



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



**Instituto Politécnico
de Coimbra**

Quantificação das diferentes subpopulações de células B e plasmoblastos do sangue periférico de transplantados renais

Ana Carolina Torres Silva

Coimbra

2013



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



**Instituto Politécnico
de Coimbra**

Quantificação das diferentes subpopulações de células B e plasmoblastos do sangue periférico de transplantados renais

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica do Artur Paiva, Professor Adjunto da ESTeS Coimbra e co-orientação do Dr. António Martinho, Assessor Superior da Carreira Técnica Superior de Saúde do Centro Regional do Sangue e Transplantação- Área da Transplantação do Instituto Português do Sangue e Transplantação.

Agradecimentos

Para a realização deste trabalho foram vários os intervenientes que colaboraram directa e indirectamente, os quais merecem o meu reconhecimento e gratidão.

Ao orientador e co-orientador, Professor Doutor Artur Paiva e António Martinho, respectivamente, pela dedicação, empenho e disponibilidade com que direccionaram e acompanharam este trabalho, assim como pelos comentários e sugestões.

Quero agradecer também aos colegas Ana Henriques e Tiago Carvalheiro, pela colaboração prestada ao longo da realização da tese, e simpatia com que sempre me receberam.

Finalmente, de modo especial, quero agradecer aos meus pais e amigos pela compreensão, apoio incondicional, incentivo e motivação imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

A vocês dedico este trabalho.

Júri

Especialista em Análises Clínicas e Saúde Pública Ana Maria de Figueiredo
Valado

Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Doutor Rui Manuel Baptista Alves

Professor Associado da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Doutor Artur Augusto Paiva

Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Doutor António José Martinho Gomes Teixeira

Técnico Superior de Saúde do Instituto Português do Sangue e da Transplantação

Resumo

O transplante de rim é a opção terapêutica e de reabilitação preferencial para a maioria dos doentes com insuficiência renal crónica terminal. Uma das principais complicações da transplantação renal é a ocorrência de rejeição e/ou disfunção crónica do enxerto.

Se durante muitos anos o principal alvo para a indução de tolerância foram os linfócitos T, hoje em dia, reconhece-se que as células B desempenham um importante papel no sucesso da transplantação.

Foi objectivo deste trabalho quantificar por citometria de fluxo as diferentes subpopulações de células B e de plasmoblastos no sangue periférico de doentes transplantados renais, assim como a expressão de imunoglobulinas de superfície nas células B memória e plasmoblastos.

Diferenças significativas no número de linfócitos B totais e suas subpopulações do sangue periférico foram encontradas, quer entre os distintos grupos de transplantados renais estudados, quer comparativamente ao grupo controlo. Tais alterações numéricas podem ser características de doentes transplantados renais, reflectindo a acção da terapêutica imunossupressora realizada, e reforçam o papel importante destas células na progressão da situação clínica face ao enxerto.

Palavras-chave

Transplante renal, linfócitos B, plasmoblastos, imunoglobulinas

Abstract

Organ transplantation is the main therapy for most patients with end stage renal disease with the particularity of induces a specific tolerance in the recipient.

For many years, the predominant focus of research was to induce tolerance on T cells. Today we know that B cells play an important role in transplantation.

In the present paper we evaluated by flow citometry the numbers of peripheral blood B cells and distinct B cell subsets, as well as the expression of surface immunoglobulins in memory B cells and plasmablasts from renal transplant patients.

Generally, significant differences in the number of total B lymphocytes and their subpopulations were found either between the distinct groups of patients or the control group. These numeric alterations can be seen as a feature of renal transplant patients, reflecting the action of immunosuppressive therapy, and highlighting the relevant role of these cells in the clinical progression.

Keywords

Kidney transplant, B cells, plasmoblasts, immunoglobulins

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 TRANSPLANTE RENAL	2
1.2 RESPOSTA IMUNE	4
1.2.1 RESPOSTA IMUNE INATA E REJEIÇÃO.....	4
1.2.2 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA E REJEIÇÃO	4
1.3 RESPOSTA HUMORAL.....	6
1.3.1 REJEIÇÃO MEDIADA POR ANTICORPO	6
1.4 MECANISMOS DE LESÃO MEDIADA POR ANTICORPO	10
1.5 DISFUNÇÃO CRÓNICA DO ENXERTO OU NEFROPATIA CRÓNICA DO ENXERTO (CAN).....	11
1.6 TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA	12
1.7 LINFÓCITOS B	13
1.7.1 DESENVOLVIMENTO DA CÉLULA B	13
1.7.2 ACTIVACÃO DA CÉLULA B.....	14
1.8 LINFÓCITOS B E SUAS SUBPOPULAÇÕES	15
1.8.1 CÉLULAS IMATURAS.....	15
1.8.2 CÉLULAS <i>NAÏVE</i>	15
1.8.3 CÉLULAS MEMÓRIA	16
1.8.4 PLASMOBLASTOS.....	17
1.9 LINFÓCITOS B E TRANSPLANTAÇÃO RENAL	18
2. OBJECTIVOS.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO	20
3.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS B.....	21
3.2.1 IDENTIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DOS LINFÓCITOS B E SUBPOPULAÇÕES.....	21
3.2.2 AQUISIÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO E ANÁLISE	21
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1 PERCENTAGEM E VALOR ABSOLUTO DAS CÉLULAS B E SUAS SUBPOPULAÇÕES E PLASMOBLASTOS	24
4.2 EXPRESSÃO DE IMUNOGLOBULINAS DE SUPERFÍCIE NAS CÉLULAS B MEMÓRIA CD27 ⁺ E PLASMOBLASTOS.....	28
5. DISCUSSÃO	31

6.	<u>CONCLUSÃO</u>	<u>34</u>
7.	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>35</u>

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

ILUSTRAÇÃO 1- GRÁFICO DE REPRESENTAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IMUNOGLOBULINAS DE SUPERFÍCIE NAS CÉLULAS B MEMÓRIA CD27 ⁺ NOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDO E GRUPO CONTROLO.	29
ILUSTRAÇÃO 2 - GRÁFICO DE REPRESENTAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IMUNOGLOBULINAS DE SUPERFÍCIE NOS PLASMOBLASTOS DO SANGUE PERIFÉRICO DOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDO E GRUPO CONTROLO.	30

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1- TIPOS DE REJEIÇÃO MEDIADA POR ANTICORPO	9
TABELA 2- VALOR ABSOLUTO DAS CÉLULAS B E PLASMOBLASTOS, NO SANGUE PERIFÉRICO DOS DIFERENTES GRUPOS DE DOENTES ESTUDADOS E GRUPO CONTROLO.....	25
TABELA 3- PERCENTAGEM DAS DIFERENTES SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS B E PLASMOBLASTOS DENTRO DO CONJUNTO TOTAL DOS LINFÓCITOS B DO SANGUE PERIFÉRICO DOS DIFERENTES GRUPOS DE DOENTES ESTUDADOS E GRUPO CONTROLO.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC	citotoxicidade celular dependente de anticorpo
AMR	rejeição mediada por anticorpo
APC	célula apresentadora de antigénio
ASST	Autoridade para os Serviços de Sangue e da Transplantação
BCR	receptor da célula B
CAN	nefropatia crónica do enxerto
CD	designação de “cluster”
CG	centros germinativos
CEH	célula estaminal hematopoiética
CMV	citomegalovírus
CP	célula plasmática
CSR	class switch recombination
C₄d	componente do complemento
DC	disfunção crónica
DSA	anticorpos específicos do dador
Fc	fracção cristalizável do anticorpo
Ig	imunoglobulina
MAC	complexo de ataque membranar
MALT	tecido linfóide associado à mucosa
MHC	complexo Major da Histocompatibilidade
MN	células mononucleares
MO	medula óssea
NK	células citotóxicas naturais
NL	nódulos linfáticos
PB	plasmoblastos
PTC	capilares peritubulares
Rh	referência ao grupo sanguíneo Rhesus
SHM	hipermutação somática
SP	sangue periférico
TNF-R	receptor do factor de necrose tumoral
TG	glomerulopatia devido a transplante
Tx	transplante

1. INTRODUÇÃO

1.1 *TRANSPLANTE RENAL*

O transplante de rim é a opção terapêutica e de reabilitação preferencial para a maioria dos doentes com insuficiência renal crónica terminal ^[1-3]. Segundo a ASST, numa análise por área, Portugal atingiu em 2011 uma taxa de cerca de 50 transplantes renais por milhão de habitante. Um transplante renal bem-sucedido proporciona ao doente uma melhor qualidade de vida, reduzindo a taxa de mortalidade na maioria dos doentes, quando comparada com a taxa de mortalidade de hemodiálise contínua ^[4-6].

Em Portugal existem critérios, descritos por lei, a cumprir antes da realização do transplante, sendo estes, a compatibilidade ABO e Rh entre dador e receptor e crossmatch antilinfocitário negativo por citotoxicidade, entre outros. Os doentes com crossmatch antilinfocitário positivo são categorizados como grupo de alto risco para desenvolver rejeição do enxerto hiperaguda ou aguda acelerada após transplante renal ^[7].

Para que um transplante renal seja bem-sucedido, a compatibilidade dos tecidos e a falta de anticorpos circulantes contra as células do dador é vital ^[8].

A sobrevivência, após transplante renal, varia também com a fonte do enxerto, idade do doente, presença e grau de severidade de condições co-mórbidas. Outros factores incluem o género, raça e grau de imunossupressão ^[9]. Sabe-se hoje que a sobrevivência dos doentes que recebem rim de um “dador vivo” é superior à daqueles que recebem rim de um cadáver ^[10, 11], e que doentes de idade mais avançada submetidos a um transplante renal têm uma taxa de mortalidade mais elevada que doentes mais jovens ^[12].

Mais de 50% dos rins transplantados de dadores cadáveres falham num prazo de 10 anos; de dadores “vivos” em 12 anos. Isto deve-se à falta de ferramentas clínicas para monitorizar com precisão a funcionalidade do enxerto ^[13] e à falta de testes específicos para a monitorização ^[14]. Assim sendo, a percentagem de rejeição do enxerto é ainda considerável.

A principal causa de morbilidade e mortalidade de doentes transplantados renais é a infecção ^[15]. Segundo um estudo com 1218 doentes transplantados renais, a infecção foi a segunda causa de morte destes (29% dos casos), sendo as doenças cardiovasculares a primeira, responsável por 38% dos casos ^[16]. Assim sendo, esforços para diminuir as

complicações infecciosas reduzindo a terapêutica imunossupressora encontram-se em curso ^[17].

1.2 RESPOSTA IMUNE

A resposta imune pode ser de dois tipos: Inata e Adaptativa. A primeira ocorre rapidamente, com especificidade limitada e sem memória e engloba diversos tipos celulares (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células citotóxicas naturais- NK)^[18] bem como componentes moleculares (proteínas do complemento, citocinas, entre outros)^[19]. Por sua vez, a resposta imune adaptativa, de que fazem parte as células B produtoras de anticorpos e as células T, desenvolve-se mais lentamente, mas é mais específica e resulta em memória celular^[20].

1.2.1 RESPOSTA IMUNE INATA E REJEIÇÃO

Um bom exemplo da participação da resposta inata na rejeição do enxerto é a activação do complemento bem como de outros componentes, pela condição isquémica que ocorre como resultado da cirurgia de substituição renal^[21]. Efeitos posteriores destes processos contribuem para uma função renal tardia e amplificam respostas imunes adaptativas com impacto negativo sobre a sobrevivência do enxerto a longo prazo.

1.2.2 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA E REJEIÇÃO

Os primeiros alvos da resposta imune adaptativa do hospedeiro contra o enxerto são os antígenos do sistema Major da Histocompatibilidade presentes no tecido alogénico. Este sistema nos humanos é designado por HLA. Os antígenos HLA de classe I expressam-se em todas as células nucleadas, enquanto os de classe II se encontram restritos às células apresentadoras de antígeno e células endoteliais. Deste reconhecimento resulta uma resposta celular e humoral que leva à rejeição do enxerto^[22]. O alo-reconhecimento pode ocorrer por duas vias não mutuamente exclusivas: a via directa e a indirecta de apresentação antigénica^[23].

Via directa

Esta via de apresentação antigénica engloba o reconhecimento de moléculas HLA do dador, intactas e na superfície celular, geralmente de células apresentadoras de antígeno (APCs). Tanto as células T CD8⁺ como as T CD4⁺ podem reconhecer directamente moléculas HLA classe I e II, respectivamente^[23].

Via indirecta

Em contraste com a via directa, esta via envolve o processamento das moléculas do dador, pelas APCs, e posterior apresentação às células T que, por conseguinte, são activadas.

Uma via semi-directa tem vindo a ser descrita, em que as APCs adquirem as moléculas HLA do dador por contacto célula a célula, activando posteriormente as células T do hospedeiro ^[24].

Enquanto a via directa é mais importante para a rejeição aguda, acredita-se que a via indirecta desempenha um papel dominante na rejeição crónica ^[25]. Para suportar esta afirmação, alguns estudos demonstraram que a inibição da rejeição aguda através da depleção de APCs atrasa significativamente o desenvolvimento da rejeição crónica, mas não a previne ^[26]. Foi também observado que a frequência da resposta directa declina com o passar do tempo após o transplante, enquanto há um influxo continuado de antígenos do dador processados pelas APCs pela via indirecta ^[27].

1.3 RESPOSTA HUMORAL

Durante muitos anos, os mecanismos mediados pela célula T foram considerados como a principal causa de rejeição de transplantes e doenças autoimunes ^[28], e as terapias imunossupressoras desenvolvidas tinham, maioritariamente, como alvo a célula T^[1]. Apesar de todas as melhorias na imunossupressão directa da célula T diminuírem a incidência de rejeição aguda ^[29], as respostas imunes humorais, principalmente as mediadas por alo-anticorpos, têm vindo a ser consideradas como causas de rejeição do enxerto ^[30]. De facto, respostas imunes humorais podem levar à rejeição até em doentes cuja resposta imune celular está bem controlada ^[31].

Também as técnicas para detecção e caracterização dos alo-anticorpos específicos do dador (DSA), têm vindo a sofrer melhorias. Apesar de todos os avanços nestas técnicas, muito pouco é ainda conhecido sobre os mecanismos imunológicos subjacentes aos efeitos clínicos dos DSA. Ainda não está claro porque alguns indivíduos aparentam tolerar os DSA, um fenómeno conhecido como acomodação, enquanto outros não ^[32]. Este fenómeno será abordado mais adiante.

As rejeições de transplante de rim são classificadas em dois tipos: celular ou rejeição mediada por anticorpos (AMR), segundo a classificação de Banff de 2007 ^[33, 34].

No entanto, muitos casos de rejeição apresentam um perfil misto com graus variáveis quanto à participação dos distintos componentes celulares e humorais ^[34].

1.3.1 REJEIÇÃO MEDIADA POR ANTICORPO

A AMR representa um desafio significativo para a sobrevivência do enxerto a longo prazo na transplantação renal, sendo uma importante causa de disfunção do enxerto, quer aguda quer crónica, com consequente perda do enxerto ^[35]. A AMR ocorre quando há uma imunossupressão aparentemente adequada, e os efeitos da exposição crónica a DSA surgem como motivo de debate de vários estudos ^[36].

Existem 3 tipos predominantes de AMR, que variam em acuidade e severidade: AMR hiperaguda, AMR aguda e AMR crónica.

Rejeição Hiperaguda

Esta forma de rejeição do enxerto ocorre quando existem títulos de DSA elevados, particularmente DSA contra moléculas do complexo Major da Histocompatibilidade de

classe I, no momento da transplantação ^[1]. Tal resulta na perda do enxerto dentro de minutos, horas ou, por vezes, dias. A ocorrência deste tipo de rejeição é extremamente rara, devido à medida universalmente adoptada de realizar um teste crossmatching pré-transplante ^[35].

A histopatologia é caracterizada por manifestações severas a nível endotelial e arterial, tais como arterite, edema intersticial e necrose cortical, com quase todos os casos requerendo nefrectomia.

Rejeição Aguda

É caracterizada por uma disfunção do enxerto manifestada dias após o transplante, como resultado da acção de DSA. Neste caso, os DSA podem ser pré-formados mas não detectados no momento do transplante, ou desenvolvidos após a transplantação, sendo por isso denominados de anticorpos “de novo” ^[37]. Este tipo de rejeição ocorre em aproximadamente 5-7% dos transplantes renais, e é responsável por 20-48% dos episódios de rejeição aguda entre os receptores com crossmatch positivo (pré-sensibilizados).

Com histopatologia semelhante à rejeição hiperaguda, embora menos severa que esta, a biópsia nestes casos mostra, por vezes, dilatação das células endoteliais, infiltração de neutrófilos nos glomérulos e capilares peritubulares, trombos de fibrina, edema intersticial e hemorragia ^[38]. A identificação deste tipo de AMR ficou bastante acessível com o desenvolvimento de técnicas de coloração para C₄d (produto do complemento) nas biópsias e com as melhorias na detecção de anticorpos. As colorações específicas para C₄d indicam a activação do complemento dentro do enxerto e servem como evidência indirecta da deposição de anticorpos fixadores de complemento ^[39].

Rejeição crónica

Tem sido descrito que os anticorpos podem intervir na disfunção crónica do enxerto, a qual é vista caracteristicamente como glomerulopatia devido a transplante (TG) nas biópsias ^[35]. Os doentes podem ser assintomáticos nos primeiros estádios, e apresentar proteinúria, hipertensão, e disfunção do enxerto em estádios mais avançados. O desenvolvimento de proteinúria encontra-se associado com a diminuição da sobrevivência do enxerto, independentemente de outros factores de risco ^[40].

A progressão pode ser por vezes bastante rápida, especialmente se houver registo de AMR aguda, resultando em falência do enxerto em meses ^[41].

Assim, a presença de DSA antes ou no momento da transplantação é associada com o aumento da frequência de AMR e, conseqüentemente, pior resposta ^[42].

Acomodação

Este fenómeno foi descrito primeiramente, nos doentes que receberam transplante renal com incompatibilidade ABO. Nestes, após a remoção de anticorpo (por plasmaférese) e transplante, os anticorpos contra o sistema sanguíneo re-acumularam na circulação e no enxerto, tal como o complemento, mas não se manifestaram qualquer acção lesiva no enxerto. Pouco se sabe ainda sobre os mecanismos biológicos que permitem que alo-anticorpos funcionais não causem dano no tecido.

Muitos destes doentes têm coloração positiva para C₄d na biopsia renal. Esta positividade para C₄d sugere a presença de aloanticorpo mas nem sempre se correlaciona com lesão do enxerto em curso, como também não prevê com segurança a evolução funcional do enxerto ^[43].

Os mecanismos sugeridos para a acomodação incluem: uma alteração da capacidade funcional do anticorpo, por troca de isotipo de IgG para IgG2, resultando numa activação do complemento menos eficiente; uma mudança na capacidade funcional do antigénio ou até uma regulação negativa do mesmo; e uma resistência do enxerto à lesão, pela produção de proteínas cito-protectoras pelas células endoteliais ^[44]. A acomodação também está relacionada com a afinidade do anticorpo, possibilitando às células endoteliais a oportunidade de adaptarem-se na presença de anticorpos de baixa afinidade ^[45].

Os 4 tipos de AMR caracterizados por *Colvin et al* encontram-se resumidos na tabela 1 ^[46].

Tabela 1- Tipos de rejeição mediada por anticorpo

Diagnóstico	Apresentação Clínica	Histologia	C₄d	Serologia	Desenlace
AMR Hiperaguda	Falha do enxerto imediata (min a horas)	N nos glomérulos e PTC; hemorragia, necroses, trombose	+ PTC; pode ser - primeiramente	Anti-dador HLA ou ABO + na maioria	Quase sempre irreversível
Rejeição humoral Aguda	Rápida perda da função do enxerto (dias) a qualquer altura após o enxerto	Variável. N e macrófagos nos glomérulos e PTC.	+ PTC; variável nos glomérulos	Anti-dador HLA ou ABO + na maioria (90%)	Às vezes reversível com o tratamento apropriado
Rejeição Humoral Crónica	Lenta, perda função enxerto progressiva (meses até anos), proteinúria, hipertensão	Células MN nos glomérulos e PTC; atrofia tubular e necrose intersticial	+ PTC; variável nos glomérulos	Anti-dador HLA + maioria, especialmente para HLA classe II	Sem terapia óptima definida
Acomodação	Função do enxerto normal	Normal ou com alterações minor	PTC+, glomérulo variável	Comum nas ABO incompatíveis, ocasionalmente HLA	Sem terapia óptima definida

PTC, capilares peritubulares; **N**, neutrófilos; **MN**, mononucleares

1.4 MECANISMOS DE LESÃO MEDIADA POR ANTICORPO

O mecanismo mais importante deste tipo de lesão é a activação da via clássica do complemento pelo complexo antígeno-anticorpo, levando à formação do complexo de ataque à membrana (MAC), resultando em lesão celular. Os produtos do complemento actuam como quimiocinas levando à infiltração de células inflamatórias e amplificação do processo inflamatório.

Os anticorpos também causam lesão do enxerto por vias independentes do complemento, tal como citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Este fenómeno é mediado por células da imunidade inata, tais como as células NK e macrófagos, que se activam por ligação à porção cristalizável (Fc) do anticorpo ^[47].

1.5 DISFUNÇÃO CRÓNICA DO ENXERTO OU NEFROPATIA CRÓNICA DO ENXERTO (CAN)

A disfunção crónica do enxerto é a principal causa de perda tardia de transplante renal, sendo esta de etiologia multifactorial, envolvendo mecanismos imunológicos e não imunológicos ^[48]. O termo disfunção crónica do enxerto em detrimento de rejeição crónica deve-se ao facto de o primeiro ser mais abrangente, englobando não só a deterioração crónica da função do enxerto provocada por factores imunológicos, como também a degradação progressiva do enxerto ocasionada pela recidiva da doença renal e/ou por factores não imunológicos, como a idade do dador, a nefrotoxicidade medicamentosa, infecções por CMV, entre outras.

O diagnóstico da CAN é histológico e representa o estágio final do dano no enxerto renal ^[49]. As características histopatológicas da CAN- fibrose intersticial, atrofia tubular, glomerulopatia e vasculopatia- são inespecíficas. Pensa-se que é responsável por 40% das perdas de enxerto aos 10 anos ^[50]. Níveis elevados de anticorpos anti-HLA pré-transplante e DSA de-novo têm vindo a ser associados com CAN. No entanto, anticorpos desenvolvidos de-novo e contra HLA do dador, nem sempre são detectados na circulação dos doentes em rejeição aguda, questionando-se assim a significância destes na patogénese da rejeição crónica ^[23].

Assim, evitar ou retardar a progressão de DC pela sua prevenção ou diagnóstico precoce, assume importância primordial no acompanhamento do paciente transplantado. Agentes imunossuppressores químicos e biológicos utilizados de forma combinada em protocolos de imunossupressão são usados com o objectivo de minimizar o fenómeno de rejeição do enxerto. Estas drogas, por meio de mecanismos moleculares complexos, visam modificar a resposta imune de forma a “aceitar” ou “ignorar” o órgão transplantado.

1.6 TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA

O objectivo da transplantação de órgãos é induzir no receptor uma tolerância específica, face ao dador, na ausência de imunossupressão farmacológica ^[51]. Esta tolerância é um estado de “falta” de resposta imune, ou uma resposta imune benigna, à presença de antígenos específicos não próprios ^[30]. Uma vez atingido este estado, o transplante seria realizado sem o risco de rejeição do enxerto e sem o recurso da utilização de drogas imunossupressoras. Deste modo, evitar-se-ia os efeitos colaterais do uso destas drogas, de acção não específica e heterogénea, como as infecções e outras malignidades ^[52].

Tolerância espontânea, geralmente verificada em situações em que os doentes deixam de tomar os seus imunossupressores, já foi descrita ocasionalmente em alguns casos de transplante renal ^[30]. Actualmente desenvolvem-se estudos com o intuito de identificar associações moleculares capazes de prever tolerância, mas enquanto estes biomarcadores não se encontram disponíveis, os riscos de perda do enxerto superam os potenciais ganhos da remoção dos imunossupressores.

Para induzir esta tolerância ao enxerto, uma das abordagens usadas é eliminar o sistema imune do receptor e depois reeducá-lo, na presença de um transplante, para que reconheça o órgão transplantado como próprio ^[53]. A remoção do sistema imune com radiação ou quimioterapia, seguida de transplante de medula óssea ou de um órgão, já induziu tolerância imunológica em modelos animais com sucesso ^[54].

1.7 LINFÓCITOS B

Durante muitos anos o foco principal das pesquisas sobre transplantação e doenças autoimunes foram as células T. Com o crescente interesse pela rejeição humoral, na última década as células B emergiram como um importante factor da transplantação renal.

1.7.1 DESENVOLVIMENTO DA CÉLULA B

A maturação das células B ocorre em duas etapas que se localizam em diferentes tecidos: i) a diferenciação dos precursores de células B a partir de uma célula estaminal hematopoiética (CEH) até uma célula B *naïve* madura, na medula óssea (MO) ^[55]; e (ii) a maturação em células B de memória/efectoras, nos tecidos linfóides secundários – nódulos linfáticos (NL) e tecidos linfóides associados a mucosas (MALT) – na MO e baço ^[56-58].

A competição dos precursores de células B por factores promotores de diferenciação (p.e., citocinas específicas de linhagem, receptores membranares de células estromais, e ligandos para o seu receptor) na MO, induz estas células a passarem por uma diferenciação gradual desde uma CEH até uma célula B madura ^[55, 59]. A célula B *naïve* com características fenotípicas maduras e um receptor funcional ^[60] deixa a MO através dos vasos sanguíneos, e pelo sangue periférico re-circula entre os tecidos linfóides secundários, morrendo passado poucos dias. Caso esta célula entre em contacto com o antigénio nos NL, baço, ou MALT há a formação de uma reacção do centro germinal (CG) em colaboração com células T CD4⁺ activadas ^[57, 58]. Depois de passarem por vários ciclos de proliferação e maturação por afinidade na zona escura e clara do CG, estas células originam células B de memória e pré-efectoras (plasmoblastos) ^[57, 58]. Células B de memória quiescentes permanecem recirculando no sangue periférico ou migram para tecidos de drenagem de antigénio ^[61]. Enquanto isso, os plasmablastos (PB) procuram nichos de sobrevivência na MO ou nos MALT para completarem a sua diferenciação em células secretoras de anticorpos – células plasmáticas (CP) ^[62].

Os perfis fenotípicos dos diferentes estadios de maturação da célula B na MO ^[60] e nos NL ^[57] são desde há muito conhecidos em humanos. No entanto, devido à sua complexidade fenotípica, os subtipos de células B do sangue periférico só mais recentemente foram definidos. Inclusivamente foi descrito dentro das células B pré-CG circulantes não apenas uma população de linfócitos B *naïve* maduros mas também uma subpopulação de células B minoritária com reduzida capacidade funcional e características fenotípicas de imaturidade, denominadas de células transicionais ^[63-65].

Estas células deixam a MO e necessitam de alcançar o microambiente esplénico para completar o seu processo de maturação. Uma vez no baço, estas células B passam por 2 estádios transicionais, denominados de estágio 1 e 2 (T1 e T2, respectivamente). Apenas uma minoria das células B completará com sucesso esta fase de transição, uma vez que esta etapa de diferenciação constitui um *checkpoint* crucial de controlo de auto-reatividade que requer a interacção do factor solúvel activador de célula B (BAFF) com o seu receptor, BAFFR, expresso particularmente neste estágio de maturação ^[66].

Em suma, o estudo dos diferentes subtipos de células B circulantes, entre estes diversos tecidos através do sangue periférico, veio melhorar o conhecimento do estado imunológico de um indivíduo, assim como, de condições patológicas relacionadas com a biologia e homeostase da célula B.

1.7.2 ACTIVAÇÃO DA CÉLULA B

As células *naïve* com características fenotípicas maduras e um BCR totalmente funcional, deixam a medula óssea através dos vasos sanguíneos, alcançam o sangue periférico e re-circulam entre os tecidos linfoides secundários. A activação das células B, a sua proliferação e diferenciação em plasmócitos secretores de anticorpos, e em células B de memória pode ocorrer segundo dois tipos de resposta humoral.

As respostas B dependentes de célula T são caracterizadas pela formação do CG, proliferação ampla de células B, maturação por afinidade, e CSR das Ig resultando na formação de células B de memória e CP com alta afinidade. No entanto, as células B podem responder a antígenos mesmo na ausência de células T (respostas B independentes de célula T, TI) que são activadas quer via BCR e outro receptor “inato” (TI-1) ou via ligação cruzada extensiva do BCR devido à natureza repetitiva do antígeno (p.e. antígenos polivalentes, como polissacarídeos, que pela sua natureza não podem ser reconhecidos pelas células T) (TI-2) ^[67-69].

1.8 LINFÓCITOS B E SUAS SUBPOPULAÇÕES

1.8.1 CÉLULAS IMATURAS OU TRANSICIONAIS

No sangue periférico de adultos saudáveis detecta-se de forma sistemática, embora em reduzida frequência (de 2%-4% do total de células B em adultos, cerca de 1-5 células/ μ L), células B imaturas ou transicionais [70-72]. Estas células foram inicialmente equiparadas, em termos fenotípicos, às células B “transicionais” identificadas em ratinho, mas sabe-se actualmente que correspondem a células B imaturas que abandonam a MO durante o processo de selecção negativa. Assim, estas células apresentam características fenotípicas de um linfócito B imaturo (CD19⁺, CD10⁺, CD24⁺, CD38⁺), co-expressam SmlgM e SmlgD, carecem de mutações dos genes IGH e apresentam uma capacidade *in vitro* para proliferar e se diferenciarem na célula secretora de anticorpo claramente inferior àquela apresentada pelas células B *naïve* maduras [63-65]. Desta forma representam um compartimento celular heterogéneo, constituído por células aparentemente em diferentes fases de maturação, entre os estadios de célula B imatura e de linfócito B *naïve* maduro. No sangue periférico, o seu número surge aumentado em crianças e doentes com patologias autoimunes e outras patologias com base imunológica (p.e. lúpus eritematoso sistémico, imunodeficiência comum variável e doenças linfoproliferativas ligadas ao cromossoma X) e durante o processo de regeneração da MO após transplante hematopoiético [73, 74], geralmente associado a uma diminuição do número de células B de memória [63-65]. Existe a possibilidade (embora não demonstrada) de que em humanos algumas destas células possam concluir a sua maturação na periferia, actuando como células B reguladoras humanas [75], ou que possam passar por um processo de transformação neoplásica. Finalmente há ainda a salientar um maior ratio κ/λ neste compartimento celular comparativamente ao das outras subpopulações de células B circulantes (cerca de 2,0 vs 1,5, respectivamente).

1.8.2 CÉLULAS NAÏVE

As células *naïve* deixam a medula óssea e alcançam o sangue periférico através dos vasos sanguíneos, migrando para os nódulos linfáticos. Se as células *naïve* não encontrarem um antigénio, deixam os nódulos linfáticos através dos vasos linfáticos, circulam entre o sangue periférico e os tecidos linfóides e morrem dentro de alguns dias [76]. Por outro lado, se estas células encontrarem o seu antigénio específico, são activadas com o auxílio da célula T, e migram para o CG. Aí sofrem uma maturação de

afinidade, resultando na sobrevivência e proliferação de clones de células B com um BCR com alta afinidade pelo antígeno. Estas células que constituem cerca de 60-70% dos linfócitos B do sangue periférico e expressam simultaneamente IgM e IgD, apresentam o seguinte perfil imunofenotípico: CD10⁻/CD19⁺/CD20⁺/CD27⁻/CD38^{+/-}/CD45⁺ [76].

1.8.3 CÉLULAS MEMÓRIA

Em humanos, uma fracção substancial das células B circulantes consiste de células que já entraram em contacto com antígeno e apresentam características de células B de memória [77]. Estas células B de memória (aproximadamente 20–30% de toda as células B do sangue periférico em adultos) passaram por SHM apresentando as suas regiões IGVH mutadas, e cerca de metade também já passou por CSR das Igs [78, 79], o que se reflecte na expressão variável de SmlgH (23% ± 10% e 21% ± 9% das células B de memória do sangue periférico no adulto expressam SmlgG e SmlgA, respectivamente).

Inicialmente, as células B de memória foram identificadas com base na expressão de CD27 [79, 80]. Aquelas células B de memória CD27⁺ que expressam IgA ou IgG parecem derivar de respostas consecutivas dependentes de célula T no CG e contêm alto grau de SHM nos genes das Ig [81]. As restantes células B de memória CD27⁺ continua a co-expressar SmlgM e SmlgD (52% ± 15% das células B de memória), ou apenas SmlgM. Estas células B de memória CD27⁺IgM⁺IgD⁻ contêm menos SHM mas apresentam características moleculares de reacções primárias do CG [82]. Em contraste com as células B de memória CD27⁺IgM⁺IgD⁻, as células B CD27⁺IgM⁺IgD⁺, denominadas de “efectoras naturais”, estão presentes em doentes com deficiência de CD40 ou CD40L, o que sugere que pelo menos parte deste subtipo celular se possa formar independentemente da participação das células T e da formação de um CG funcional [83-85]. Apesar da sua origem permanecer controversa, estas células B efectoras naturais assemelham-se a células B pré-diversificadas da zona marginal [83] e apresentam um número mais limitado de replicações e de SHM [81, 86] comparativamente com as células do CG e com aquelas CD27⁺IgD⁻ [81, 83]. No entanto, em outros estudos foi descrita uma população como fazendo parte destas células, com as mesmas características fenotípicas [87, 88], e os mesmos reordenamentos VDJ das IGVH que aqueles encontrados nas células B de memória com troca de isotipo [82] sugerindo que esta população seja constituída por uma mistura de células B de memória do CG e independentes do CG. Mais recentemente foram ainda descritas no sangue periférico duas populações de células B, CD27⁻IgG⁺ e CD27⁻IgA⁺ (21% ± 10% e 9% ± 6% das células B de memória,

respectivamente) ^[89-91]. Estas apresentam um menor número de SHM nos genes das Igs e expressam com maior frequência IgG3 que as suas homólogas CD27⁺ ^[90, 91].

Em suma, actualmente seis subtipos de células B de memória podem ser identificados com base no seu fenótipo de célula B após contacto com o antígeno, expressão diferencial de CD27, isotipos das IgH e análise do seu número de replicações e SHM, permitindo deste modo definir as suas origens através de três vias distintas dependentes e independentes do CG.

Até à data, não foi detectada a presença de células B de memória sIgE⁺ no sangue periférico e a sua origem e função permanecem por esclarecer.

1.8.4 PLASMOBLASTOS

Células com características morfológicas, fenotípicas e funcionais de célula plasmática (CP) são também detectadas, em reduzido número, no sangue periférico de um adulto em estado basal ^[70-72]. A maioria destas células pensa-se corresponderem a plasmoblastos (PB) recém-formados (CD10⁻/CD19⁺/CD20^{-d}/CD27⁺⁺/CD38⁺⁺⁺/CD45^d) que migram dos tecidos linfóides secundários para nichos na MO, MALT, ou tecidos inflamados. Em conjunto com estas células, as CP que deixam a MO e as mucosas podem ser detectadas no sangue periférico em condições de activação imune ^[71, 72]. Este compartimento representa cerca de 1%–3% (1–5 cells/ μ L) de todas as células B no sangue periférico de um adulto saudável em condições basais ^[70-72], no entanto sob condições específicas pode alcançar frequências mais altas que todas as restantes células B circulantes (p.e. em infecções agudas). Em contraste com as células B de memória, a IgA representa a Ig mais frequentemente expressa nos PB/CP (49% \pm 12% de todos os plasmoblastos/CP do sangue periférico), com cerca de 18% \pm 12% de células SmlgM⁺ e 13% \pm 11% SmlgG⁺ ^[70, 71]. Em adultos saudáveis, cerca de 14% \pm 12% dos PB/CP circulantes não expressam nenhuma sIg ^[70, 71] e menos de 5% destas células são SmlgD⁺SmlgM⁻, as quais têm sido associadas com respostas imunes do tracto respiratório superior ^[92, 93]. Inclusive, a distribuição das cadeias leves das Ig também é heterogénea dentro dos diferentes compartimentos de células B circulantes. Os PB/CP apresentam ratios κ/λ mais baixos comparativamente com as restantes células B. Em particular, aqueles que expressam apenas SmlgD (SmlgM⁻) expressam maioritariamente Smlg κ mas são oligoclonais por sequenciação de DNA ^[94].

1.9 LINFÓCITOS B E TRANSPLANTAÇÃO RENAL

Apesar da rejeição do rim após alo-transplantação ser um fenómeno considerado principalmente mediado por linfócitos T, há cada vez mais evidências de que as células B e os anticorpos por estas produzidos, desempenham também um importante papel no processo ^[95, 96].

As contribuições dos linfócitos B e plasmoblastos para a rejeição do enxerto permanecem pouco claras devido às várias funções desenvolvidas por estas células durante as respostas imunes ^[97]. De entre todas as funções de que são responsáveis, podemos destacar a secreção de anticorpos por células plasmáticas ^[97], a apresentação de antígenos por células B aos linfócitos T ^[98, 99], e o facto de que os linfócitos B serem indispensáveis para uma expansão óptima das células T CD4⁺, formação de memória celular e produção de citocinas ^[100-102].

Como o grande objectivo da imunologia do transplante é induzir tolerância específica ao dador, desenvolvendo terapias imunossupressoras a curto prazo, e que resultem numa extensa supressão das respostas imunes específicas contra o enxerto, deixando o restante sistema imune competente ^[103], podem ser várias as abordagens e terapias de imunossupressão. Actualmente estas estratégias incluem a depleção da célula B, inibição da activação dos linfócitos B, depleção dos plasmoblastos, remoção dos anticorpos circulantes ou inibição da função efectora do próprio anticorpo ^[104].

Dito isto, vários estudos têm tentado esclarecer os mecanismos que controlam as respostas das células B, para que assim se possam alcançar e desenvolver novas formas de induzir e manter a tolerância ao enxerto, aumentando a taxa de sobrevivência pós-transplante.

2. OBJECTIVOS

- ✓ Quantificar as diferentes subpopulações de células B e plasmoblastos do sangue periférico de doentes transplantados renais e do grupo controlo;
- ✓ Avaliar a expressão de imunoglobulinas pelas diferentes subpopulações de células B e plasmoblastos nos diferentes grupos de estudo;
- ✓ Comparar os dados analisados entre os grupos de doentes transplantados renais com função renal estável superior a 10 anos, e os grupos de doentes transplantados renais com doença crónica do enxerto e o grupo controlo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Pacientes

Um total de 68 doentes transplantados renais (idade $56,8 \pm 11,8$) foi incluído neste estudo. Destes 42 indivíduos eram do sexo masculino (idade $56,3 \pm 11,3$) e 26 do sexo feminino (idade $57,7 \pm 12,69$).

Com base no valor de creatinina de cada um dos doentes, estes foram separados em 2 grupos distintos: doentes com função renal estável superior a 10 anos (creatinina $0,96 \pm 0,18$ mg/dL) e doentes com disfunção crónica do enxerto (creatinina $2,64 \pm 0,74$ mg/dL).

Assim, são 46 [idade $59 \pm 11,1$; sexo 25 masculinos (idade $59,1 \pm 9,9$) / 21 femininos (idade $58,9 \pm 12,7$)] os doentes incluídos no grupo com função renal estável à mais de 10 anos; e 22 [idade $52,2 \pm 12$; sexo 17 masculinos (idade $52,1 \pm 12,3$) / 5 femininos (idade $52,6 \pm 12,3$)] os doentes com disfunção crónica do enxerto.

Controlos

Neste estudo foi incluído um grupo controlo, constituído por 12 indivíduos, com idade e sexo equiparados ao grupo de doentes (idade $52 \pm 12,5$; sexo: 2 masculinos / 10 femininos), sem história clínica familiar de patologias renais ou outras associadas.

Amostras

Amostras de sangue periférico de cada doente e dos indivíduos do grupo controlo, foram colhidas para tubos de EDTA (Vacuette, América do Norte), no dia de inclusão e avaliação clínica. As amostras foram enviadas para o laboratório, com um número de código e a análise foi feita sem conhecimento do estado clínico dos doentes.

Ética

Todos os participantes foram devidamente informados acerca do estudo, tendo assinado um consentimento informado.

3.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS B

3.2.1 IDENTIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DOS LINFÓCITOS B E SUBPOPULAÇÕES

A quantificação das células B e identificação das suas várias subpopulações foi realizada em amostras de sangue periférico colhidas em K3-EDTA, usando-se os seguintes anticorpos: anti-CD20-PB (Pacific Blue; clone 2H7; BioLegend, San Diego, California, EUA), anti-CD27-PC5 (phycoerythrin-cyanine 5; clone 1A4LDG5; Beckman Coulter; USA), anti-CD19-PC7 (phycoerythrin-cyanine 7; clone J3-119; Beckman Coulter, França), anti-CD45-KO (Krome Orange; clone J.33; Beckman Coulter, França) and anti-CD38-APC-H7 (allophycocyanin-H7-conjugated; Custom Conjugate, BD Pharmingen, San Diego, California, EUA).

Em cada subpopulação, foi também analisada a expressão de isotipos de cadeias pesadas de imunoglobulinas de superfície: anti-IgM-APC (Alofococianina; clone G20-127; BD Pharmingen, San Diego, California, EUA), anti-IgG-FITC (Isotiocianato de Fluoresceína; clone G18-145; BD Pharmingen, San Diego, California, EUA) and anti-IgA-PE (Ficoeritrina; clone B3506B4; Beckman Coulter, Brea, C.A., USA).

As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Após esta incubação, um protocolo de lise celular e lavagem foi realizado: 2 mL de solução de lise FACS (BDB, San José, CA, USA) diluída 1:10 (vol/vol) em água destilada foi adicionada e após 10 minutos de incubação, as células foram lavadas com 2 mL de PBS e re-suspendidas em 0.5 mL de PBS antes da aquisição no citómetro de fluxo.

3.2.2 AQUISIÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO E ANÁLISE DE DADOS

A aquisição da amostra foi realizada no citómetro de fluxo FACS-Canto II (BDB, São José, CA) com recurso à aplicação informática FACSDIVA (BDB, São José, CA). Para analisar as diferentes subpopulações de célula B e avaliar a expressão de isotipos de imunoglobulinas (cadeia pesada) de superfície usou-se o programa informático Infinicyt 1.5 (Cytognos, Espanha). Os resultados são apresentados em percentagem de células positivas para cada anticorpo estudado.

Os distintos compartimentos periféricos de células B foram identificados pela expressão diferencial de CD19, CD20, CD27 e CD38, juntamente com as suas propriedades de dispersão da luz (FSC, Forward Scattered Light e SSC, Side Scattered Light) que reflectem o seu tamanho e complexidade. Uma vez identificados os distintos subtipos de

linfócitos B (transicionais: CD19⁺/CD20⁺⁺/CD27⁻/CD38⁺⁺; *naïve*: CD19⁺/CD20⁺/CD27⁻/CD38⁻; memória: CD19⁺/CD20⁺/CD27⁺/CD38^{-/+}; plasmoblastos: CD19⁺/CD20^{-/+d}/CD27⁺⁺/CD38⁺⁺⁺), procedeu-se à análise de expressão de isotipos de imunoglobulinas de superfície IgM, IgG e IgA nas células B memória e plasmoblastos.

Os valores absolutos foram calculados utilizando uma dupla metodologia: citometria de fluxo e contador hematológico (A C Tdiff 2, Beckman Coulter, Brea, CA, EUA).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram estatisticamente analisados através do uso do teste não paramétrico de Mann-Whitney, para amostras independentes. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa SPSS Statistics 17.0 (IBM, Armonk, NY, USA) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 PERCENTAGEM E VALOR ABSOLUTO DAS CÉLULAS B E SUAS SUBPOPULAÇÕES E PLASMOBLASTOS

A partir de uma população de 68 doentes transplantados renais, subdividida em 3 grupos, sendo estes: o grupo de doentes com função renal estável e transplante há mais de 10 anos; o grupo de doentes com disfunção crónica do enxerto e transplante renal há menos de 10 anos e o grupo com disfunção crónica do enxerto e transplante há mais de 10 anos; e um grupo controlo, formado por 12 indivíduos saudáveis, procurou-se verificar se existiam diferenças nos valores absolutos de células B e plasmoblastos no sangue periférico, bem como se existiam diferenças, em termos percentuais, das diferentes subpopulações de células B estudadas e sua expressão de imunoglobulinas de superfície.

Por citometria de fluxo e com base na expressão de CD20, CD38, CD27 e expressão de imunoglobulina de superfície, identificaram-se e quantificaram-se, em termos absolutos e relativos, as células imaturas, as células *naïve*, e as células memória CD27⁺ e memória CD27⁻ e plasmoblastos.

Verificámos assim que, face à distribuição dos linfócitos B totais, obtivemos diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos de doentes transplantados renais, comparativamente ao grupo controlo, apresentando o grupo de doentes números totais mais baixos para estas células. Ainda relativamente aos valores de linfócitos B totais, encontrou-se diferenças estatisticamente significativas entre o grupo com função renal estável comparativamente ao grupo com DC do enxerto e Tx inferior a 10 anos e, comparativamente com o grupo com DC do enxerto e Tx superior a 10 anos, apresentando o grupo de doentes com função renal estável, valores mais altos para estas células, dentro do conjunto dos doentes transplantados renais.

Relativamente aos valores absolutos de plasmoblastos, obtivemos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com DC do enxerto, comparativamente ao grupo controlo, apresentando o grupo de doentes transplantados renais com DC do enxerto valores totais de plasmoblastos mais baixos. Ainda se observou um aumento significativo no grupo de doentes com função renal estável comparativamente com o grupo com DC do enxerto e transplante renal inferior a 10 anos. Os dois grupos de doentes com DC do enxerto apresentam também diferenças estatisticamente

significativas entre si, sendo o grupo com transplante renal realizado há mais de 10 anos aquele que apresenta um valor mais elevado de plasmoblastos.

Tabela 2- Valor absoluto das células B e plasmoblastos, no sangue periférico dos diferentes grupos de doentes estudados e grupo controlo (Valores expressos em média±desvio padrão, e em células/ μ L)

Grupos de estudo				
Compartimentos celulares	Doentes com função renal estável Tx>10anos	Doentes com DC do enxerto		Grupo Controlo
		Tx<10 anos	Tx>10 anos	
Valor absoluto dos linfócitos B	87,25 ^{a,f,d} ± 77,76	54,4 ^b ± 39	64,39 ^c ± 49	192 ± 122
Valor absoluto dos plasmoblastos	1,69 ^f ± 1,55	0,39 ^{b,e} ± 0,55	1,19 ^c ± 0,88	2,39 ± 1,58

^a p<0,05 para doentes com função renal estável versus grupo controlo

^b p<0,05 para doentes com disfunção crónica do enxerto Tx<10anos versus grupo controlo

^c p<0,05 para doentes com disfunção crónica do enxerto Tx>10 anos versus grupo controlo

^d p<0,05 para doentes com função renal estável versus doentes com DC do enxerto Tx>10anos

^e p<0,05 para doentes com DC do enxerto Tx<10anos versus doentes com DC do enxerto Tx>10anos

^f p<0,05 para doentes com função renal estável versus doentes com DC do enxerto Tx<10anos

Em relação aos valores percentuais das diferentes subpopulações de células B e plasmoblastos, verificaram-se várias diferenças entre os grupos de estudo.

Todos os grupos apresentam frequências mais baixas de células imaturas e *naïve*, comparativamente ao grupo controlo, com o conseqüente aumento das células B memória CD27⁺.

Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas na análise das células memória CD27- IgG, entre os diferentes grupos de doentes transplantados renais, comparativamente ao grupo controlo, apresentando os grupos de doentes transplantados renais frequências mais elevadas.

Avaliando os valores percentuais das células memória CD27- IgA+ dos diferentes grupos de estudo, diferenças estatisticamente significativas foram encontradas no grupo com função renal estável, bem como no grupo com DC do enxerto e transplante há menos de 10 anos, comparativamente ao grupo com DC do enxerto e transplante há mais de 10 anos. O grupo de doentes com DC do enxerto e transplante há mais de 10 anos apresenta a percentagem mais baixa de células memória CD27- IgA+.

Em relação à percentagem de plasmoblastos no total das células B, esta encontrou-se diminuída no grupo com DC do enxerto e transplante há menos de 10 anos quando comparada com o grupo controlo.

Um aumento significativo da frequência de plasmoblastos foi ainda observado no grupo de doentes com função renal estável comparativamente ao grupo com DC do enxerto há menos de 10 anos.

Tabela 3- Percentagem das diferentes subpopulações de células B e plasmoblastos dentro do total dos linfócitos B do sangue periférico nos diferentes grupos de doentes estudados e grupo controlo (Valores expressos em média \pm desvio padrão)

Grupos de estudo				
Compartimentos celulares	Doentes com função renal estável Tx>10anos	Doentes com DC do enxerto		Grupo Controlo
		Tx<10 anos	Tx>10 anos	
% de Células Imaturas	2,78	0,62	1,69	2,99
	\pm 2,58	\pm 0,58	\pm 1,83	\pm 2,83
% de Células Naive	49	55	50	61
	\pm 24	\pm 21	\pm 21	\pm 15
% de Células Memória CD27+	37	34	39	31
	\pm 24	\pm 20	\pm 18	\pm 15,5
% de Células Memória CD27- IgG	5,51 ^a	5,25 ^b	4,8 ^c	1,4
	\pm 4,58	\pm 3,84	\pm 3	\pm 1,45
% de Células Memória CD27- IgA	2,92 ^d	2,24 ^e	1,18	1,59
	\pm 2,72	\pm 1,36	\pm 0,54	\pm 0,85
% de Plasmoblastos	2,58 ^f	0,6 ^b	2,03	1,3
	\pm 2,33	\pm 0,6	\pm 1,79	\pm 0,7

^a p<0,05 para doentes com função renal estável versus grupo controlo

^b p<0,05 para doentes com disfunção crónica do enxerto Tx<10anos versus grupo controlo

^c p<0,05 para doentes com disfunção crónica do enxerto Tx>10 anos versus grupo controlo

^d p<0,05 para doentes com função renal estável versus doentes com DC do enxerto Tx>10anos

^e p<0,05 para doentes com DC do enxerto Tx<10anos versus doentes com DC do enxerto Tx>10anos

^f p<0,05 para doentes com função renal estável versus doentes com DC do enxerto Tx<10anos

4.2 EXPRESSÃO DE IMUNOGLOBULINAS DE SUPERFÍCIE NAS CÉLULAS B MEMÓRIA CD27⁺ E PLASMOBLASTOS

A avaliação da expressão de imunoglobulinas pelas células memória e pelos plasmoblastos nos diferentes grupos de estudo foi também objectivo deste trabalho.

Verificámos assim que, o grupo controlo apresentou a percentagem mais elevada de células memória a expressar IgM+ comparativamente ao grupo de doentes com função renal estável e ao grupo de doentes com DC e transplante há menos de 10 anos. Por outro lado, todos os grupos de doentes transplantados renais, apresentaram uma maior percentagem de células memória CD27+ a expressar IgG face ao grupo controlo.

Por último, ainda se verificou uma maior percentagem de células memória CD27+ a expressar IgA no grupo de doentes transplantados renais com função renal estável e no grupo de doentes com DC do enxerto e transplante há menos de 10 anos, comparativamente ao grupo com DC do enxerto e transplante há mais de 10 anos.

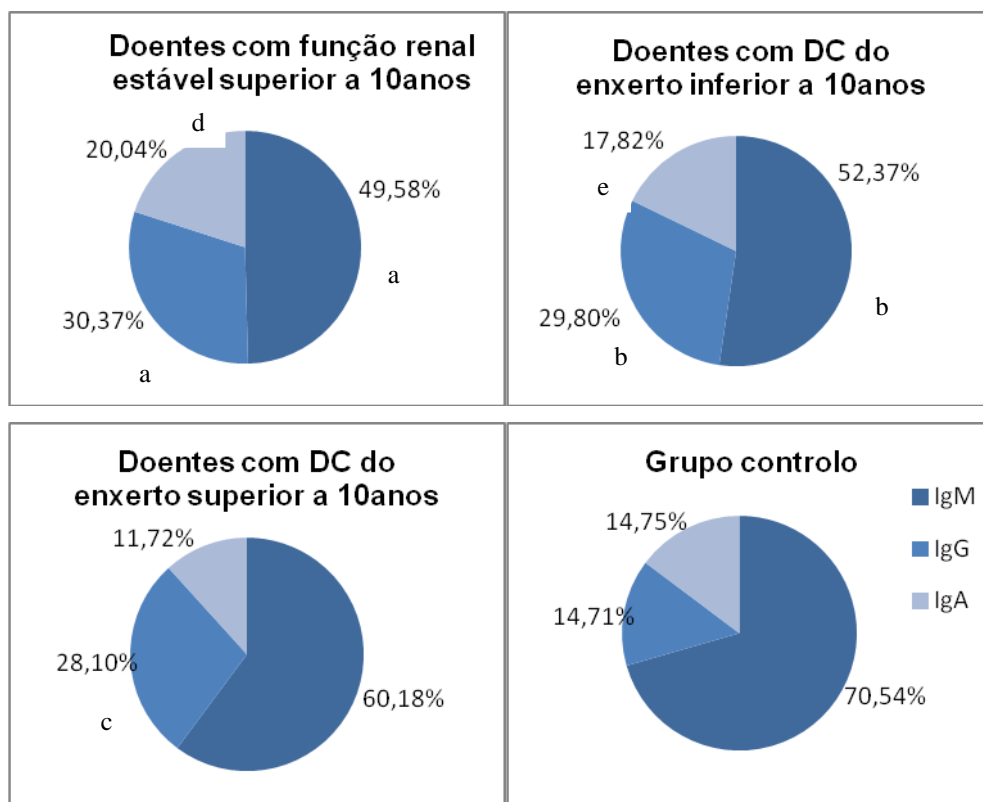


Ilustração 1- Gráfico de representação da frequência de células B memória CD27⁺ a expressar as distintas imunoglobulinas de superfície, nos diferentes grupos de estudo e grupo controlo.

^a p<0,05 para doentes com função renal estável versus grupo controlo

^b p<0,05 para doentes com disfunção crónica do enxerto Tx<10anos versus grupo controlo

^c p<0,05 para doentes com disfunção crónica do enxerto Tx>10 anos versus grupo controlo

^d p<0,05 para doentes com função renal estável versus doentes com DC do enxerto Tx>10anos

^e p<0,05 para doentes com DC do enxerto Tx<10anos versus doentes com DC do enxerto Tx>10anos

A análise comparativa da frequência de plasmoblastos a expressar as distintas imunoglobulinas entre os diferentes grupos de estudo, não apresentou qualquer resultado com significado estatístico. No entanto, verificou-se nos grupos de transplantados renais, bem como no de controlo, conforme esperado, que os plasmoblastos IgA+ são os mais representativos, seguidos daqueles a expressar IgM, e por fim IgG.

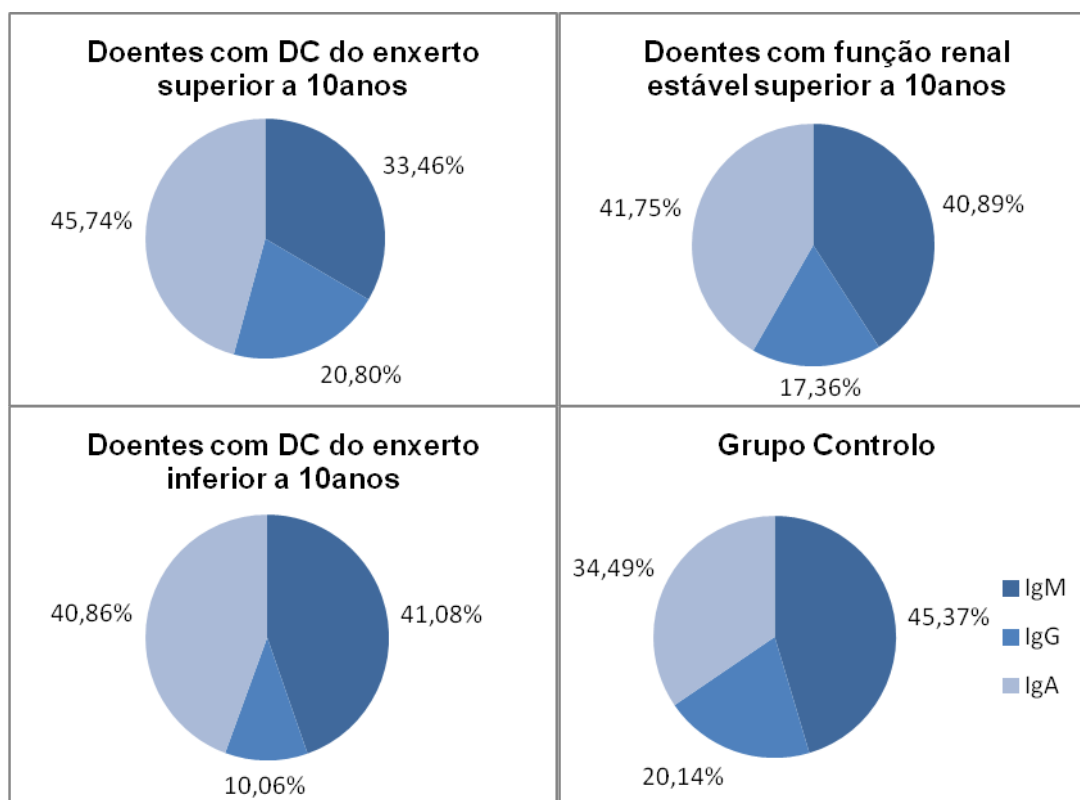


Ilustração 2 - Gráfico de representação da expressão de imunoglobulinas de superfície nos plasmoblastos do sangue periférico dos diferentes grupos de estudo e grupo controlo.

5. DISCUSSÃO

Apesar de haver um crescente interesse no papel desempenhado pelos linfócitos B, plasmoblastos e seus anticorpos associados na resposta imune ao enxerto ^[104], alguns mecanismos destas respostas imunes permanecem por esclarecer ^[97].

Neste estudo pretendeu-se quantificar as células B, suas subpopulações e plasmoblastos do sangue periférico de doentes transplantados renais, bem como estudar a expressão de imunoglobulinas de superfície nas diferentes subpopulações de células B memória (CD27+ e CD27-) e plasmoblastos.

Com base nos resultados obtidos, verificou-se que o número de linfócitos B totais tende a estar diminuído nos doentes transplantados renais, comparativamente ao grupo controlo, tal como o número total plasmoblastos do sangue periférico.

Comparando os resultados obtidos neste estudo, com os apresentados por *Newell et al* ^[105] verifica-se que estes autores obtiveram valores mais elevados de células B totais. No entanto, este estudo não tem a indicação da sobrevida do enxerto, e um dos seus grupos de estudo são doentes transplantados renais operacionalmente tolerantes, que apresentam função renal estável sem administração de imunossuppressores por pelo menos um ano. Podemos deduzir que a redução dos números absolutos de linfócitos B se deve ao uso de uma terapia de depleção de células B ou esplenectomia ^[104]. Também os valores absolutos de plasmoblastos do presente estudo, foram mais baixos que o grupo controlo, o que poderá dever-se a uma terapia de depleção de plasmoblastos ^[104]. Esta diminuição pode também dever-se à deterioração natural do sistema imunológico produzido pelo envelhecimento (imunossenescência) em indivíduos saudáveis ^[76].

Outro parâmetro analisado por citometria de fluxo no nosso estudo foram as percentagens de cada subpopulação referida, dentro das células B. Observou-se uma menor percentagem de células *naïve* nos grupos transplantados renais comparativamente ao grupo controlo. De forma semelhante, *Newell et al*, demonstrou menores frequências de células B *naïve* no grupo de doentes com função renal estável, mas submetido a imunossupressão comparativamente ao seu grupo controlo e ao grupo sem administração de imunossuppressores. Isto sugere, mais uma vez, que as drogas imunossupressoras levam a uma diminuição dos níveis celulares no sangue periférico^[34].

Comparando a distribuição das células B *naïve* e memória entre os 3 grupos de transplantados renais incluídos no nosso estudo, não foram encontradas diferenças

significativas. Estes resultados são apoiados por um estudo efectuado por *Zarkhin et al* ^[34] entre doentes tolerantes, estáveis e com rejeição crónica.

A maior representatividade de células B memória CD27⁻ a expressar IgG, comparativamente com aquelas a expressar IgA, é proporcional à observada em indivíduos saudáveis, sugerindo que estas células são pouco afectadas pelas condições subjacentes a um transplante renal.

Newell et al obtiveram valores mais elevados de células B memória CD27⁺/IgM⁺ nos grupos transplantados renais comparativamente com o grupo controlo. Importa referir que este tipo celular tem vindo a ser associado com a produção de citocina reguladora IL-10 ^[106]. No nosso estudo isto não se verificou, o que pode dever-se a uma terapêutica imunossupressora diferente ou a uma pequena amostragem relativamente ao grupo controlo.

Por fim, nos nossos 3 grupos de doentes em estudo verificou-se uma frequência elevada de plasmoblastos IgA+, tal como anteriormente referido em indivíduos saudáveis ^[76]. O subtipo de imunoglobulina mais expresso depois da IgA, foi a imunoglobulina IgM uma vez que nestes plasmoblastos IgM+ também se consideraram aqueles que não expressam qualquer imunoglobulina de superfície.

Relacionando os resultados obtidos nos nossos 3 grupos de estudo, o grupo com função renal estável é o que apresenta maior número absoluto de células B e plasmoblastos. Como os indivíduos tolerantes apresentam números elevados de células B totais, seria de esperar que fosse este o grupo com valores mais altos de células B totais. No entanto, também seria de esperar que este fosse o grupo com números mais elevados de células *naïve*, por estas células serem classificadas com baixa capacidade apresentadora de antígeno ^[107]. Antígenos apresentados pelas células B *naïve* têm vindo a induzir tolerância em animais ^[108] e recentemente mostraram estimular células T *naïve* a transformarem-se em células reguladoras em vez de células efectoras ^[109].

Importa ainda referir que o grupo com função renal estável e o grupo com disfunção renal, ambos com sobrevida do enxerto superior a 10 anos, apresentaram percentagens de plasmoblastos mais elevadas que o grupo controlo, enquanto o grupo com disfunção renal e transplante há menos de 10 anos apresentou uma percentagem mais baixa que o grupo controlo. Assim, podemos deduzir que com o aumento do tempo de sobrevida do enxerto os plasmoblastos tendem a aumentar a sua percentagem relativa. No entanto, os valores discrepantes entre os 2 grupos de doentes com disfunção renal crónica podem dever-se à pequena amostragem destes mesmos grupos: 46 indivíduos do grupo com

função renal estável versus 13 e 9 indivíduos dos grupos com disfunção crónica e transplante de rim há menos e há mais de 10 anos, respectivamente.

Tendo em conta o aumento percentual de células B e suas sub-populações em doentes com função renal estável Tx >10 anos, é importante frisar a possibilidade destas alterações constituírem uma consequência da tolerância ao enxerto, e não uma causa desta tolerância.

Existindo muitos poucos estudos que quantifiquem os linfócitos B e suas subpopulações em doentes transplantados renais, considera-se que os resultados discrepantes que se obtiveram são essencialmente devido a diferentes metodologias utilizadas, particularmente no que diz respeito aos marcadores de superfície usados, à selecção e divisão dos doentes, pré-tratamentos, tamanho da população em estudo e devido a situações e condições como a presença de alo-anticorpos no momento da transplantação, inflamação, episódios de rejeição aguda do enxerto, administração de drogas imunossupressoras e tempo de sobrevivência do enxerto.

6. CONCLUSÃO

Em suma, o cenário imunológico que aqui apresentamos sugere que as alterações nos valores absolutos e relativos das subpopulações de células B e plasmoblastos no sangue periférico possam ser característicos de doentes transplantados renais, particularmente relacionados com a terapêutica imunossupressora realizada, e reforçam o papel importante destas células na progressão da situação clínica face ao enxerto.

Devido à frequente individualização da terapia imunossupressora nos doentes transplantados renais, quer pela sua clínica e situação pré-transplante (sensibilização, por exemplo), torna-se difícil de definir com rigor grupos de estudos. Tendo isto em conta, estudos futuros abrangendo um maior número de doentes serão necessários para completar e consolidar as conclusões do presente trabalho, tendo em vista a descoberta de biomarcadores úteis no diagnóstico precoce da rejeição do enxerto e resposta ao tratamento, bem como a identificação de uma “assinatura” imunofenotípica da célula B associada a tolerância ao enxerto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Turgeon, N.A., A.D. Kirk, and N.N. Iwakoshi, *Differential effects of donor-specific alloantibody*. *Transplant Rev (Orlando)*, 2009. **23**(1): p. 25-33.
2. Sui, W., et al., *Microarray analysis of MicroRNA expression in acute rejection after renal transplantation*. *Transpl Immunol*, 2008. **19**(1): p. 81-5.
3. Fattahi, M.R., et al., *Patient and Graft Outcomes in Deceased-Donor Kidney Transplantation: A good Start for a Promising Future*. *Iranian journal of kidney diseases*, 2012. **6**(4): p. 291-4.
4. Keith, D.S., et al., *Effect of donor recipient age match on survival after first deceased donor renal transplantation*. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 2004. **15**(4): p. 1086-91.
5. Gonzalez-Roncero, F.M., et al., *Late evolution of kidney transplants in elderly donors and recipients receiving initial immunosuppressant treatment with daclizumab, mycophenolate mofetil, and delayed introduction of tacrolimus*. *Nefrologia*, 2012. **32**(4): p. 446-454.
6. Chavez, H., et al., *Absence of CD4CD25 regulatory T cell expansion in renal transplanted patients treated in vivo with Belatacept mediated CD28-CD80/86 blockade*. *Transpl Immunol*, 2007. **17**(4): p. 243-8.
7. Takeda, A., et al., *Acute humoral rejection of kidney allografts in patients with a positive flow cytometry crossmatch (FCXM)*. *Clinical transplantation*, 2000. **14 Suppl 3**: p. 15-20.
8. Sagiroglu, T., et al., *Is flow cytometry crossmatch analysis using sera with different dilutions important for pretransplant analysis? A case report*. *Transplant Proc*, 2012. **44**(6): p. 1767-9.
9. Krichen, H., et al., *CD86 +1057G>A polymorphism and susceptibility to acute kidney allograft rejection*. *Iranian journal of kidney diseases*, 2011. **5**(3): p. 187-93.
10. Port, F.K., et al., *Trends and results for organ donation and transplantation in the United States, 2004*. *Am J Transplant*, 2005. **5**(4 Pt 2): p. 843-9.
11. McCullough, K.P., et al., *Kidney and pancreas transplantation in the United States, 1998-2007: access for patients with diabetes and end-stage renal disease*. *Am J Transplant*, 2009. **9**(4 Pt 2): p. 894-906.
12. Becker, B.N., et al., *Using renal transplantation to evaluate a simple approach for predicting the impact of end-stage renal disease therapies on patient survival: observed/expected life span*. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 2000. **35**(4): p. 653-9.
13. Kieran, N., K. Muczynski, and V.V. Gadi, *Novel diagnostics in renal transplantation*. *Chimerism*, 2010. **1**(2): p. 69-73.
14. Mas, V.R., et al., *Identifying biomarkers as diagnostic tools in kidney transplantation*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2011. **11**(2): p. 183-96.
15. Baek, C.H., et al., *Infectious risks and optimal strength of maintenance immunosuppressants in rituximab-treated kidney transplantation*. *Nephron Extra*, 2012. **2**(1): p. 66-75.
16. Linares, L., et al., *Infection-related mortality in a large cohort of renal transplant recipients*. *Transplant Proc*, 2007. **39**(7): p. 2225-7.
17. Helal, I. and L. Chan, *Steroid and calcineurin inhibitor-sparing protocols in kidney transplantation*. *Transplant Proc*, 2011. **43**(2): p. 472-7.
18. Murphy, S.P., P.M. Porrett, and L.A. Turka, *Innate immunity in transplant tolerance and rejection*. *Immunol Rev*, 2011. **241**(1): p. 39-48.
19. Barrington, R., et al., *The role of complement in inflammation and adaptive immunity*. *Immunol Rev*, 2001. **180**: p. 5-15.
20. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. Second of two parts*. *The New England journal of medicine*, 2000. **343**(2): p. 108-17.
21. McKay, D.B., *The role of innate immunity in donor organ procurement*. *Semin Immunopathol*, 2011. **33**(2): p. 169-84.
22. Game, D.S. and R.I. Lechler, *Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance*. *Transpl Immunol*, 2002. **10**(2-3): p. 101-8.
23. Seetharam, A., V. Tiriveedhi, and T. Mohanakumar, *Alloimmunity and autoimmunity in chronic rejection*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2010. **15**(4): p. 531-6.
24. Bharat, A. and T. Mohanakumar, *Allopeptides and the alloimmune response*. *Cell Immunol*, 2007. **248**(1): p. 31-43.
25. Hachem, R.R., *Lung allograft rejection: diagnosis and management*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2009. **14**(5): p. 477-82.

26. Heeger, P.S., *T-cell allorecognition and transplant rejection: a summary and update*. Am J Transplant, 2003. **3**(5): p. 525-33.
27. Suchin, E.J., et al., *Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 973-81.
28. Barnett, N., A. Dorling, and N. Mamode, *B cells in renal transplantation: pathological aspects and therapeutic interventions*. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(3): p. 767-74.
29. 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*. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 2004. **4**(3): p. 378-83.
30. Kirk, A.D., N.A. Turgeon, and N.N. Iwakoshi, *B cells and transplantation tolerance*. Nat Rev Nephrol, 2010. **6**(10): p. 584-93.
31. Cecka, J.M., Q. Zhang, and E.F. Reed, *Preformed cytotoxic antibodies in potential allograft recipients: recent data*. Hum Immunol, 2005. **66**(4): p. 343-9.
32. Bach, F.H., et al., *Accommodation: a working paradigm for progressing toward clinical discordant xenografting*. Transplant Proc, 1991. **23**(1 Pt 1): p. 205-7.
33. Solez, K., et al., *Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions*. Am J Transplant, 2008. **8**(4): p. 753-60.
34. Zarkhin, V., G. Chalasani, and M.M. Sarwal, *The yin and yang of B cells in graft rejection and tolerance*. Transplant Rev (Orlando), 2010. **24**(2): p. 67-78.
35. Puttarajappa, C., R. Shapiro, and H.P. Tan, *Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review*. J Transplant, 2012. **2012**: p. 193724.
36. Zhang, Q., et al., *Development of posttransplant antidonor HLA antibodies is associated with acute humoral rejection and early graft dysfunction*. Transplantation, 2005. **79**(5): p. 591-8.
37. Terasaki, P. and K. Mizutani, *Antibody mediated rejection: update 2006*. Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN, 2006. **1**(3): p. 400-3.
38. Trpkov, K., et al., *Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody, Analysis using the Banff grading schema*. Transplantation, 1996. **61**(11): p. 1586-92.
39. Feucht, H.E. and M.J. Mihatsch, *Diagnostic value of C4d in renal biopsies*. Current opinion in nephrology and hypertension, 2005. **14**(6): p. 592-8.
40. Sun, Q., et al., *The prevalence of immunologic injury in renal allograft recipients with de novo proteinuria*. PloS one, 2012. **7**(5): p. e36654.
41. Fotheringham, J., C.A. Angel, and W. McKane, *Transplant glomerulopathy: morphology, associations and mechanism*. Nephron Clin Pract, 2009. **113**(1): p. c1-7; discussion c7.
42. Mengel, M., et al., *Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection*. Am J Transplant, 2012. **12**(3): p. 563-70.
43. Lefaucheur, C., et al., *Determinants of poor graft outcome in patients with antibody-mediated acute rejection*. Am J Transplant, 2007. **7**(4): p. 832-41.
44. Koch, C.A., Z.I. Khalpey, and J.L. Platt, *Accommodation: preventing injury in transplantation and disease*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5143-8.
45. Narayanan, K., et al., *HLA class I antibody mediated accommodation of endothelial cells via the activation of PI3K/cAMP dependent PKA pathway*. Transpl Immunol, 2006. **15**(3): p. 187-97.
46. Colvin, R.B., *Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2007. **18**(4): p. 1046-56.
47. Lee, C.Y., et al., *The involvement of FcR mechanisms in antibody-mediated rejection*. Transplantation, 2007. **84**(10): p. 1324-34.
48. Massy, Z.A., et al., *Chronic renal allograft rejection: immunologic and nonimmunologic risk factors*. Kidney international, 1996. **49**(2): p. 518-24.
49. Racusen, L.C., et al., *The Banff 97 working classification of renal allograft pathology*. Kidney international, 1999. **55**(2): p. 713-23.
50. Hertig, A., et al., *Early epithelial phenotypic changes predict graft fibrosis*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2008. **19**(8): p. 1584-91.
51. Burns, A.M., et al., *Memory alloreactive B cells and alloantibodies prevent anti-CD154-mediated allograft acceptance*. J Immunol, 2009. **182**(3): p. 1314-24.
52. Niethammer, D., J. Kummerle-Deschner, and G.E. Dannecker, *Side-effects of long-term immunosuppression versus morbidity in autologous stem cell rescue: striking the balance*. Rheumatology (Oxford), 1999. **38**(8): p. 747-50.

53. Heeger, P.S. and R. Dinavahi, *Transplant immunology for non-immunologist*. The Mount Sinai journal of medicine, New York, 2012. **79**(3): p. 376-87.
54. Koyama, I., et al., *Depletion of CD8 memory T cells for induction of tolerance of a previously transplanted kidney allograft*. Am J Transplant, 2007. **7**(5): p. 1055-61.
55. Nagasawa, T., *Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 107-16.
56. Garside, P., et al., *Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node*. Science, 1998. **281**(5373): p. 96-9.
57. Allen, C.D., T. Okada, and J.G. Cyster, *Germinal-center organization and cellular dynamics*. Immunity, 2007. **27**(2): p. 190-202.
58. McHeyzer-Williams, L.J. and M.G. McHeyzer-Williams, *Antigen-specific memory B cell development*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 487-513.
59. Acosta-Rodriguez, E.V., et al., *Cytokines and chemokines shaping the B-cell compartment*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(1-2): p. 73-83.
60. van Lochem, E.G., et al., *Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts*. Cytometry B Clin Cytom, 2004. **60**(1): p. 1-13.
61. Tangye, S.G. and D.M. Tarlinton, *Memory B cells: effectors of long-lived immune responses*. Eur J Immunol, 2009. **39**(8): p. 2065-75.
62. Radbruch, A., et al., *Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 741-50.
63. Cuss, A.K., et al., *Expansion of functionally immature transitional B cells is associated with human-immunodeficient states characterized by impaired humoral immunity*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1506-16.
64. Sims, G.P., et al., *Identification and characterization of circulating human transitional B cells*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4390-8.
65. Lee, J., et al., *Identification and characterization of a human CD5+ pre-naive B cell population*. J Immunol, 2009. **182**(7): p. 4116-26.
66. Mackay, F. and J.L. Browning, *BAFF: a fundamental survival factor for B cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(7): p. 465-75.
67. Mond, J.J., et al., *T cell independent antigens*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(3): p. 349-54.
68. Cerutti, A. and M. Rescigno, *The biology of intestinal immunoglobulin A responses*. Immunity, 2008. **28**(6): p. 740-50.
69. Weill, J.C., S. Weller, and C.A. Reynaud, *Human marginal zone B cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 267-85.
70. Caraux, A., et al., *Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells*. Haematologica. **95**(6): p. 1016-20.
71. Mei, H.E., et al., *Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses*. Blood, 2009. **113**(11): p. 2461-9.
72. Odendahl, M., et al., *Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1614-21.
73. Marie-Cardine, A., et al., *Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation*. Clin Immunol, 2008. **127**(1): p. 14-25.
74. Waddick, K.G. and F.M. Uckun, *CD5 antigen-positive B lymphocytes in human B cell ontogeny during fetal development and after autologous bone marrow transplantation*. Exp Hematol, 1993. **21**(6): p. 791-8.
75. Blair, P.A., et al., *CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients*. Immunity. **32**(1): p. 129-40.
76. Perez-Andres, M., et al., *Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic*. Cytometry B Clin Cytom, 2010. **78 Suppl 1**: p. S47-60.
77. Ahmed, R. and D. Gray, *Immunological memory and protective immunity: understanding their relation*. Science, 1996. **272**(5258): p. 54-60.
78. Klein, U., K. Rajewsky, and R. Kuppers, *Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes:*

- CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med*, 1998. **188**(9): p. 1679-89.
79. Tangye, S.G., et al., *Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27*. *J Exp Med*, 1998. **188**(9): p. 1691-703.
 80. Agematsu, K., et al., *B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production*. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(8): p. 2073-9.
 81. van Zelm, M.C., et al., *Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion*. *J Exp Med*, 2007. **204**(3): p. 645-55.
 82. Seifert, M. and R. Kuppers, *Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM+(IgD+)CD27+ B cells and the dynamics of memory B cell generation*. *J Exp Med*, 2009. **206**(12): p. 2659-69.
 83. Weller, S., et al., *Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire*. *Blood*, 2004. **104**(12): p. 3647-54.
 84. Weller, S., et al., *CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(3): p. 1166-70.
 85. Agematsu, K., et al., *Absence of IgD-CD27(+) memory B cell population in X-linked hyper-IgM syndrome*. *J Clin Invest*, 1998. **102**(4): p. 853-60.
 86. MacLennan, I.C., *Germinal centers*. *Annu Rev Immunol*, 1994. **12**: p. 117-39.
 87. Ma, C.S., et al., *Selective generation of functional somatically mutated IgM+CD27+, but not Ig isotype-switched, memory B cells in X-linked lymphoproliferative disease*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(2): p. 322-33.
 88. Good, K.L., D.T. Avery, and S.G. Tangye, *Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells*. *J Immunol*, 2009. **182**(2): p. 890-901.
 89. Cagigi, A., et al., *CD27(-) B-cells produce class switched and somatically hyper-mutated antibodies during chronic HIV-1 infection*. *PloS one*, 2009. **4**(5): p. e5427.
 90. Fecteau, J.F., G. Cote, and S. Neron, *A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation*. *J Immunol*, 2006. **177**(6): p. 3728-36.
 91. Wei, C., et al., *A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus*. *J Immunol*, 2007. **178**(10): p. 6624-33.
 92. Brandtzaeg, P. and F.E. Johansen, *Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties*. *Immunol Rev*, 2005. **206**: p. 32-63.
 93. Chen, K., et al., *Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(8): p. 889-98.
 94. Aurrant-Schlein, T., et al., *Identification of a new monoclonal B-cell subset in unaffected first-degree relatives in familial chronic lymphocytic leukemia*. *Leukemia*, 2005. **19**(12): p. 2339-41.
 95. Cheng, J., et al., *Ectopic B-cell clusters that infiltrate transplanted human kidneys are clonal*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(14): p. 5560-5.
 96. Valujskikh, A., W.M. Baldwin, 3rd, and R.L. Fairchild, *Recent progress and new perspectives in studying T cell responses to allografts*. *Am J Transplant*, 2010. **10**(5): p. 1117-25.
 97. DiLillo, D.J., et al., *B lymphocytes differentially influence acute and chronic allograft rejection in mice*. *J Immunol*, 2011. **186**(4): p. 2643-54.
 98. Parsons, R.F., et al., *Primary B cell repertoire remodeling to achieve humoral transplantation tolerance*. *Semin Immunol*, 2012. **24**(2): p. 109-14.
 99. Parsons, R.F., et al., *B-lymphocyte homeostasis and BLyS-directed immunotherapy in transplantation*. *Transplant Rev (Orlando)*, 2010. **24**(4): p. 207-21.
 100. DiLillo, D.J., K. Yanaba, and T.F. Tedder, *B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice*. *J Immunol*, 2010. **184**(7): p. 4006-16.
 101. Yanaba, K., et al., *B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease*. *Immunol Rev*, 2008. **223**: p. 284-99.
 102. Ng, Y.H., et al., *B cells help alloreactive T cells differentiate into memory T cells*. *Am J Transplant*, 2010. **10**(9): p. 1970-80.
 103. Li, Y., et al., *Long-term control of alloreactive B cell responses by the suppression of T cell help*. *J Immunol*, 2008. **180**(9): p. 6077-84.

104. Clatworthy, M.R., *Targeting B cells and antibody in transplantation*. Am J Transplant, 2011. **11**(7): p. 1359-67.
105. Newell, K.A., et al., *Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans*. J Clin Invest, 2010. **120**(6): p. 1836-47.
106. Cappione, A.J., et al., *Lupus IgG VH4.34 antibodies bind to a 220-kDa glycoform of CD45/B220 on the surface of human B lymphocytes*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4298-307.
107. Epstein, M.M., et al., *Successful T cell priming in B cell-deficient mice*. The Journal of experimental medicine, 1995. **182**(4): p. 915-22.
108. Fuchs, E.J. and P. Matzinger, *B cells turn off virgin but not memory T cells*. Science, 1992. **258**(5085): p. 1156-9.
109. Reichardt, P., et al., *Naive B cells generate regulatory T cells in the presence of a mature immunologic synapse*. Blood, 2007. **110**(5): p. 1519-29.