10): p. 2559-2573.
52. Moschen, A.R., et al., *Adipose and liver expression of interleukin (IL)-1 family members in morbid obesity and effects of weight loss*. Mol Med, 2011. **17**(7-8): p. 840-5.
53. Hitomi, Y., et al., *Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(4): p. 779-85 e6.
54. Shen, C., et al., *Genetic association between the NLRP3 gene and acne vulgaris in a Chinese population*. Clin Exp Dermatol, 2019. **44**(2): p. 184-189.
55. organization, W.h., *Body mass index classification*. 2019.
56. de Heredia, F.P., S. Gomez-Martinez, and A. Marcos, *Obesity, inflammation and the immune system*. Proc Nutr Soc, 2012. **71**(2): p. 332-8.

57. Lamkanfi, M. and V.M. Dixit, *Inflammasomes and their roles in health and disease*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2012. **28**: p. 137-61.
58. Hamidian Jahromi, A., G.A. Jalali, and J. Roozbeh, *Impact of obesity on development of chronic renal allograft dysfunction*. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2009. **20**(3): p. 375-7.
59. Weissenbacher, A., et al., *Recipient and donor body mass index as important risk factors for delayed kidney graft function*. Transplantation, 2012. **93**(5): p. 524-9.
60. Torres, M.R., et al., *Weight gain post-renal transplantation and its association with glomerular filtration rate*. Transplant Proc, 2007. **39**(2): p. 443-5.
61. Gore, J.L., et al., *Obesity and outcome following renal transplantation*. Am J Transplant, 2006. **6**(2): p. 357-63.
62. Young, J.B., H.H. Neumayer, and R.D. Gordon, *Pretransplant cardiovascular evaluation and posttransplant cardiovascular risk*. Kidney Int Suppl, 2010(118): p. S1-7.
63. Bellinghieri, G., et al., *Metabolic syndrome after kidney transplantation*. J Ren Nutr, 2009. **19**(1): p. 105-10.
64. Kidney Disease: Improving Global Outcomes Hepatitis, C.W.G., *KDIGO 2018 Clinical Practice Guideline for the Prevention, Diagnosis, Evaluation, and Treatment of Hepatitis C in Chronic Kidney Disease*. Kidney Int Suppl (2011), 2018. **8**(3): p. 91-165.
65. Tonelli, M., et al., *Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes*. Am J Transplant, 2011. **11**(10): p. 2093-109.
66. Wolfe, R.A., et al., *Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant*. N Engl J Med, 1999. **341**(23): p. 1725-30.
67. Hariharan, S., et al., *Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996*. N Engl J Med, 2000. **342**(9): p. 605-12.

68. Meier-Kriesche, H.U., et al., *Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era*. Am J Transplant, 2004. **4**(3): p. 378-83.
69. Joosten, S.A., et al., *Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations*. Kidney Int, 2005. **68**(1): p. 1-13.
70. Townamchai, N. and S. Eiam-Ong, *Biomarkers in kidney transplantation: From bench to bedside*. World J Nephrol, 2015. **4**(5): p. 487-91.
71. Loupy, A., et al., *The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology*. Am J Transplant, 2017. **17**(1): p. 28-41.
72. Roufosse, C., et al., *A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology*. Transplantation, 2018. **102**(11): p. 1795-1814.
73. Pallardo Mateu, L.M., et al., *Acute rejection and late renal transplant failure: risk factors and prognosis*. Nephrol Dial Transplant, 2004. **19 Suppl 3**: p. iii38-42.
74. Goldfarb-Rumyantzev, A.S. and N. Naiman, *Genetic predictors of acute renal transplant rejection*. Nephrol Dial Transplant, 2010. **25**(4): p. 1039-47.
75. Brockmeyer, C., et al., *Distribution of cell adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1) in renal tissue during allograft rejection*. Transplantation, 1993. **55**(3): p. 610-5.
76. Sharma, V.K., et al., *Intragraft TGF-beta 1 mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy*. Kidney Int, 1996. **49**(5): p. 1297-303.
77. Dallman, M.J., C.P. Larsen, and P.J. Morris, *Cytokine gene transcription in vascularised organ grafts: analysis using semiquantitative polymerase chain reaction*. J Exp Med, 1991. **174**(2): p. 493-6.
78. Hartono, C., T. Muthukumar, and M. Suthanthiran, *Noninvasive diagnosis of acute rejection of renal allografts*. Curr Opin Organ Transplant, 2010. **15**(1): p. 35-41.

79. Perkins, D., M. Verma, and K.J. Park, *Advances of genomic science and systems biology in renal transplantation: a review*. Semin Immunopathol, 2011. **33**(2): p. 211-8.
80. Zheng, M., et al., *A Single-Nucleotide Polymorphism (rs1131243) of the Transforming Growth Factor Beta Signaling Pathway Contributes to Risk of Acute Rejection in Chinese Renal Transplant Recipients*. Med Sci Monit, 2019. **25**: p. 9138-9158.
81. Rohn, H., et al., *HLA-G 3' untranslated region gene variants are promising prognostic factors for BK polyomavirus replication and acute rejection after living-donor kidney transplant*. Hum Immunol, 2019.
82. Sortica, D.A., et al., *K121Q polymorphism in the Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1 gene is associated with acute kidney rejection*. PLoS One, 2019. **14**(7): p. e0219062.
83. Jafari, D., et al., *Investigation of Killer Immunoglobulin-like Receptor (KIR) and HLA Genotypes to Predict the Occurrence of Acute Allograft Rejection after Kidney Transplantation*. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2017. **16**(3): p. 245-255.
84. Park, M.S., et al., *Association Studies of Bone Morphogenetic Protein 2 Gene Polymorphisms With Acute Rejection in Kidney Transplantation Recipients*. Transplant Proc, 2017. **49**(5): p. 1012-1017.
85. Abdolvahabi, R., et al., *Association Between TLR2, TLR4, and CD14 Gene Polymorphisms and Acute Rejection in Kidney Transplant*. Exp Clin Transplant, 2018. **16**(1): p. 31-37.
86. Amores-Iniesta, J., et al., *Extracellular ATP Activates the NLRP3 Inflammasome and Is an Early Danger Signal of Skin Allograft Rejection*. Cell Rep, 2017. **21**(12): p. 3414-3426.
87. Lee, Y.H. and S.C. Bae, *Association between functional NLRP3 polymorphisms and susceptibility to autoimmune and inflammatory diseases: a meta-analysis*. Lupus, 2016. **25**(14): p. 1558-1566.

3 OBJETIVOS

Avaliar a associação dos polimorfismos rs6672995 (G/A), rs4353135 (G/T) e rs10754558 (G/C) no gene *NLRP3* e mudança de peso após o transplante renal, assim como a rejeição renal aguda.

OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar a associação entre os polimorfismos rs6672995 (G/A), rs4353135 (G/T) e rs10754558 (G/C) no gene *NLRP3* e mudanças de peso pós-transplante renal;

- Avaliar a associação entre os polimorfismos rs6672995 (G/A), rs4353135 (G/T) e rs10754558 (G/C) no gene *NLRP3* e rejeição aguda em receptores de transplante renal.

Artigo original 1

“The G allele of the *NLRP3* rs10754558 polymorphism is associated with post-kidney
transplant weight changes”

Artigo original 2

“*NLRP3* rs10754558, rs6672995 and rs4353135 polymorphisms are not associated with acute rejection in kidney transplantation”

É um estudo caso-controle aninhado a uma coorte de receptores de transplante renal.

A descrição detalhada da amostra, assim como os dados demográficos estão apresentados no item **Anexos**, ao final desta tese.

6 PERSPECTIVAS

A RA é uma resposta imune do aloenxerto potencialmente destrutiva que pode ocorrer a qualquer momento durante a vida útil de um órgão enxertado. Atualmente, o padrão ouro para o diagnóstico de RA é a biópsia do aloenxerto, um procedimento invasivo com complicações relacionadas. O desenvolvimento de ferramentas não invasivas que ajudam a prever o risco de RA pode levar a estratégias para melhorar os desfechos do paciente e do aloenxerto.

Nesse cenário, polimorfismos de DNA que podem ser possíveis preditores da RA valem a pena serem investigados detalhadamente. No presente estudo, os polimorfismos avaliados não puderam identificar os pacientes em risco para desenvolvimento de RA. Entretanto, essa estratégia merece ser estendida e outras vias podem ser importantes na identificação dos pacientes em risco. Neste sentido, *as bone morphogenetic proteins* (BMPs) são um grupo de fatores de crescimento que fazem parte da superfamília TGF- β . Inicialmente descritas pela sua capacidade de induzir a formação óssea endocondral, atualmente já foram associadas com diversas outras doenças, como a doença renal do diabetes, na qual as BMPs demonstram ter um papel protetor. Padrões de expressão de BMPs foram relacionados com fibrose intersticial e atrofia tubular em rim do aloenxerto. Recentemente, estudos demonstraram que as BMPs podem estar associadas ao risco de RA. Porém existem poucos estudos experimentais e apenas um avaliando polimorfismos em coreanos.

Dessa forma, uma perspectiva deste trabalho é investigar outras rotas que possam prever o risco de RA na nossa população, assim como a via BMP. A investigação prevê o estudo da associação dos polimorfismos rs235767, 3178250 e rs1005464 no gene *BMP2* e

dos polimorfismos rs2208404 e rs6014947 no gene *BMP7* e a rejeição aguda em transplantados renais. Os achados desse estudo contribuirão para o melhor entendimento dos mecanismos pelo qual genes, como o *BMP2* e *BMP7* podem contribuir para a patogênese da RA.

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou a associação entre três polimorfismos (rs6672995, rs4353135 e rs10754558) no gene *NLRP3* e os seguintes desfechos pós-transplante: alterações no peso e episódios de RA.

O primeiro objetivo foi avaliar a associação entre os polimorfismos no gene *NLRP3* e a mudança de peso pós-transplante. Nossos resultados demonstraram que indivíduos com o alelo G do polimorfismo rs10754558 ganharam menos peso pós-transplante do que indivíduos com o genótipo C/C. Isto sugere que o alelo G desse polimorfismo pode ser um dos fatores genéticos que influenciam as mudanças de peso frequentemente encontradas após o transplante renal, mesmo após ajuste para idade do receptor. O possível papel protetor do alelo G do polimorfismo rs10754558 no ganho de peso encontrado neste trabalho parece ser biologicamente plausível considerando que este alelo parece modificar a expressão de *NLRP3* por ocorrer em um sítio de ligação para um microRNA. Os demais polimorfismos, rs6672995 e rs4353135, no gene *NLRP3* não foram associados com mudanças no peso após o transplante.

O segundo objetivo foi estudar a associação entre os polimorfismos no gene *NLRP3* e a RA em transplantados renais. Porém, ao contrário de um estudo que avaliou o mesmo desfecho, os polimorfismos rs6672995, rs4353135 e rs10754558 não foram associados a

RA. Apesar disso, pela primeira vez na literatura foi investigado o polimorfismo rs10754558 em transplantados renais.

Apesar da relevância destes achados, mais estudos são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos aos quais os polimorfismos no gene *NLRP3* influenciam as mudanças de peso pós-transplante. É de suma importância a replicação em outras populações e possível validação como biomarcador, podendo assim, levar a melhores estratégias de seleção dos pacientes ao transplante, bem como prevenção de desfechos no aloenxerto desencadeados pelo excesso de peso. Além disso, mais estudos podem contribuir no entendimento da RA, através da investigação de outros polimorfismos que poderiam influenciar na ativação dos componentes do inflamassoma e desencadear os processos de sistema imune envolvidos na RA.

8 ANEXOS

Sample description

Data were retrospectively reviewed from kidney transplant electronic records and all the demographic and clinical characteristics of kidney transplant recipients classified by presence of kidney acute rejection were collected from a retrospective cohort [1], and include: donor type [living or deceased (with brain death)], recipient and donor ages at transplantation, recipient and donor gender, cold ischemia time, underlying kidney disease, presence of diabetes mellitus (DM), occurrence of post-transplant DM (PTDM), blood pressure (BP) previous transplant, pre-transplant pregnancies, blood transfusions, smoke habits, retransplantation, cytomegalovirus serology status (CMV) and hepatitis C virus infection (HCV), renal replacement therapy modality, occurrence of DGF (defined by the requirement for hemodialysis in the first post-transplantation week), induction immunosuppressive therapy, donor specific antibodies (DSA), panel reactive antibody (PRA) class I/II and HLA mismatches. The HLA typing were performed by PCR-SSP (polymerase chain reaction—sequence specific primers) technique in donors and recipients until 2006 year [2] and after that, the PCR-SSO (PCR—sequence specific oligonucleotide) technique was applied [3].

There were no significant differences between AR and non-AR groups regarding the major proportion of characteristics. [donor type (deceased), donor and recipient gender, donor and recipient age, cold ischemia time, DM, hypertension, smoking habits, number of pregnancies, number of blood transfusions, cytomegalovirus, hepatitis c virus, renal replacement therapy modality, HLA-A and B, PRA class I or II and donor specific antibody]. However, DGF, HLA-DR mismatches, HLA mismatches A/B/DR and antibody induction therapy differed between groups ($P < 0.05$). Analysis of the two techniques for HLA typing did not change the results. The DGF occurred more frequently in the AR group compared to non-AR patients ($P = 0.024$). The mean of total HLA-mismatches was higher in the AR group than in the non-AR group ($P = 0.011$). Likewise, the frequency of patients with 2 HLA-DR mismatches was higher in the AR group than in the non-AR group ($P = 0.008$). Moreover, a lower percentage of recipients with AR received antibody induction therapy with anti-thymocyte globulin (ATG) in comparison with the non-AR group ($P = 0.004$).

Referências

- [1] Sortica, D.A., et al., *K121Q polymorphism in the Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1 gene is associated with acute kidney rejection*. PLoS One, 2019. **14**(7): p. e0219062.
- [2] Bunce, M. and K.I. Welsh, *Rapid DNA typing for HLA-C using sequence-specific primers (PCR-SSP): identification of serological and non-serologically defined HLA-C alleles including several new alleles*. Tissue Antigens, 1994. **43**(1): p. 7-17.
- [3] Trajanoski, D. and S.J. Fidler, *HLA typing using bead-based methods*. Methods Mol Biol, 2012. **882**: p. 47-65.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of kidney transplant recipients classified by presence of kidney acute rejection

	AR (n = 98)*	Non-AR (n = 351)*	P values
Donor type (deceased)	64 (65.3)	253 (72.1)	0.240
Donor gender	47 (53.4)	171 (53.4)	0.999
Donor age (years)	41.36 ± 16.05	42.43 ± 15.09	0.559
Cold ischemia time (hours)	18.40 ± 7.69	19.12 ± 7.85	0.441
Recipient gender	61 (62.2)	210 (59.8)	0.752
Recipient age (years)	42.41 ± 12.79	45.23 ± 12.78	0.054
Diabetes mellitus	9 (9.2)	47 (13.4)	0.346
Hypertension	72 (77.4)	282 (85.5)	0.090
Smoking habits	23 (23.5)	71 (20.2)	0.480
Pregnancy			
0	6 (16.2)	32 (22.7)	0.528
≥1	31 (83.8)	109 (77.3)	
Blood transfusion			
0	49 (50.0)	180 (52.9)	0.690
≥1	49 (50.0)	160 (47.1)	
Positive CMV status	24 (25.5)	57 (16.5)	0.080
Positive HCV status	15 (9.1)	31 (15.8)	0.091
Renal replacement therapy			
Hemodialysis	93 (94.9)	319 (90.9)	0.404
Peritoneal dialysis	4 (4.1)	22 (6.3)	
Preemptive transplant	1 (1.0)	10 (2.8)	
DGF	64 (65.3)	182 (51.9)	0.024
HLA-A mismatches (0/1/2)	12/48/36	50/170/122	0.857
HL-B mismatches (0/1/2)	8/47/41	59/157/126	0.094
HLA-DR mismatches (0/1/2)	25/40/31	122/155/61	0.008

HLA mismatches A/B/DR (mean)	3.66	3.23	0.011
PRA – Class I	27 (45.8)	112 (48.7)	0.798
PRA – Class II	25 (42.4)	93 (40.4)	0.903
DSA	9 (10.1)	30 (9.3)	0.982
Antibody induction therapy	58 (59.2)	290 (82.6)	0.008
ATG	13 (13.3)	99 (28.2)	0.004
OKT3	5 (5.1)	37 (10.5)	0.170
Basiliximab	40 (41.8)	154 (43.9)	0.948

Data are presented as mean \pm SD or n (%). CMV, cytomegalovirus; HCV, hepatitis C virus; DGF, delayed graft function; HLA, human leukocyte antigen; PRA Class I/II, last panel reactive antibody Class I/II; DSA, donor specific antibody; ATG, Anti-thymocyte Globulin. *Unknown status for hypertension: n = 27, transfusion: n = 11, smoking habits: 2, HCV: n = 13, DGF: n = 1, HLA-A mismatches: n = 11, HLA-B mismatches: n = 11, HLA-DR mismatches: n = 15, HLA mismatches A/B/DR: n = 15, PRA Class I/II: n = 161 (among them, 136 patients had ELISA-PRA test negative), DSA: n = 38.

