

# MONITORIZAÇÃO IMUNOLÓGICA NO TRANSPLANTE RENAL

## *Immunological Monitoring in Kidney Transplantation*

Erika Lamkowski Naka, Niels Olsen Saraiva Camara

### RESUMO

O transplante renal é, atualmente, a melhor alternativa de tratamento para a doença renal crônica em estágio avançado. Melhorias na avaliação imunológica pré-transplante, como o emprego rotineiro de testes para identificação de anticorpos anti-HLA no soro do receptor, possibilitaram a identificação de pacientes com alto risco imunológico, com maior chance de rejeição ao enxerto e permitiram melhor alocação dos órgãos doados. Paralelamente, a disponibilidade de novas medicações imunossupressoras aumentou a gama de opções para o tratamento após o transplante. Esses dois fatores foram os responsáveis pelo grande sucesso dos programas de Transplante Renal em curto prazo, tornando possível o transplante entre indivíduos não aparentados com uma incidência de rejeição aguda satisfatória. No entanto, os resultados em longo prazo permanecem abaixo do desejado. Um dos principais problemas enfrentados pelo nefrologista atualmente é avaliar, de maneira confiável, o grau de imunossupressão de cada paciente. A reatividade imunológica contra o enxerto, presente em diferentes graus durante todo o período após o transplante, permanece pouco acessível pelos exames de rotina disponíveis. Os métodos diagnósticos atuais não são capazes de identificar as diferentes variações dessa reatividade, que é bastante heterogênea, compreendendo um amplo espectro que varia de rejeição a tolerância. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de ensaios voltados para a monitorização imunológica após o transplante renal, os quais possibilitariam o diagnóstico precoce de eventos deletérios ao enxerto, além de melhor individualização da terapia imunossupressora.

**Descritores:** Monitorização Imunológica; Transplante Renal; Rejeição de enxerto.

### INTRODUÇÃO

O transplante renal tornou-se o tratamento de escolha para a Doença Renal Crônica, pois resulta em maior sobrevida e melhor qualidade de vida quando comparado à hemodiálise.<sup>1</sup> Atualmente, esse tratamento é oferecido para a grande maioria dos pacientes com disfunção renal crônica em estágio V, salvo algumas poucas contra-indicações absolutas. O desenvolvimento de drogas imunossupressoras potentes e de amplo espectro possibilitou a realização de transplante entre indivíduos geneticamente distintos, com taxas de rejeição aguda bastante aceitáveis. Além disso, esses fármacos modificaram a apresentação da rejeição: os sinais e sintomas clínicos (febre, dor no enxerto e oligúria) que antes estavam presentes em quase todos os episódios de rejeição, atualmente estão evidentes somente em uma pequena parcela dos pacientes.<sup>2</sup>

Todavia, apesar desses resultados favoráveis em curto prazo, tanto a sobrevida do enxerto quanto a do receptor declinam progressivamente com o passar dos anos.<sup>3</sup> As causas dessa redução são multifatoriais e envolvem tanto mecanismos imunológicos quanto não imunológicos. Dessa maneira, uma resposta imunológica de baixa intensidade contra o enxerto pode resultar em um dano lento e progressivo ao órgão transplantado. Por outro lado, uma imunossupressão em excesso está associada a efeitos adversos importantes, que contribuem para a redução da sobrevida, tanto do enxerto quanto do receptor.<sup>4</sup>

---

#### Instituição:

<sup>1</sup> Departamento de Medicina, Disciplina de Nefrologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

#### Correspondência:

Erika Lamkowski Naka

Rua Botucatu, 740, 2º andar, CEP 04023-900 - São Paulo/SP

Telefone: (11) 5904-1699

E-mail: erikalnaka@gmail.com

Recebido em: 05/12/2011

Aceito em: 15/01/2012

### Avaliação da função do enxerto renal

Atualmente, o exame utilizado para avaliar a função do enxerto renal é a creatinina sérica, cujas vantagens são seu baixo custo, fácil execução e rapidez do resultado. No entanto, trata-se de um marcador com baixa sensibilidade e especificidade, ou seja, além das alterações na creatinina ocorrerem tardiamente no processo de agressão ao rim transplantado, esse exame não contribui para diagnóstico diferencial das diversas causas de disfunção do enxerto renal.<sup>5</sup>

Atualmente, esse diagnóstico diferencial somente é possível através da análise histomorfológica de uma amostra do enxerto, obtida através de uma biópsia percutânea. Na maioria dos centros transplantadores, essa biópsia é realizada quando é detectada uma elevação igual ou superior a 30% na creatinina sérica. Trata-se de um exame invasivo, com potenciais riscos ao paciente e que depende de um patologista experiente para o diagnóstico acurado. Ainda, como esse diagnóstico baseia-se em alterações morfológicas, o exame anatomopatológico de um fragmento de enxerto renal não é capaz de diferenciar entre os diversos mecanismos imunológicos que estão atuantes durante uma agressão ao enxerto.<sup>6</sup>

### Monitorização da imunossupressão

A dose dos medicamentos imunossupressores é atualmente ajustada seguindo parâmetros de farmacocinética da droga, ou seja, através dos níveis sanguíneos. Esses testes são importantes para a detecção de níveis fora do alvo terapêutico, que podem resultar tanto em um aumento da toxicidade, quando muito elevados, ou em aumento do risco de rejeição aguda, quando baixos. No entanto, além de não estarem disponíveis para todos os fármacos, esses testes não são capazes de aferir as ações biológicas dos agentes imunossupressores. Isso significa que um mesmo nível sanguíneo pode traduzir-se em uma imunossupressão deficiente para um indivíduo e excessiva para outro.<sup>7</sup>

Dessa maneira, o desenvolvimento de testes para a monitorização do status imunológico do receptor, capazes de detectar uma resposta imune contra o aloenxerto antes do desenvolvimento da lesão tecidual, ou seja, antes de alterações morfológicas visíveis na biópsia, faz-se necessário. Isso possibilitaria melhor individualização da terapia imunossupressora e, conseqüentemente, melhores resultados em longo prazo.

Atualmente, não dispomos de um método prático e confiável para mensurar o estado de ativação/supressão do sistema imune do receptor. Idealmente, a monitorização imunológica deve basear-se em testes pouco trabalhosos, de baixo custo e altamente reprodutíveis, capazes de avaliar grande variabilidade de respostas ao aloenxerto, proporcionando assim mais segurança nos ajustes das drogas imunossupressoras, e possivelmente identificando pacientes com tolerância imunológica, para os quais essas drogas poderiam ser suspensas sem causar danos ao órgão transplantado.<sup>8</sup>

### Perspectivas da monitorização imunológica

A busca por ensaios passíveis de monitorar a resposta imune ao aloenxerto resultou no desenvolvimento de alguns testes com resultados promissores. Esses ensaios podem ser divididos em antígenos específicos, quando avaliam a aloreatividade específica contra o doador, ou antígenos inespecíficos, que procuram identificar padrões fenotípicos ou genotípicos associados a diferentes condições da resposta ao aloenxerto. Entre os ensaios antígenos específicos, temos o ELISPOT e a pesquisa de anticorpos doador específicos; entre os não específicos podemos citar o RT-PCR em tempo real, o Immuknow®, a pesquisa da fração solúvel da molécula CD30 e a citometria de fluxo. Dois desses exames já estão sendo utilizados por diversos grupos como parte da monitorização imunológica pós-transplante: a pesquisa de anticorpos doador específicos e o Immuknow®.<sup>9,10</sup>

### Pesquisa de Anticorpos Doador Específicos

A forte correlação entre anticorpos contra antígenos HLA pré-existentes do doador e a ocorrência de rejeição hiperaguda já está muito bem estabelecida, de modo que toda a avaliação imunológica pré-transplante atual é realizada visando a detecção de tais anticorpos. Inicialmente descrito em 1969 por Patel e Terasaki, a prova cruzada realizada pelo método de citotoxicidade dependente de complemento é utilizada até o presente, com apenas algumas modificações, para a detecção desses anticorpos deletérios. Quando positivo, esse ensaio revela a presença, no soro do receptor, de anticorpos contra antígenos do doador, o que contraindica a realização do transplante renal.<sup>11</sup>

Tecnologias mais modernas permitem atualmente a identificação das especificidades HLA dos anticorpos detectados com maior sensibilidade e especificidade. A citometria de fluxo (descrita em mais detalhes posteriormente) pode ser utilizada tanto para a realização de prova cruzada (FCX) quanto para quantificar os anticorpos anti-HLA presentes no soro do receptor, sejam eles doadores específicos ou não (FlowPRA).<sup>12</sup> O LUMINEX é um ensaio de fase sólida bastante sensível, capaz de detectar anticorpos em baixos títulos contra ampla gama de especificidades HLA. Para tanto, microesferas que diferem entre si por suas colorações estão ligadas a antígenos HLA, de modo que cada microesfera representa um antígeno específico. Se no soro em teste houver anticorpos anti-HLA, eles se ligarão aos antígenos e serão detectados após a adição de um marcador secundário, o qual emitirá uma fluorescência que, em conjunto com o sinal emitido pela microesfera, revelará a presença daquele anticorpo.<sup>13</sup> Através do LUMINEX, anticorpos pré-formados presentes em títulos baixos, que não podem ser demonstrados por CDC, mas que estão relacionados à pior sobrevida do enxerto são detectados. Os resultados são fornecidos em MFI (Median Fluorescence Intensity) e, atualmente, não há consenso sobre qual é o melhor valor de corte para esse parâmetro, sendo que diferentes centros de transplante adotam diferentes valores.<sup>14</sup>

A importância dos anticorpos doador específicos identificados após a realização do transplante renal também tem sido extensivamente avaliada. Em 1990, Halloran e col. identificaram, numa coorte de 400 receptores, quatro indivíduos com disfunção grave do enxerto e padrão histológico “atípico” nos quais a prova cruzada por CDC, negativa antes do transplante, tornou-se positiva após a realização do mesmo. Posteriormente, os mesmos autores demonstraram, num estudo prospectivo com 69 pacientes, que a detecção, por microlinfocitotoxicidade, de anticorpos *de novo* está relacionada à maior incidência e severidade dos episódios de rejeição.<sup>15,16</sup>

Outros grupos também demonstraram a correlação entre a detecção de anticorpos anti HLA no pós-transplante com a ocorrência de rejeição crônica e um risco elevado de perda do enxerto em longo prazo.<sup>17,18</sup> Adicionalmente, Zangh e colaboradores demonstraram uma forte correlação entre anticorpos específicos contra antígenos HLA do doador (DSA) e rejeição humoral e Worthington e col. num estudo caso-controle demonstraram a relação entre a detecção de DSA contra antígenos HLA de classes I e II após o transplante com pior sobrevida do enxerto em um tempo médio de cinco anos.<sup>19-20</sup> Atualmente, a identificação de DSA é um dos critérios utilizados para o diagnóstico de lesão mediada por anticorpos.<sup>21</sup>

### Immuknow

Atualmente, o teste denominado Cylex ImmuKnow® é o único ensaio aprovado pelo FDA para a detecção da imunidade mediada por células em receptores no período pós-transplante. O princípio desse ensaio baseia-se na detecção da produção de ATP decorrente da proliferação de linfócitos T CD4+ auxiliares, obtidos do sangue periférico do receptor, em resposta a um mitógeno (fitohemoaglutinina). Com base na liberação de ATP, os indivíduos são classificados em respondedores fortes, intermediários e

fracos. Estudos iniciais sugeriram que indivíduos com baixa produção de ATP estariam mais sujeitos a infecções enquanto a produção elevada estaria relacionada à ocorrência de rejeição.<sup>22</sup> Aparentemente, a melhor aplicabilidade desse teste parece ser a identificação de pacientes com excesso de imunossupressão (baixos respondedores), o que se correlacionou com aumento do risco de infecção e mortalidade mais elevada.<sup>23,24</sup> Todavia, um estudo mais recente demonstrou que a realização desse ensaio uma única vez não foi capaz de prever de forma acurada episódios de rejeição aguda ou de infecções oportunistas nos 90 dias subsequentes.<sup>25</sup> Esse teste é a primeira tentativa de mensuração da reatividade imunológica em indivíduos imunossuprimidos, no entanto, apresenta algumas limitações importantes como a restrição a uma subpopulação linfocitária (células T CD4 auxiliares), não avalia a resposta imune específica contra o doador e apresenta, frequentemente, sobreposição de resultados, impedindo, assim, a distinção entre os riscos de infecção ou rejeição.

### sCD30

É um membro da superfamília de receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNF), expresso em uma grande variedade de células do sistema imune. O CD30 solúvel (sCD30) é a forma solúvel da molécula CD30 produzida pela clivagem proteolítica da molécula ligada à membrana celular frente a diversos estímulos. Essa forma solúvel, liberada na corrente sanguínea após a ativação de células imunes CD30+, pode ser mensurada pelo método de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). O primeiro estudo clínico com esse biomarcador identificou, em uma coorte de 844 indivíduos, aumento do risco de rejeição aguda e perda do enxerto naqueles com níveis mais elevados de sCD30 no soro pré-transplante.<sup>26</sup> Posteriormente, em estudo com um número reduzido de pacientes, os níveis de sCD30 correlacionaram-se com a sobrevida do enxerto renal em cinco anos.<sup>27</sup> Entretanto, um estudo subsequente demonstrou grande variabilidade dos níveis de sCD30 em amostras obtidas de pacientes na lista de espera para transplante renal, coletadas a cada três meses.<sup>28</sup> Além disso, outras patologias que envolvem o sistema imunológico, como infecções bacterianas, podem causar elevações nos níveis dessa molécula.<sup>29</sup> No estudo mais recente envolvendo esse biomarcador, medidas pré e pós-transplante foram realizadas em mais de 2000 receptores de transplante renal. O principal achado desse estudo foi de que níveis de sCD30 no trigésimo dia pós-operatório iguais ou superiores a 40 U/mL estavam correlacionados à pior sobrevida do enxerto.<sup>30</sup>

### ELISPOT

A produção de citocinas por células T efetoras ou de memória frente a um estímulo específico pode ser detectada por meio de ELISPOT (Enzyme Linked Immunoabsorbent Spot). Trata-se de um ensaio bastante sensível, concebido para detectar a produção de proteínas (citocinas ou anticorpos) por uma única célula, numa frequência de até 1 para 100.000. Outra vantagem do ELISPOT é a possibilidade de avaliação da reatividade celular específica do receptor contra o doador, através do uso de células obtidas do sangue ou baço do doador como estímulo. Os primeiros estudos utilizando esse ensaio demonstraram uma correlação entre a frequência elevada de células produtoras de IFN $\gamma$  com episódios de rejeição aguda e creatinina mais elevada no curto prazo.<sup>31,32</sup> Num estudo subsequente, Bestard e col. avaliaram a aloreatividade celular também através da produção de IFN- $\gamma$  no ELISPOT em receptores renais com mais de dois anos de transplante. Esse estudo avaliou tanto a aloreatividade direta, usando células inteiras do doador, a qual se correlacionou com pior função do enxerto renal, quanto a indireta, usando fragmentos de membrana celular como estímulo, que estava relacionada à proteinúria. Ainda, outro estudo demonstrou que o ELISPOT pode auxiliar na individualização da imunossupressão.<sup>33</sup> A limitação da necessidade de células do

doador para o estudo de aloreatividade pode ser transpassada pelo emprego de peptídeos sintéticos, como demonstrado por Najafian e col. Nesse estudo, células isoladas do sangue periférico do receptor foram estimuladas por peptídeos sintéticos baseados nas tipagens HLA mais frequentes, encontradas na população de doadores renais daquele serviço.<sup>34</sup> Em modelos de transplante de primatas não humanos, o ELISPOT já está sendo utilizado com sucesso para a detecção de tolerância doador específica.<sup>35</sup>

### Análise de Transcritos gênicos:

A técnica da Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Real Time RT-PCR) é uma ferramenta importante para estudos de biologia molecular. Por essa técnica, pequenas sequências de RNA mensageiro (mRNA) são reversamente transcritas em uma fita única de DNA complementar (cDNA), a qual servirá de base para a confecção dos produtos da amplificação (amplicons). No Real Time RT-PCR a quantificação desses produtos é feita ciclo a ciclo, por meio de detecção da fluorescência liberada por um repórter. O sinal aumenta na proporção direta da quantidade de produtos formados na reação. Essa técnica tem sido bastante utilizada para a análise de inúmeros genes relacionados à resposta imunológica em amostras de sangue, urina e tecido do enxerto renal.

Vasconcelos e col. demonstraram que moléculas relacionadas à atividade citotóxica de células T, como a granzima B, a perforina e o FasL encontram-se elevadas no sangue periférico durante a rejeição aguda.<sup>36</sup> Em estudo longitudinal com 67 pacientes, Simon T e col. demonstraram que a perforina e granzima B podem aumentar mesmo alguns dias antes do diagnóstico clínico de rejeição, sugerindo que alguns transcritos relacionados à resposta imune mediada por células T são potenciais candidatos a biomarcadores, capazes de diagnosticar eventos imunológicos adversos antes mesmo do estabelecimento de uma lesão no enxerto.<sup>37</sup> Adicionalmente, os níveis de mRNA de algumas citocinas, como IL-4, IL-5, IL-6 e IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , também mostraram-se elevados durante ou antes do diagnóstico de rejeição. No entanto, estudos subsequentes não foram capazes de confirmar esses achados.<sup>38,39</sup> Essa disparidade entre os estudos pode ser um reflexo das diferenças entre os protocolos empregados, bem como de disparidades da reação imunológica entre diferentes indivíduos.<sup>40</sup>

No transplante renal, a monitorização imunológica através da análise de transcritos gênicos em amostras de urina é uma opção bastante interessante, por tratar-se de amostras de fácil obtenção, sem riscos ao paciente e com grande potencial para refletir de maneira fidedigna as alterações intraenxerto. Análises da urina de pacientes durante um episódio de rejeição aguda demonstraram alterações nos níveis de transcritos gênicos relacionados tanto à resposta imune citotóxica quanto à resposta imune moduladora.<sup>41,42</sup> Num estudo que incluiu amostras de urina de um total de 83 pacientes submetidos à biópsia renal com os diagnósticos de rejeição aguda, nefropatia crônica do enxerto e biópsia normal, Muthukumar e col. detectaram maior expressão do fator de transcrição FOXP3 em sedimento urinário de pacientes com rejeição, sendo que níveis elevados desses transcritos estavam correlacionados a menor creatinina sérica durante o episódio de rejeição e melhor recuperação da função renal após o tratamento. Como o FOXP3 é altamente expresso em linfócitos T reguladores CD4+CD25+, esse dado sugere que a presença dessas células no enxerto renal, durante um episódio de rejeição aguda, detectada pela análise do sedimento urinário, pode estar modulando a resposta imune contra o aloenxerto.<sup>43</sup> De maneira semelhante, Manfro e col. pesquisaram a presença do transcrito gênico da molécula Tim-3, relacionada à modulação da resposta imune principalmente do tipo Th1, em amostras de sangue, urina e tecido do enxerto renal, e demonstraram grande correlação na expressão desse gene nos três compartimentos analisados, além do alto valor

preditivo negativo para o diagnóstico de rejeição aguda.<sup>44</sup>

Embora esses outros estudos tivessem demonstrado correlação entre diversos transcritos gênicos com rejeição aguda diagnosticada por biópsia, outras patologias, como a necrose tubular aguda ou infecção do trato urinário, também podem alterar a expressão dessas moléculas.<sup>45</sup> Adicionalmente, a grande variabilidade nos níveis das mesmas moléculas analisadas em laboratórios diferentes reflete falta de padronização do método, o que dificulta a utilização desses achados na prática clínica.

### Citometria de fluxo

Citometria de fluxo é um método quantitativo que tem como principal vantagem a possibilidade de avaliar diversos parâmetros celulares em um mesmo momento.<sup>46,47</sup> Esses parâmetros podem variar desde antígenos de superfície até moléculas citoplasmáticas ou nucleares, análise de DNA e as avaliações funcionais. A combinação de ensaios funcionais (proliferação celular ou detecção de citocinas citoplasmáticas) com a detecção de moléculas de diferenciação celular de superfície possibilita uma análise da cinética da resposta imune considerando subpopulações distintas. Hernandez Fuentes et al. observaram que frequências de células antígeno específicas podem ser medidas com alta sensibilidade por meio da citometria de fluxo, através da combinação de um marcador de proliferação celular (CFSE) e anticorpos específicos contra diferentes moléculas de superfície.<sup>48</sup> Adicionalmente, uma frequência elevada de células com fenotipo característico de linfócitos T reguladores foi encontrada em pacientes com tolerância

operacional, quando comparados com receptores com disfunção crônica do enxerto.<sup>49</sup>

## CONCLUSÃO

A resposta imune contra o aloenxerto é um evento complexo que envolve diferentes mecanismos relacionados tanto a uma reação pró-inflamatória/citotóxica quanto ao desenvolvimento de tolerância imunológica. Adicionalmente, esses mecanismos diferem de um indivíduo para outro, sendo que vários fatores podem atuar nessa diversidade, como, por exemplo, as experiências imunológicas prévias do indivíduo, a sensibilidade às drogas imunossupressoras administradas e as comorbidades presentes. Dessa maneira, o desenvolvimento de ensaios capazes de monitorar a resposta imunológica no contexto do transplante renal e identificar uma atividade deletéria ao enxerto no seu estágio inicial, antes mesmo da ocorrência de manifestações clínicas ou alterações estruturais, contribuiria de forma significativa para o aumento da sobrevida, tanto do paciente quanto do enxerto. Em um cenário ideal, os processos imunológicos seriam identificados através de exames pouco invasivos, de fácil execução e interpretação, com alto grau de sensibilidade e especificidade, possibilitando inclusive a identificação de pacientes tolerantes ao enxerto, nos quais a imunossupressão possa ser retirada com segurança. Em outras palavras, avanços nos métodos diagnósticos são necessários para melhor individualização da terapia imunossupressora, resultando, finalmente, em redução da morbimortalidade no transplante renal.

## ABSTRACT

Kidney transplantation is currently the best treatment for advanced chronic kidney disease. Improvements in pre-transplant immunological evaluation and the development of more potent immunosuppressive drugs have considerably augmented short term allograft survival. Acute rejection rates have reached acceptable levels, even when transplantation is performed between HLA distinct individuals. Nonetheless, long term allograft survival remains suboptimal, due to various immunological and non-immunological factors. The chronic allograft dysfunction can be caused either by an anti-allograft immune response of low intensity that “escapes” the immunosuppression or by an excessive immunosuppression and its consequences, such as infections and nephrotoxicity. The alloimmune reactivity is a complex event that can vary over a wide range from rejection to tolerance. All this heterogeneity cannot be assessed by the diagnostic tools available nowadays. Thus, the development of reliable tests for monitoring alloimmune response during the post-transplantation period would allow early diagnosis of deleterious events and better individualization of immunosuppressive therapy.

**Keywords:** Monitoring, Immunologic; Kidney Transplantation; Graft Rejection

## REFERÊNCIAS:

1. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, 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;341:1725-30.
2. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med.* 2004;351:2715-29.
3. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant.* 2004;4:378-83.
4. Sayegh MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later-progress, challenges and promises. *N Engl J Med.* 2004;351:2761-6.
5. de Fijter JW. Rejection and function and chronic allograft dysfunction. *Kidney Int Suppl.* 2010;119:S38-41.
6. Kozakowski N, Regele H. Biopsy diagnostics in renal allograft rejection: from histomorphology to biological function. *Transpl Int.* 2009;22:945-53.
7. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vitko S, Nashan B, Gürkan A, et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med.* 2007;357:2562-75.
8. Nickerson P. Post-transplant monitoring of renal allografts: are we there yet? *Curr Opin Immunol.* 2009;21:563-8.
9. Heidt S, San Segundo D, Shankar S, Mittal S, Muthusamy AS, Friend PJ, et al. Peripheral blood sampling for the detection of allograft rejection: biomarker identification and validation. *Transplantation.* 2011;92:1-9.
10. Najafian N, Albin MJ, Newell KA. How can we measure immunologic tolerance in humans? *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:2652-63.

11. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*. 1969;280:735-9.
12. Bray RA, Gebel HM. Strategies for human leukocyte antigen antibody detection. *Curr Opin Organ Transplant*. 2009;14:392-7.
13. Gibney EM, Cagle LR, Freed B, Warnell SE, Chan L, Wiseman AC. Detection of donor-specific antibodies using HLA-coated microspheres: another tool for kidney transplant risk stratification. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21:2625-9.
14. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21:1398-406.
15. Halloran PF, Wadgymar A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I antibody response. I. Clinical and pathologic features of anti-class I-mediated rejection. *Transplantation*. 1990;49:85-91.
16. Halloran PF, Schlaut J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I response. II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I-like antibody. *Transplantation*. 1992;53:550-5.
17. Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK, Lee PH, Hung CJ, Chen YL, et al. All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation*. 2002;74:1192-4.
18. Campos EF, Tedesco-Silva H, Machado PG, Franco M, Medina-Pestana JO, Gerbase-DeLima M. Post-transplant anti-HLA class II antibodies as risk factor for late kidney allograft failure. *Am J Transplant*. 2006;6:2316-20.
19. Zhang Q, Liang LW, Gjertson DW, Lassman C, Wilkinson AH, Kendrick E, et al. Development of posttransplant antidonor HLA antibodies is associated with acute humoral rejection and early graft dysfunction. *Transplantation*. 2005;79:591-8.
20. Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Johnson RW. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation*. 2003;75:1034-40.
21. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant*. 2008;8:753-60.
22. Kowalski RJ, Post DR, Mannon RB, Sebastian A, Wright HI, Sigle G, et al. Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation*. 2006;82:663-8.
23. Millán O, Sánchez-Fueyo A, Rimola A, Guillen D, Hidalgo S, Benitez C, et al. Is the intracellular ATP concentration of CD4+ T-Cells a predictive biomarker of immune status in stable transplant recipients? *Transplantation*. 2009;88:S78-84.
24. Berglund D, Bengtsson M, Biglarnia A, Berglund E, Yamamoto S, von Zur-Mühlen B, et al. Screening of mortality in transplant patients using an assay for immune function. *Transpl Immunol*. 2011;24:246-50.
25. Huskey J, Gralla J, Wiseman AC. Single time point immune function assay (ImmuKnow) testing does not aid in the prediction of future opportunistic infections or acute rejection. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6:423-9.
26. Pelzl S, Opelz G, Daniel V, Wiesel M, Süsal C. Evaluation of posttransplantation soluble CD30 for diagnosis of acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2003;75:421-3.
27. Delgado JC, Pavlov IY, Shihab FS. Post-transplant increased levels of serum sCD30 is a marker for prediction of kidney allograft loss in a 5-year prospective study. *Transpl Immunol*. 2009;22:1-4.
28. Altermann W, Schlaf G, Rothhoff A, Seliger B. High variation of individual soluble serum CD30 levels of pre-transplantation patients: sCD30 a feasible marker for prediction of kidney allograft rejection? *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22:2795-9.
29. Wang D, Wu WZ, Chen JH, Yang SL, Wang QH, Zeng ZX, et al. Pre-transplant soluble CD30 level as a predictor of not only acute rejection and graft loss but pneumonia in renal transplant recipients. *Transpl Immunol*. 2010;22:115-20.
30. Süsal C, Döhler B, Sadeghi M, Salmela KT, Weimer R, Zeier M, et al. Posttransplant sCD30 as a predictor of kidney graft outcome. *Transplantation*. 2011;91:1364-9.
31. Heeger PS, Greenspan NS, Kuhlenschmidt S, DeJelo C, Hricik DE, Schulak JA, et al. Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *J Immunol*. 1999;163: 2267-75.
32. Hricik DE, Rodriguez V, Riley J, Bryan K, Tary-Lehmann M, Greenspan N, et al. Enzyme linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay for interferon-gamma independently predicts renal function in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2003;3:878-84.
33. Augustine JJ, Poggio ED, Heeger PS, Hricik DE. Preferential benefit of antibody induction therapy in kidney recipients with high pretransplant frequencies of donor-reactive interferon-gamma enzyme-linked immunosorbent spots. *Transplantation*. 2008;86:529-34.
34. Najafian N, Salama AD, Fedoseyeva EV, Benichou G, Sayegh MH. Enzyme-linked immunosorbent spot assay analysis of peripheral blood lymphocyte reactivity to donor HLA-DR peptides: potential novel assay for prediction of outcomes for renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:252-9.
35. Nadazdin O, Boskovic S, Murakami T, Tocco G, Smith RN, Colvin RB, et al. Host alloreactive memory T cells influence tolerance to kidney allografts in nonhuman primates. *Sci Transl Med*. 2011;3:86ra51.
36. Vasconcellos LM, Schachter AD, Zheng XX, Vasconcellos LH, Shapiro M, Harmon WE, et al. Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation*. 1998;66:562-6.
37. Simon T, Opelz G, Wiesel M, Pelzl S, Ott RC, Süsal C. Serial peripheral blood perforin and granzyme B gene expression measurements for prediction of acute rejection in kidney graft recipients. *Am J Transplant* 2003; 3: 1121-7.
38. Dugré FJ, Gaudreau S, Belles-Isles M, Houde I, Roy R. Cytokine and cytotoxic molecule gene expression determined in peripheral blood mononuclear cells in the diagnosis of acute renal rejection. *Transplantation*. 2000;70:1074-80.
39. Tan L, Howell WM, Smith JL, Sadek SA. Sequential monitoring of peripheral T-lymphocyte cytokine gene expression in the early post renal allograft period. *Transplantation*. 2001;71:751-9.
40. Graziotto R, Del Prete D, Rigotti P, Anglani F, Baldan N, Furian L, et al. Perforin, granzyme B, and fas ligand for molecular diagnosis of acute renal-allograft rejection: Analyses on serial biopsies suggest methodological issues. *Transplantation*. 2006;81:1125-32.
41. Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, et al. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med*. 2001;344:947-54.
42. Renesto PG, Ponciano VC, Cenedeze MA, Saraiva Câmara NO, Pacheco-Silva A. High expression of Tim-3 mRNA in urinary cells from kidney transplant recipients with acute rejection. *Am J Transplant*. 2007;7:1661-5.
43. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med*. 2005;353:2342-51.
44. Manfro RC, Aquino-Dias EC, Joelsons G, Nogare AL, Carpio VN, Gonçalves LF. Noninvasive Tim-3 messenger RNA evaluation in renal transplant recipients with graft dysfunction. *Transplantation*. 2008;86:1869-74.
45. Yannarakis M, Rebibou JM, Ducloux D, Saas P, Duperrier A, Felix S, et al. Urinary cytotoxic molecular markers for a noninvasive diagnosis in acute renal transplant rejection. *Transpl Int*. 2006;19:759-68.
46. Owens MA, Horacio GV, Hurley AA, Wormsley SB. Validation and quality control of immunophenotyping in clinical flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2000;243:33-50.
47. Tung JW, Parks DR, Moore WA, Herzenberg LA, Herzenberg LA. New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data. *Clin Immunol*. 2004;110:277-83.
48. Hernandez-Fuentes MP, Warrens AN, Lechler RI. Immunologic monitoring. *Immunol Rev*. 2003;196:247-64.
49. Louis S, Braudeau C, Giral M, Dupont A, Moizant F, Robillard N, et al. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation*. 2006;81:398-407.