

(11) Número de Publicação: **PT 1458853 E**

(51) Classificação Internacional:  
**C12N 5/06** (2007.10) **G01N 33/53** (2007.10)  
**G01N 33/569** (2007.10) **G01N 33/564** (2007.10)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

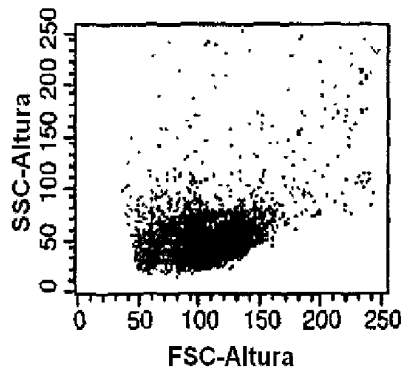
(22) Data de pedido: <b>2003.05.16</b>	(73) Titular(es): <b>ABSORBER AB</b> <b>DROTTNINGGATAN 33, BOX 7710 103 95</b> <b>STOCKHOLM</b> <b>SE</b>
(30) Prioridade(s): <b>2002.05.16 US 381033 P</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2004.09.22</b>	(72) Inventor(es): <b>SUCHITRA SUMITRAN-HOLGERSSON</b> <b>SE</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2009.11.25</b> <b>036/2010</b>	(74) Mandatário: <b>JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO</b> <b>R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **PROCESSOS DE PROVA DIRECTA DE COMPATIBILIDADE ESPECÍFICOS PARA DADORES**

(57) Resumo:

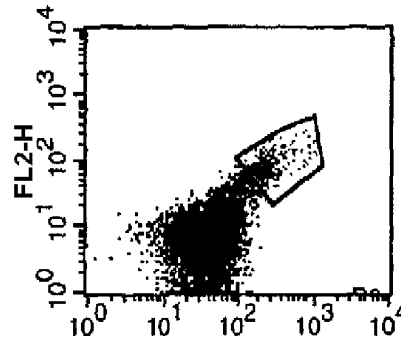
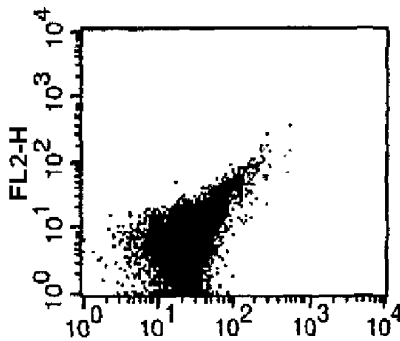
## RESUMO

### PROCESSOS DE PROVA DIRECTA DE COMPATIBILIDADE ESPECÍFICOS PARA DADORES

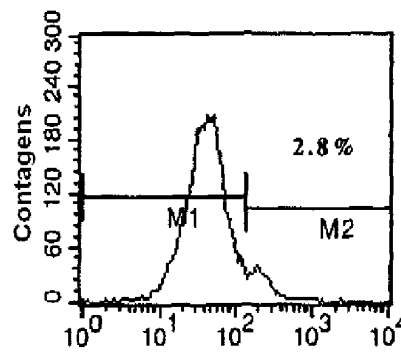
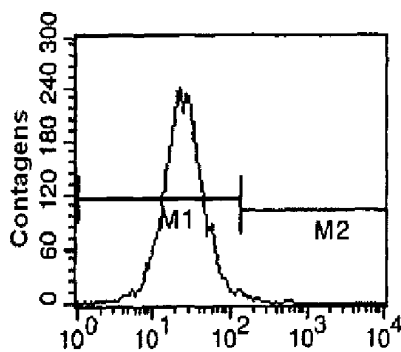


Controlo

Tie-2+



FL1



Fluorescência

A presente invenção tem por objecto um processo para o isolamento directo de células endoteliais a partir de sangue

completo para prova directa de compatibilidade, de rotina, específica para dadores para detectar anticorpos de células anti-endoteliais antes do transplante de órgãos.

## DESCRIÇÃO

### PROCESSOS DE PROVA DIRECTA DE COMPATIBILIDADE ESPECÍFICOS PARA DADORES

#### DOMÍNIO DA INVENÇÃO

A presente invenção tem por objecto um processo para o isolamento directo de células endoteliais a partir de sangue completo para fazer uma prova directa de compatibilidade, de rotina, específica para dadores, para detectar os anticorpos de células anti-endoteliais antes de transplante de órgãos.

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A presença de anticorpos específicos de antigénios de leucócitos humanos (ALH) reactivos aos linfócitos do dador, quer antes e/ou depois de transplante de alo-enxerto renal, tem estado associada com rejeições hiper-agudas, rejeições agudas precoces e fraca sobrevivência de enxertos. Contudo, as rejeições podem ocorrer na ausência de anticorpos linfocitotóxicos detectáveis, sugerindo que os sistemas antigénicos não ALH podem também desempenhar um papel nas rejeições agudas e hiper-agudas de alo-enxertos renais. Os anticorpos reactivos com as células endoteliais e com monócitos (também designados por sistema antigénico EM) ou apenas com células endoteliais, têm sido descritos e referenciados por terem um efeito nefasto em vários transplantes de órgãos.

Recentemente, foi identificado o principal antigénio A de histocompatibilidade da cadeia relacionada com a classe I (MICA) expresso em células endoteliais, como sendo um dos

antigénios alvo da imunidade humoral associada com rejeições irreversíveis de alo-enxertos de rim. Estudos de alo-enxertos de dadores relacionados com agentes vivos idênticos a ALH, mostraram que a presença de anticorpos reactivos a células endoteliais/monócitos correlacionados com a rejeição, perda do enxerto e uma fraca função do alo-enxerto. Foi relatado que esta reactividade podia ser responsável por até 80 % das rejeições irreversíveis neste grupo de pacientes. Contudo, a prova directa de compatibilidade de linfócitos (LXM) utilizada por rotina não permite a detecção de anticorpos específicos das células endoteliais e reactivos a células endoteliais/monócitos, da classe I e da classe II de ALH, relevantes sob o ponto de vista clínico. Embora a presença de células endoteliais em circulação no sangue completo tenha sido um tema em debate durante muitos anos, a existência de células endoteliais precursoras em circulação em seres humanos adultos, foi recentemente relatada por alguns investigadores. Contudo, não há actualmente nenhum método apropriado, disponível, para realizar uma prova directa de compatibilidade, por rotina, das células endoteliais específicas do dador (ECXM).

Por isso, há uma necessidade de realizar com eficiência provas directas de compatibilidade das células endoteliais específicas do dador, para ser usado por rotina, para ajudar na identificação das melhores combinações de dador-receptor, que terá assim um maior impacto na sobrevivência do transplante do que o actual processo de prova directa de compatibilidade dos linfócitos.

F. GEORGE ET AL., THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 67, no. 1, 1992, páginas 147-153 relata o isolamento rápido de células endoteliais humanas de sangue completo utilizando um

anticorpo monoclonal s-endol acoplado com pérolas imunomagnéticas e traumas endoteliais após angioplastia.

ROSELLA SBARBATI et al: BLOOD, vol. 77, nº. 4, 15 de Fevereiro de 1991 (1991-02-15), páginas 764-769 relata a detecção imunológica de células endoteliais em sangue humano completo.

M.K. JONES et al: JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY, vol. 51, nº. 4, 2000, páginas 813-820 relata o isolamento e a caracterização de células endoteliais microvasculares gástricas de ratos como um modelo para estudar a angiogénese gástrica *in vitro*.

MARIO PEICHEV et al: BLOOD, vol. 95, nº. 3, 1 de Fevereiro de 2000 (2000-02-01), páginas 952-958 relata a identificação de uma população de precursores endoteliais funcionais através da expressão de RFCEV-2 e AC133.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A presente invenção tem por objecto um processo de isolamento de células endoteliais precursoras que são úteis nas provas directas de compatibilidade específicas para dadores antes do transplante. As células endoteliais precursoras isoladas são também úteis no diagnóstico de vários distúrbios vasculares e distúrbios auto-imunes.

A presente invenção inclui um processo de isolamento de células endoteliais precursoras a partir de uma amostra biológica desde que se saiba que a amostra contém ou que se suspeita que contenha uma célula endotelial precursora. A célula endotelial precursora é positiva para Tie-2. Faz-se a amostra contactar com um reagente de detecção para formar um

complexo de reagente de detecção e célula endotelial. A célula endotelial precursora é isolada separando o complexo da amostra. Faz-se a separação, por exemplo, por citometria de fluxo ou utilizando um campo magnético.

O reagente de detecção é um anticorpo específico para Tie-2. O reagente de detecção pode estar ligado a um suporte sólido, tal como, uma pérola magnética, não magnética ou para-magnética.

A amostra biológica é sangue completo, soro, células mononucleares de sangue periférico (CMSPs) ou produto de leucaferese.

A presente invenção ainda tem por objecto um processo de prova directa de compatibilidade feita a um dador e a um receptor, providenciando uma amostra biológica de um dador que se sabe que contém células endoteliais precursoras, fazendo contactar a amostra do dador com o reagente de detecção para isolar células endoteliais precursoras. Faz-se o rastreio de uma amostra biológica do receptor para provocar reactividade com a célula endotelial precursora isolada do dador. Se não houver reactividade entre a amostra do receptor e a célula endotelial precursora isolada isso indica compatibilidade entre o dador e o receptor e uma probabilidade maior de que o transplante do órgão tenha sucesso.

Num outro aspecto, a presente invenção inclui um processo de diagnóstico de distúrbios vasculares ou auto-imunes num indivíduo, providenciando uma primeira amostra de um indivíduo que se sabe que contém ou que se suspeita que contenha uma célula endotelial precursora. Faz-se contactar a primeira amostra com uma segunda amostra. A segunda amostra é

proveniente de um indivíduo que se sabe que contém ou que se suspeita que contenha um auto-anticorpo. Alternativamente, a segunda amostra contém reagentes (por exemplo, anticorpos) que reconhecem os marcadores da superfície das células endoteliais associados com esse distúrbio em particular. Determina-se então se há formação do complexo entre a célula endotelial precursora e a segunda amostra. A presença do complexo indica que existe o distúrbio nesse indivíduo.

Ainda noutro aspecto, a presente invenção inclui um processo de determinação da eficácia do tratamento ou do prognóstico de distúrbios auto-imunes ou vasculares num indivíduo, providenciando uma primeira amostra de um indivíduo que se sabe que contém ou que se suspeita que contenha uma célula endotelial precursora, fazendo contactar a célula endotelial precursora com uma segunda amostra de um indivíduo que se sabe que contém ou que se suspeita que contenha um auto-anticorpo, medindo qualquer complexo auto-anticorpo/célula endotelial precursora presente, para se obter um perfil do indivíduo. Compara-se o perfil do indivíduo com um perfil de referência, em que uma semelhança entre o perfil do indivíduo e o perfil de referência indica que o tratamento é eficaz ou tem um prognóstico favorável.

Os distúrbios auto-imunes ou vasculares relacionados incluem vasculite, aterosclerose, distúrbios hemorrágicos, angiogenese, trombose, cura deficiente de feridas e transplantes.

A menos que seja definido de outra forma, todos os termos científicos e técnicos utilizados aqui têm o significado que é normalmente entendido por um especialista na matéria à qual pertence a presente invenção. Embora se possam utilizar processos e materiais semelhantes ou

equivalentes aos descritos aqui, na prática ou no ensaio da presente invenção, os processos e os materiais apropriados estão descritos a seguir. Em caso de conflito, a presente memória descritiva, incluindo as definições, constituirão um controlo. Além disso, os materiais, os processos e os exemplos são apenas ilustrativos e não pretendem ser limitativos.

Outras características e vantagens da presente invenção serão evidentes a partir da descrição detalhada que se segue e a partir das reivindicações.

### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

A figura 1 mostra gráficos de pontos que representam perfis difundidos para a frente e para os lados, assim como, a fluorescência de células mononucleares de sangue periférico (CMSPs) coradas com anticorpos monoclonais (Acms) anti-Tie-2+. As células de Tie-2+ (pontos cinzentos) aparecem à entrada dos linfócitos. Os histogramas mostram a percentagem das células Tie-2+ (ap.  $2 \pm 3$  %) em CMSPs coradas com Acs de controlo negativo e Acms de Tie-2.

As figuras 2a-c são fotografias da morfologia das células Tie-2+ vistas a um microscópio, em vários momentos após o isolamento a partir do sangue periférico. Inicialmente, estas células aparecem quer como células simples quer como conjuntos de células redondas (a) que, passados alguns dias de cultura, convertem-se em células aderentes com um citoplasma expandido (os objectos negros são pérolas) (b). Passados 7-12 dias de cultura as células desenvolvem-se gradualmente com a forma de fuso (c).

A **figura 3a** é uma série de fotografias que mostra as células Tie-2+ coradas positivamente para os marcadores associados com as células endoteliais, lipoproteína de baixa densidade acetilada (LBD-Ac), factor de von Willebrand (fvW), receptor 1 do factor de crescimento endotelial vascular (RFCEV-1) e a molécula de adesão das células vasculares (MACV) (em células Tie-2+ activadas). As células Tie-2+ também expressam constitutivamente a classe I dos antigénios de leucócitos humanos (classe I de ALH) e um marcador de monócito/macrófagos CD68.

A **Figure 3b** mostra as células Tie-2+ quiescentes, que expressam pequenas quantidades dos antigénios de MICA importantes sob o ponto de vista clínico (cinzento escuro) e a classe II de ALH (cinzento claro), anticorpos de controlo (negro).

A **figura 4a** representa um gráfico de pontos que representa a difusão para a frente e para os lados das células Tie-2+ e pérolas para-magnéticas (entrada R1) e apenas pérolas para-magnéticas (entrada R2).

As **figuras 4b-g** representam histogramas que mostram o soro pró-transplante de dois pacientes que foram submetidos a transplante do rim, com rejeições hiper-agudas atingidas fortemente com as células Tie-2+ específicas do dador (**b & e**), enquanto as suas fracções de Tie-2, que incluíam linfócitos não o exibiram (**d & g**). Os histogramas **c & f** mostram que as pérolas para-magnéticas sozinhas não reagem com o soro de uma forma não específica. As linhas cinzentas representam soros de controlo ou negativos e as linhas pretas representam reactividade com os soros dos pacientes.

## **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A presente invenção baseia-se, em parte, na descoberta de que quando se atinge uma população única de células específicas, isso permite a detecção de antigénios relevantes de leucócitos humanos (ALH) específicos do dador da classe I e da classe II, monócitos endoteliais ou anticorpos específicos de células endoteliais antes do transplante de órgãos. A utilização por rotina de provas directas de compatibilidade das células endoteliais vai ajudar a identificar melhor as combinações entre dador e receptor e assim terá um maior impacto na sobrevivência do transplante quando se compara com as tradicionais provas de compatibilidade com os linfócitos.

A importância clínica dos anticorpos das células endoteliais (CE) nos alo-transplantes já foi relatada. Contudo, a falta de um processo apropriado para o isolamento das CEs específicas do dador, tem dificultado a detecção de rotina destes anticorpos antes do transplante. A presente invenção providencia um processo simples e rápido para o isolamento directo dos precursores de CEs a partir de sangue completo, por meio de uma prova directa de compatibilidade de rotina para detectar anticorpos anti-CE. A presença de anticorpos reactivos às células endoteliais tinha sido previamente detectada utilizando linhas de células endoteliais de veias umbilicais humanas (CEVUH), linhas de células de queratinócitos ou monócitos como alvos ou por imuno-histoquímica. Contudo, estes processos são extremamente trabalhosos porque a cultura de células endoteliais é muito enfadonha e normalmente é necessário um grande painel de dadores de linhas de CEVUH/queratinócitos para representar todos os alelos polimórficos conhecidos para rastrear os anticorpos reactivos a células endoteliais. Além disso, estes

processos não permitem a detecção de anticorpos de células endoteliais específicas do dador. Assim, a utilização de uma prova directa de compatibilidade das células endoteliais é vantajosa em relação à utilização de prova directa de compatibilidade dos linfócitos porque a prova directa de compatibilidade dos linfócitos não permite essa detecção ou o isolamento de anticorpos reactivos a células endoteliais específicas do dador.

Isolaram-se CEs utilizando pérolas magnéticas revestidas com anticorpos contra o receptor de angiopoietina, Tie-2, que é expressa nos precursores de CEs. Os genes de Tie desempenham um importante papel no desenvolvimento vascular renal e, com base nas experiências de transplantes, estes precursores têm mostrado contribuir para a geração da maturação glomerular. Foi feita uma análise retrospectiva de 50 provas directas de compatibilidade previamente bem caracterizadas em soros recolhidos imediatamente antes do transplante de pacientes com doenças renais no seu estado terminal, por meio de ensaios. As células Tie-2+ expressaram ALH da classe I e da classe II e outros marcadores de células endoteliais. Os soros que se sabia que continham apenas anticorpos reactivos de CEs e de monócitos (EM) ou específicos de CEs reagiram positivamente com soros que continham células Tie-2+, mas não com as células Tie-2 do mesmo indivíduo. Além disso, as células Tie-2+ reagiram com soros contendo apenas anticorpos de ALH da classe I ou da classe II. No total, 3/25 soros de pacientes com um resultado de enxerto estável e sem rejeições reagiram com as células Tie-2+. Esta interacção antigénio-anticorpo é relevante para a patogénese da rejeição, dado que, em muitos estudos, estes anticorpos não foram detectados no soro de pacientes com uma boa função do enxerto ou em pacientes sem transplante.

## Processo de Isolamento de Precusores de Células Endoteliais

A presente invenção inclui processos de isolamento de um precursor de células endoteliais a partir de uma mistura de células por meio do contacto da mistura de células com um reagente de detecção, para formar um complexo de precursor de células endoteliais/reagente de detecção. O complexo é formado por via de uma interacção de afinidade específica entre o reagente de detecção e a célula. Separa-se o complexo da mistura para isolar o precursor da célula endotelial. Separa-se o complexo da mistura utilizando técnicas conhecidas nesta técnica, tal como, por exemplo, cromatografia líquida (por exemplo, CLAR ou CLFP), cromatografia de membrana de elevada resolução (CMAR), citometria de fluxo ou utilização de um campo magnético. Alternativamente, separa-se o complexo da mistura ligando o reagente de detecção a um suporte sólido. Pode-se utilizar uma etapa de lavagem por meio de uma nova suspensão do complexo numa solução compatível sob o ponto de vista biológico. O complexo pode ser novamente suspenso, isto é, lavado tantas vezes quanto as desejadas. Normalmente lavam-se as partículas três vezes. Uma solução compatível sob o ponto de vista biológico inclui tampões biológicos conhecidos na técnica, tais como, solução salina tamponada com fosfato (STF).

O reagente de detecção é um anticorpo específico para Tie-2. O anticorpo é um anticorpo monoclonal ou um anticorpo policlonal. O termo anticorpo engloba não apenas um anticorpo intacto mas também um fragmento de anticorpo activo sob o ponto de vista imunológico, por exemplo, um fragmento Fab ou (Fab)<sub>2</sub>; uma molécula Fv de cadeia simples tratada por engenharia; ou uma molécula quimérica, por exemplo, um anticorpo que contém a especificidade de ligação de um

anticorpo, por exemplo, com origem em murino e as porções remanescentes de outro anticorpo, por exemplo, de origem humana. Por exemplo, o reagente de detecção é um anticorpo monoclonal Tie-2.

O reagente de detecção pode ser ligado a um suporte sólido. O suporte sólido é uma partícula, um polímero (por exemplo, poliestireno, polietileno), um vaso, uma câmara, uma vareta, pérolas, partículas, membranas (por exemplo, nylon, nitrocelulose ou difluoreto de polivinilideno (DFPV)) ou outras formas conhecidas na técnica.

O suporte sólido pode comportar grupos funcionais, tais como, grupos hidroxilo, carboxilo, aldeído ou amino. O suporte sólido pode estar carregado positivamente, carregado negativamente ou pode ser hidrofóbico. Os suportes revestidos, funcionalizados, para serem utilizados na presente invenção podem ser preparados por modificação do suporte. Por exemplo, trata-se um suporte não revestido com um polímero que comporta um desses grupos funcionais, tais como, poliuretano em conjunto com um poli-glicol para providenciar grupos hidroxilo ou um derivado de celulose para providenciar grupos hidroxilo, um polímero ou um co-polímero de ácido acrílico ou de ácido metacrílico para providenciar grupos carboxilo ou um polímero aminoalquilado para providenciar grupos amino. A patente US N°. 4.654.267 descreve a introdução de muitos revestimentos de superfície.

A partícula é feita de compostos metálicos, sílica, látex, material polimérico ou um núcleo de sílica, látex ou polímero revestido com um metal ou um composto metálico. Preferencialmente, a partícula é constituída por um composto metálico, tal como, ferro, gadolínio, zinco, índio, ouro, prata, cobalto, cobre ou magnésio. Mais preferencialmente, a

partícula é magnetizável ou magnética. Por "magnetizável ou magnética" entende-se que a partícula é capaz de ter um momento magnético quando está colocada num campo magnético.

O reagente de detecção é marcado com um marcador detectável. Por exemplo, o reagente de detecção pode ser marcado com isótopos radioactivos (por exemplo,  $^{125}\text{I}$  e  $^{131}\text{I}$ ), enzimas (por exemplo, peroxidase, beta-galactosidase, fosfatase alcalina) ou substâncias fluorescentes (por exemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC)). Os marcadores são quantificados por processos convencionais bem conhecidos na técnica e assim se quantifica o complexo imune formado. A mistura de células é qualquer amostra conhecida por ter ou por se suspeitar que tenha células endoteliais. Por exemplo, a mistura é uma amostra biológica, tal como, sangue completo, soro, produto de leucaferese, medula óssea, células mononucleares de sangue periférico ou um homogeneizado de tecido.

Uma célula endotelial é qualquer célula derivada de qualquer parte da árvore vascular. Por exemplo, a célula endotelial é proveniente das veias e artérias capilares grandes e pequenas, da veia umbilical de recém-nascidos, dos vasos sanguíneos do cérebro ou de tumores sólidos vascularizados. A célula endotelial é um precursor da célula endotelial que é positivo em relação a Tie-2.

#### Processos de Prova Directa de Compatibilidade Específica do Dador

A prova de compatibilidade directa detecta as diferenças antigénicas às quais o receptor já é sensível. Faz-se a prova directa de compatibilidade entre um dador e um receptor fazendo contactar uma amostra do dador com um reagente de

detecção para isolar um precursor de células endoteliais. Faz-se contactar a amostra do receptor com o precursor isolado de células endoteliais e determina-se a reactividade da amostra do receptor com o precursor de células endoteliais isolado. Por "reactividade" entende-se um complexo formado por via de uma interacção de afinidade específica entre a amostra do receptor e a célula. Quando não há reactividade da amostra do receptor com o precursor da célula endotelial isolado, indica compatibilidade entre a amostra do dador e do receptor. Pelo contrário, a reactividade da amostra do receptor com o precursor de células endoteliais isolado indica que não há compatibilidade entre a amostra do dador e a do receptor. Mede-se a compatibilidade pela não rejeição ou por uma rejeição hiper-aguda baixa do transplante do dador por parte do receptor.

O dador e o receptor são, por exemplo, qualquer mamífero, por exemplo, um ser humano, um porco, uma vaca ou um cavalo. O dador e o receptor são da mesma espécie. Alternativamente, o dador e o receptor são de espécies diferentes.

A amostra do dador e do receptor é, por exemplo, sangue completo, soro, produto de leucaferese, medula óssea, células mononucleares de sangue periférico ou um homogeneizado de tecido. Eventualmente, as amostras são submetidas a uma etapa de pré-purificação antes da prova directa de compatibilidade.

Determina-se a reactividade por processos conhecidos na técnica. Por exemplo, mede-se a reactividade por um ensaio de ELISA, citometria de fluxo (por exemplo, prova directa de compatibilidade por fluxo citométrico) ou prova directa de compatibilidade por linfotoxicidade dependente do complemento.

## Distúrbios Vasculares e Imunitários

A presente invenção também tem por objecto processos de diagnóstico, avaliação de prognóstico ou monitorização de um tratamento em curso de distúrbios vasculares e auto-imunes.

Nestes processos, obtém-se uma primeira amostra de ensaio de um indivíduo. Sabe-se que essa amostra contém ou suspeita-se que contenha um precursor de células endoteliais. Eventualmente, isola-se o precursor de células endoteliais a partir da primeira amostra.

Diagnostica-se um distúrbio auto-imune fazendo contactar a primeira amostra com uma segunda amostra de um indivíduo que se sabe que contém ou que se suspeita que contenha um auto-anticorpo e identifica-se um complexo de auto-anticorpo / precursor de células endoteliais. A presença do complexo de auto-anticorpo / precursor de células endoteliais indica que o indivíduo sofre ou está predisposto a sofrer de um distúrbio auto-imune. Pelo contrário, a ausência de um complexo de auto-anticorpo / precursor de células endoteliais indica que um indivíduo não sofre nem está predisposto para um distúrbio auto-imune.

Diagnostica-se um distúrbio vascular fazendo contactar a primeira amostra com uma segunda amostra. A segunda amostra deriva do indivíduo. Alternativamente, a segunda amostra compreende anticorpos dos marcadores da superfície das células conhecidos por estarem associados a um distúrbio vascular particular. A presença de uma segunda amostra de do complexo de células precursoras de células endoteliais indica que o indivíduo sofre ou está predisposto a sofrer de um distúrbio particular. Pelo contrário, a ausência de um complexo de uma segunda amostra de precursor de células

endoteliais indica que o indivíduo não sofre nem está predisposto a ter um distúrbio vascular.

Os processos permitem monitorizar o curso de tratamento de um distúrbio vascular ou um distúrbio auto-imune ou permitem o prognóstico em relação a esse indivíduo. Neste processo, providencia-se uma amostra de ensaio a partir de um indivíduo que se submete ao tratamento desse distúrbio. Se desejado, obtêm-se as amostras de ensaio do indivíduo em vários momentos antes, durante ou depois do tratamento. A presença de um complexo de precursor de células endoteliais é então determinada para criar um perfil de um indivíduo. Compara-se o perfil do indivíduo com um perfil de referência cujos distúrbios vasculares ou distúrbios auto-ímunes sejam conhecidos. O perfil de referência não foi exposto ao tratamento. O perfil de referência deriva de um tipo de amostra tão similar quanto possível da amostra de ensaio. Eventualmente, o perfil de referência deriva de uma base de dados de informação molecular derivadas de amostras para as quais os parâmetros ou as condições de ensaio são conhecidas.

Se o perfil de referência não contém complexos de auto-anticorpo / precursor de células endoteliais, uma semelhança na quantidade de complexos entre o perfil do indivíduo e o perfil de referência indica que o tratamento é eficaz (por exemplo, no caso de um ou mais sintomas do distúrbio imunitário serem aliviados ou se a severidade do distúrbio for reduzida) e assim, estabelece um prognóstico favorável para o indivíduo. Contudo, uma diferença da quantidade de complexos entre o perfil do indivíduo e o perfil de referência indica que o tratamento não é eficaz e assim estabelece-se um prognóstico desfavorável para o indivíduo.

Quando o perfil de referência contém complexos de auto-anticorpo / precursor de células endoteliais, por exemplo, quando o perfil de referência inclui complexos retirados do indivíduo no momento do diagnóstico mas antes de começar o tratamento, uma semelhança no modelo de expressão dos complexos entre o perfil do indivíduo e o perfil de referência indica que o tratamento não é eficaz. Pelo contrário, uma diferença nos complexos de expressão do perfil do indivíduo e no perfil de referência indica que o tratamento é eficaz.

Por "eficácia" entende-se que o tratamento leva a uma diminuição de qualquer um dos sintomas do distúrbio auto-imune num indivíduo que foi previamente assinalado. Quando se aplica o tratamento profilacticamente, "eficácia" significa que o tratamento retarda ou previne um distúrbio vascular ou relacionado com a auto-imunidade.

Um distúrbio auto-imune inclui distúrbios mediados por um mecanismo imunitário, tal como deposição de complexos imunitários, inflamação, ataque directo por anticorpos em circulação. Um distúrbio auto-imunitário ou um distúrbio relacionado com a auto-imunidade inclui os distúrbios causados por uma resposta imunitária contra os próprios tecidos do corpo. Os distúrbios auto-ímmunes resultam numa destruição de um ou mais tipos de tecidos do corpo, crescimento anormal de um órgão ou alterações em funções de órgãos. O distúrbio pode afectar apenas um órgão ou um tipo de tecido ou pode afectar múltiplos órgãos e tecidos. Os órgãos e tecidos normalmente afectados por distúrbios auto-ímmunes incluem componentes sanguíneas, tais como as células vermelhas do sangue, vasos sanguíneos, tecidos conjuntivos, glândulas endócrinas, tais como tiróide ou pâncreas, músculos, articulações e pele. Os distúrbios auto-ímmunes

incluem, por exemplo, anemia hemolítica auto-imune, hepatite auto-imune, doença de Berger, síndrome de fadiga crónica, doença de Crohn, tiroidite de Hashimoto, fibromialgia, lúpus eritematoso sistémico, doença de Graves, púrpura trombocitopénica idiopática, esclerose múltipla, psoríase, febre reumática e artrite reumatóide.

Os distúrbios vasculares incluem doenças associadas com o sistema vascular. Por exemplo, vasculite, aterosclerose, distúrbios hemorrágicos, cura deficiente de feridas.

Os sintomas de distúrbios auto-ímmunes dependem das doenças específicas e dos órgãos ou tecidos que estão afectados. Por exemplo, o lúpus eritematoso sistémico pode causar insuficiência renal, artrite e vermelhidão da pele na face. A anemia hemolítica auto-imune causa anemia ou uma baixa contagem dos glóbulos vermelhos do sangue. Geralmente, os sintomas dos distúrbios auto-ímmunes podem incluir: febre baixa, mal-estar, que é um vago sentimento de doença, fadiga ou uma situação fácil de cansaço. Os distúrbios auto-ímmunes são diagnosticados com base nos sintomas, nos exames físicos e nos resultados de análises de sangue.

Os tratamentos para reduzir os sintomas podem incluir fármacos anti-inflamatórios não esteróides (FAINEs), incluindo aspirina ou ibuprofeno, para aliviar a febre, dores articulares e corticoesteróides para as dores musculares ou esteróides, para ajudar a reduzir a inflamação. Estes medicamentos são muitas vezes utilizados numa base de curto prazo para tirar a pessoa de um episódio súbito ou de um recrudescimento, medicamentos para suprimir o sistema imunitário, tal como metotrexato, azatioprina e ciclofosfamida, que ajudam a reduzir a inflamação e os danos nos órgãos. Nalguns casos, podem ser necessários outros

tratamentos. Por exemplo, pode ser necessária cirurgia para oclusões intestinais, que podem ocorrer na doença de Crohn. Podem ser necessárias transfusões de sangue em casos severos de anemia hemolítica auto-imune. Dá-se insulina a indivíduos com diabetes do tipo I para controlar os níveis de glicose no sangue.

O indivíduo é, preferencialmente, um mamífero. O mamífero pode ser, por exemplo, um ser humano, um primata não humano, um murganho, um rato, um cão, um gato, um cavalo ou uma vaca.

## **PROCESSOS GERAIS**

Os dados aqui descritos são gerados utilizando os reagentes e os processos que se seguem.

### **EXEMPLO 1: Acoplamento de anticorpos anti-Tie-2 a pérolas magnéticas**

Primeiro acoplaram-se anticorpos monoclonais (Acms) de Tie-2, anti-humanos, de murganho (BD Pharmingen, Oxford, UK) a Dynabeads pan-mouse com um ligante de ADN (nº. cat. 115.19) (DYNAL, Oslo, Noruega). Para este fim, adicionou-se 10 µg de anticorpos de Tie-2 a 500 µs de Dynabeads pan-mouse. A suspensão de pérolas-anticorpos é submetida a rotação num agitador orbital, durante 24 horas, a 4 °C. Eliminou-se o excesso de anticorpos monoclonais e as pérolas revestidas com anticorpos monoclonais de Tie-2 foram bloqueadas com 2 mL de solução salina tamponada com fosfato (STF), contendo albumina de soro bovino (ASB) a 0,1 %, num agitador orbital, a 4 °C, durante 10 min. Repetiu-se a etapa de bloqueio seis vezes depois do que se fez uma nova suspensão das pérolas no volume original (500 µs) de STF/ASB a 0,1 %.

**EXEMPLO 2: Isolamento das células Tie-2+ a partir de células mononucleares de sangue periférico (CMSP)**

Devido ao grande número de células necessárias para estabelecer a especificidade das células Tie-2+, nas experiências iniciais isolaram-se CMSPs a partir de produto de leucaferese de doadores de sangue saudáveis por meio de uma centrifugação graduada com linfoprep (Nycomed-Oslo, Noruega). Isolaram-se as CEs a partir de CMSPs utilizando pérolas magnéticas revestidas com anticorpos monoclonais anti-Tie-2. Primeiro distribuíram-se as CMSPs em vários tubos, cada um deles contendo  $40 \times 10^6$  células. Adicionou-se a cada tubo 15 µls de pérolas magnéticas de Tie-2 pré-revestidas e incubou-se num volume de 500 µls de meio RPMI (GIBCO, Paisley, UK), complementado com L-glutamina 2 mM e inactivou-se pelo calor com soro bovino fetal a 10 %. Fez-se a incubação das células mais as pérolas num agitador orbital, a 4 °C, durante 30 min. Separaram-se as células Tie-2+ depois de uma lavagem prolongada (5-6 vezes) com STF utilizando um magneto. As células Tie-2+ de todos os tubos foram postas em conjunto e contaram-se as rosetas num microscópio.

**EXEMPLO 3: Isolamento de células Tie-2+ directamente a partir de sangue periférico**

Obteve-se 40 mL de sangue heparinizado de doadores saudáveis normais. Lavou-se o sangue uma vez como se segue: diluiu-se 10 mL de sangue com 40 mL de STF/ASB a 0,1 %. Centrifugou-se o sangue a 800 g, durante 10 min. Eliminou-se o sobrenadante e voltou a fazer-se uma suspensão das células do sangue em 10 mL de STF contendo citrato de sódio a 0,6 %. Adicionou-se cinquenta µls de pérolas magnéticas revestidas com anticorpos monoclonais de Tie-2+ a cada tubo e incubou-se durante 30 min, a 4 °C, num agitador orbital. As células Tie-

2+ foram recolhidas por meio de um magneto e lavaram-se uma vez com STF-citrato de Na. Depois de 4-5 lavagens com STF, recolheram-se as células Tie-2+ e ajustou-se a concentração das células para aproximadamente  $3-4 \times 10^6$  células/mL. Estas células, rodeadas pelas pérolas, foram utilizadas quer num ensaio de microcitotoxicidade, quer na citometria de fluxo.

#### **EXEMPLO 4: Imunocitoquímica**

Os Acms utilizados para a imunocitoquímica e a análise de SCAFs estão indicados no quadro 1. As células Tie-2+ obtidas da leucaferese de voluntários normais deram um número suficiente de células para realizar várias análises imunocitoquímicas. As células Tie-2+ cresceram em placas de cultura de tecido revestidas com fibronectina. Deixou-se as células ligarem-se (24 horas) antes de se corarem com vários marcadores específicos das CEs. As células ou foram deixadas sem serem tratadas ou foram estimuladas com FNT- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , durante 14 horas. Para a imunocitoquímica, fixaram-se as células utilizando acetona a 30 % em metanol, durante 1 min. Depois de duas lavagens com STF, bloquearam-se as células utilizando albumina de soro bovino (ASB) a 1 %, em STF, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Lavaram-se as células duas vezes com STF e incubaram-se com os anticorpos primários mencionados antes diluídos a 1:100 (em STF), a 4 °C, durante 2 horas. O anticorpo secundário foi uma IgG anti-murganho de cabra, conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluído a 1:500 (em STF). Após a incubação durante 1 hora, a 4 °C, lavaram-se as células duas vezes e analisaram-se com um microscópio de fluorescência.

**EXEMPLO 5: Ensaio de citometria de fluxo para a detecção de anticorpos de células anti-endoteliais**

Fez-se o estudo de 50 soros de pacientes com transplante de rim. Ao longo dos últimos anos (1988-2001) os soros pré-transplante de pacientes que transplantaram um rim têm sido meticulosamente caracterizados, utilizando vários processos, para avaliar a presença de anticorpos de ALH específicos de células endoteliais e reactivos aos monócitos endoteliais, que se verificou que estavam associados a rejeições. Durante estes anos, recolheram-se 15 soros pré-transplante caracterizados como tendo quer anticorpos anti-EM ou específicos de CE, a partir de pacientes não alo-imunizados com rejeições.

Os processos gerais aqui descritos baseiam-se nesses 15 soros. A caracterização anterior mostrou que dez soros deram reacções positivas linhas de células endoteliais de veias umbilicais humanas (CEVUHs) e monócitos (quadro 2, pt. n.ºs. 1-10) e cinco soros com apenas CEs (quadro 2, pt. n.ºs. 11-15). Dado que nenhum dos quinze pacientes com anticorpos específicos de EM ou CE tinham sido alo-imunizados, não se encontraram alo-anticorpos de ALH detectáveis nestes soros. Além disso, dez dos soros de pacientes alo-imunizados, bem caracterizados, continham apenas anticorpos de ALH da classe I ou apenas da classe II, que se seleccionaram (quadro 2). Como controlos, também se analisaram 25 soros de pacientes sem rejeições de enxertos.

Utilizando estes soros, determinou-se se as células Tie-2+ isoladas podiam ser alvos apropriados para a detecção de anticorpos relevantes sob o ponto de vista clínico em transplantes de órgãos renais. Utilizou-se, como um controlo positivo, um conjunto de soros de pacientes que tinham

formado alo-anticorpos em resultado de transfusões múltiplas de sangue ou transplantes de órgãos. Os soros de machos saudáveis, sem transfusão, do grupo sanguíneo AB, serviram como controlos negativos. Os anticorpos que se seguem, fragmentos de F(ab')<sub>2</sub> conjugados com FITC de IgG anti-humana de cabra (específica de Fc) ou IgM (Immunotech, USA) foram os que se utilizaram. Para a citometria de fluxo ECXM acoplaram-se 100.000 células Tie-2+ a pérolas, que se utilizaram no processo que foi desenvolvido tal como se descreveu antes. Analisaram-se as células num equipamento de citometria de fluxo Becton Dickinson (FACSorter). Uma deslocação na fluorescência média de 10 canais na amostra de ensaio, quando comparada com o controlo negativo, foi considerada como positivo, determinado como se descreveu aqui antes. Este valor é arbitrário e deve ser determinado para cada laboratório de transplante. Também se utilizaram as células Tie-2+ em ensaios de rotina de microcitotoxicidade imunomagnética, tal como descrito aqui noutra local. Além disso, analisaram-se as células Tie-2+ imediatamente após o isolamento, no equipamento de citometria de fluxo para todos os marcadores de superfície das células endoteliais (quadro 1).

**EXEMPLO 6: Imunocitoquímica e análise por SCAF dos marcadores de células endoteliais em células Tie-2+ isoladas**

Obtiveram-se CEs Tie-2+ de sangue periférico humano por selecção de pérolas magnéticas. A análise por SCAF mostrou que aproximadamente  $3 \pm 4$  % de SMCPs eram Tie-2+ (Fig. 1). Passadas 24 horas em cultura, a maior parte das células Tie-2+ ligadas às placas de 24 cavidades revestidas com fibronectina tornaram-se aderentes. Inicialmente, estas células apareceram quer como células simples quer como conjuntos de células redondas que, passados alguns dias de

cultura, se converteram em células aderentes com o citoplasma expandido. Passados 4 dias da cultura, as células desenvolveram-se gradualmente com a forma de fuso (Fig. 2a-c).

A Figura 3 e o Quadro 1 resumem os resultados das análises de imunocitoquímica utilizando anticorpos para antigénios conhecidos de células endoteliais. Logo às 0 horas, a análise por SCAF indicou que as células Tie-2+ expressaram o receptor de acLDL, FvW, RFCEV-1 e indicaram uma forma expressão dos antigénios de ALH da classe I e de ALH da classe II. É importante notar que as células expressaram o antigénio MICA importante sob o ponto de vista clínico, embora de uma forma fraca. Depois da activação da citocina, as células expressaram tanto as moléculas de adesão específicas das células endoteliais CD62 E (E-selectina) e CD106 (VCAM), assim como, aumentaram a expressão de ALH da classe II. Assim, tanto a imunocitoquímica como a análise por SCAF indicaram que as células Tie-2+ expressam maioritariamente marcadores de células endoteliais.

#### **EXEMPLO 7: Detecção de anticorpos reactivos de células anti-endoteliais**

Em média, pode obter-se aproximadamente,  $3 \pm 4 \times 10^4$  células Tie-2+/ $10^6$  CMSPs a partir de cada dador. Dado que se analisou um grande número de soros, as células Tie-2+ foram isoladas a partir de produtos de leucaferese de dadores de sangue saudáveis. Os resultados estão ilustrados no quadro 2. Os 10 soros conhecidos por terem anticorpos de monócitos endoteliais e 5 soros com anticorpos específicos de células endoteliais mostraram vários modelos de reactividade com o painel de células Tie-2+ de seis dadores diferentes. Contudo, as fracções de Tie-2 que incluíam os linfócitos dos mesmos

dadores, não reagiram com nenhum dos soros. O modelo de reactividade, com o painel de células Tie-2+ tanto dos anticorpos de monócitos endoteliais como dos anticorpos específicos de células endoteliais podem ver-se no quadro 2, que indica a existência de polimorfismo nestes sistemas antigénicos ou, alternativamente, a presença de anticorpos com especificidades variadas.

Os soros conhecidos por conterem apenas anticorpos reactivos de uma forma alargada a HIT da classe I também deram reacções positivas em todos os exemplos com células Tie-2+ de dadores únicos. A reactividade dos alo-anticorpos de ALH da classe II (especificidades limitadas) também foi observada com células Tie-2+ não estimuladas. 3/25 (12 %) dos soros de pacientes de controlo sem rejeições e com funções do enxerto estáveis deram reacções positivas com quatro dos dadores do painel de Tie-2 (Quadro 2). Os resultados obtidos utilizando o ensaio de microcitotoxicidade imuno-magnética estavam de acordo com as análises de citometria de fluxo (quadro 3).

**EXEMPLO 8: Prova directa de compatibilidade de células endoteliais específicas do dador**

Realizaram-se retrospectivamente provas directas de compatibilidade de células endoteliais específicas do dador em dois casos quando houve disponibilidade de células mononucleares de sangue periférico congeladas do dador. Os primeiros enxertos de rim de ambos os pacientes foram perdidos em rejeições hiper-agudas na ausência de anticorpos de ALH demonstráveis específicos do dador. A prova directa de compatibilidade dos soros de um destes pacientes foi feita previamente e foi bem caracterizado como tendo anticorpos específicos de células anti-endoteliais utilizando CEVUHs.

Neste exemplo, as células Tie-2+ das células mononucleares de sangue periférico deste paciente (ponto n°. 11, quadro 2), primeiro dador (pai) foram isoladas e conservadas congeladas em N<sub>2</sub> líquido. Realizou-se retrospectivamente uma prova directa de compatibilidade com o soro do paciente retirado imediatamente antes do primeiro transplante. Os resultados estão ilustrados na figura 4b-d. Os resultados de um segundo caso (ponto n°. 12, quadro 2) são muito semelhantes ao ponto n°. 11 e estão ilustrados na figura 4e-g. Como se pode ver no quadro 2, os soros de ambos estes pontos dão modelos de reactividade semelhantes com o painel das células Tie-2+. Não se observou reactividade com as fracções de Tie-2.

**Quadro 1**

<b>Anticorpos utilizados na coloração imunocitoquímica e na análise citométrica do fluxo de células Tie-2+ isoladas de sangue completo</b>			
<b>Anticorpos</b>	<b>Empresa</b>	<b>Imunocitoquímica</b>	<b>SCAF</b>
CD1a	Becton Dickinson (BD) -EUA	-	-
CD3	BD	-	-
CD14	BD	(+)/+	(+)/+
CD19	BD	-	-
CD31	BD	-	-
CD34	BD	-	-
CD56+16	BD	-	-
CD68	BD	++	++
CD83	BD	-	-
CD62E (anti-selectina E)	Biogenesis-UK	++	++
CD106 (anti-VCAM)	Biogenesis-UK	+++	+++
CD54 (anti-ICAM)	R&D Systems-UK	++	++
FvW	SEROTEC-UK	++	++
Ac-LDL	Molecular Probes, Inc-USA	+++	+++
VEGF-R1 (Flt-1)	R&D Systems	+++	+++

Anticorpos utilizados na coloração imunocitoquímica e na análise citométrica do fluxo de células Tie-2+ isoladas de sangue completo			
MHC classe I	Serotee-UK	+++	+++
MHC classe II	Serotec-UK	+	++
MICA	Dr. Thomas Spies	(+)/+	(+)/+
Anti-Fibroblasto	Serotec-UK	-	-
Anti- $\alpha$ -actina	Boebring Mannheim-Germany	-	-

(+), coloração fraca ou inconsistente; +, coloração moderada; ++, coloração forte; +++, coloração muito forte; FvW, factor de von Willebrand; Ac-LDL, lipoproteína de baixa densidade acetilada; MICA, cadeia A relacionada com o complexo principal de histocompatibilidade.

\* expresso em células Tie-2+ apenas depois da activação com FNT-alfa e IFN-gama, durante 12-14 horas.

**Quadro 2**

Análise do fluxo citométrico da reactividade de anticorpos anti-monócitos endoteliais, anticorpos específicos das células endoteliais e anticorpos específicos de ALH da classe I ou da classe II com um painel de células Tie-2+						
Pt. N°.	Dador 1 Tie2+/Tie2-	Dador 2 Tie2+/Tie2-	Dador 3 Tie2+/Tie2-	Dador 4 Tie2+/Tie2-	Dador 5 Tie2+/Tie2-	Dador 6 Tie2+/Tie2-
<b>Soros conhecidos por conterem anticorpos reactivos a EM</b>						
1	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
2	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
3	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
4	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-
5	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-
6	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-
7	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-
8	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-
9	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-
10	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-
<b>Soros conhecidos por conterem anticorpos específicos de CE</b>						
11	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	-/-
12	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	-/-
13	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-
14	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-
15	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-
<b>Soros conhecidos por conterem apenas anticorpos reactivos de uma forma ampla de ALH da classe I (n = 5)</b>						
16	+++	+++	+++	+++	+++	+++

<b>Análise do fluxo citométrico da reactividade de anticorpos anti-monócitos endoteliais, anticorpos específicos das células endoteliais e anticorpos específicos de ALH da classe I ou da classe II com um painel de células Tie-2+</b>						
<b>Soros conhecidos por conterem apenas anticorpos de ALH da classe II (n = 5)</b>						
17	++	-/-	-/-	++	-/-	++
<b>Soros de controlo para os pontos com uma função de enxerto estável (n = 25)</b>						
18	-/-*	-/-	-/-*	-/-	-/-	-/-*
* 3/25 (12 %) de soros que reagiram com algumas das células Tie-2 no painel						

### Quadro 3

<b>Reactividade de anticorpos anti-monócitos endoteliais, anticorpos específicos das células endoteliais e anticorpos específicos de ALH da classe I ou da classe II com um painel de células Tie-2+ utilizando o ensaio de microcitotoxicidade</b>						
<b>Pt. N°.</b>	<b>Dador 1 Tie2+/Tie2-</b>	<b>Dador 2 Tie2+/Tie2-</b>	<b>Dador 3 Tie2+/Tie2-</b>	<b>Dador 4 Tie2+/Tie2-</b>	<b>Dador 5 Tie2+/Tie2-</b>	<b>Dador 6 Tie2+/Tie2-</b>
<b>Soros conhecidos por conterem anticorpos reactivos a EM</b>						
1	++/-	+++/-	++/-	++/-	++/-	+++/-
2	++/-	+/-	+++/-	++/-	+++/-	++/-
3	+++/-	++/-	++/-	++/-	++/-	++/-
4	+++/-	-/-	-/-	+++/-	-/-	+++/-
5	-/-	++/-	++/-	++/-	++/-	-/-
6	-/-	++/-	++/-	++/-	++/-	-/-
7	-/-	++/-	++/-	++	++/-	-/-
8	-/-	-/-	-/-	++/-	-/-	++/-
9	+++/-	++/-	-/-	-/-	++/-	-/-
10	++/-	++/-	-/-	-/-	++/-	-/-
<b>Soros conhecidos por conterem anticorpos específicos de CE</b>						
11	+++/-	++/-	-/-	+++/-	-/-	-/-
12	++/-	+++/-	-/-	++/-	-/-	-/-
13	-/-	-/-	++/-	-/-	++/-	++/-
14	-/-	-/-	++/-	-/-	++/-	++/-
15	-/-	-/-	++/-	-/-	++/-	++/-
<b>Soros conhecidos por conterem apenas anticorpos reactivos de uma forma ampla de ALH da classe I (n = 5)</b>						
16	+++/>+++	+++/>+++	+++/>++++	+++/>+++	+++/>+++	+++/>+++
<b>Soros conhecidos por conterem apenas anticorpos de ALH da classe II (n = 5)</b>						
17	+++/>+++	-/-	-/-	+++/>+++	-/-	+++/>+++
<b>Soros de controlo para os pontos com uma função de enxerto estável (n = 25)</b>						
18	-/-*	-/-	-/-*	-/-	-/-	-/-
* 2/25 (8 %) de soros que reagiram com algumas das células Tie-2 no painel; -,						

**Reactividade de anticorpos anti-monócitos endoteliais, anticorpos específicos das células endoteliais e anticorpos específicos de ALH da classe I ou da classe II com um painel de células Tie-2+ utilizando o ensaio de microcitotoxicidade**

**negativo; +, 10-25 %; ++, 26-50 %; +++, 51-75 %; +++, 76-100 % de células mortas.**

## **REFERÊNCIAS**

Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Posborg-Petersen V, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. Lancet 1966; 2: 662.

Ting A. Positive crossmatches-when is it safe to transplant? Transplant Int. 1989; 2: 2.

Sumitran-Karuppan S. The clinical importance of choosing the right assay for detection of HLA-specific donor-reactive antibodies. Transplantation 1999; 68: 502.

Chapman JR, Taylor CJ, Ting A, Morris PJ. Immunoglobulin class and specificity of antibodies causing positive T cell crossmatches. Relationship to renal transplant outcome. Transplantation 1989; 42: 608.

Brasile L, Rodman E, Shield CFd, Clarke J, Cerilli J. The association of antivascular endothelial cell antibody with hyperacute rejection: a case report. Surgery 1986; 99: 637.

Sumitran-Karuppan S, Tyden G, Reinholt F, Berg U, Moller E. Hyperacute rejections of two consecutive renal allografts and early loss of the third transplant caused by non-HLA antibodies specific for endothelial cells. Transplant Immunol. 1997; 5: 321.

Cerilli J, Brasile L Endothelial cell alloantigens. Transplant. Proc. 1980; 12 (3 Suppl 1): 37.

Stastny P. Endothelial-monocyte antigens. *Transplant. Proc.* 1980; 12 (3 Suppl 1): 32.

Pierce JC, Waller M, Phibbs M. A mixed antiglobulin test with kidney cells in suspension for IgG antibody in human allograft recipients. *Transplantation* 1975; 19: 343.

Wilson CB. Individual and strain differences in renal basement membrane antigens. *Transplant. Proc.* 1980; 12 (3 Suppl 1): 69.

Paul LC, Carpenter CB. Antibodies against renal endothelial alloantigens. *Transplant Proc.* 1980; 12 (3 Suppl 1): 43.

Mohanakumar T, Waldrep JC, Phibbs M, Mendez-Picon G, Kaplan AM, Lee HM. Serological characterization of antibodies eluted from chronically rejected human renal allografts. *Transplantation* 1981; 32: 61.

Hosenpud JD, Everett JP, Morris TE, Mauck KA, Shipley GD, Wagner CR. Cardiac allograft vasculopathy. Association with cell-mediated but not humoral alloimmunity to donor-specific vascular endothelium. *Circulation* 1995; 92: 205.

Perrey C, Brenchley PE, Johnson RW, Martin S. An association between antibodies specific for endothelial cells and renal transplant failure. *Transplant Immunol.* 1998; 6: 101.

Kalil J, Guilherme L, Neumann J, et al. Humoral rejection in two HLA identical living related donor kidney transplants. *Transplant. Proc.* 1989; 21 (1 Pt 1): 711.

Sumitran-Holgersson S, Wilczeck H, Holgersson J e Söderström K: Identification of the non-classical HLA molecules, MICA, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejections of kidney allografts. Accepted. Transplantation.

Cerilli J, Bay W, Brasile L: The significance of the monocyte crossmatch in recipients of living-related HLA identical kidney graft. Hum Immunol. 1983; 7: 45.

Ianhez L, Saldanha LB, Paula FJ et al: Humoral rejection with negative crossmatches. Transplant Proc. 1989; 21: 720.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 1997; 275: 964.

Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. Blood 2000; 95: 952.

Vartdal F, Gaudemack G, Funderud S, Brattie A, Lea T, Ugerstad S and Thorsby E: HLA class I and II typing using cells positively selected from blood by immunomagnetic isolation- a fast and reliable technique. Tissue Antigens 1986; 28: 301.

Sumitran-Karuppan S, Lindholm A, Möller E: Fewer acute rejection episodes and improved outcome in kidney transplanted patients with changed selection of criteria based on cross-matching? Transplantation 1992; 53: 666.

Sumitran-Karuppan S, Moller E: Specific inhibition of HLA class I and II antibodies by soluble antigens- A method for

the identification of antibody specificity in sera from alloimmunized individuals. *Transplantation* 1994; 58: 713.

Sumitran-Karuppan S, Moller E. The use of magnetic beads coated with soluble HLA class I or class II proteins in antibody screening and for specificity determinations of donorreactive antibodies. *Transplantation* 1996; 61: 1539.

Moraes JR, Moraes ME, Luo Y, Stastny P: Alloantibodies against donor epidermis and early kidney transplant rejection. *Transplantation* 1991; 51: 370.

Schnurch H, Risau W. Expression of Tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Development* 1993; 119: 957.

Wolf AS, Yuan HT. Angiopoietin growth factors and Tie receptor tyrosine kinases in renal vascular development. *Pediatr Nephrol.* 2001; 16: 177.

Lisboa, 17 de Fevereiro de 2010.

## REIVINDICAÇÕES

1. Processo de isolamento de um precursor de células endoteliais a partir de uma amostra biológica caracterizado pelo facto de compreender:

(a) o contacto de uma amostra contendo ou que se suspeita que contenha um precursor de células endoteliais com um reagente de detecção para formar um complexo de reagente de detecção / precursor de células endoteliais; e

(b) separação do complexo de reagente de detecção / precursor de células endoteliais da amostra biológica, isolando assim o precursor de células endoteliais,

em que o reagente de detecção é um anticorpo específico contra Tie-2 e

em que o precursor de células endoteliais é negativo para CD34.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a amostra se seleccionar no grupo que consiste em sangue completo, soro, células mononucleares de sangue periférico e produto de leucaferese.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o anticorpo estar ligado a um suporte sólido.

4. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de o suporte sólido ser uma pérola magnética, não magnética ou para-magnética.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a separação ser feita por citometria de fluxo ou por um campo magnético.
6. Processo de prova directa de compatibilidade de um dador e de um receptor, caracterizado pelo facto de compreender:
  - (a) o isolamento de um precursor de células endoteliais de um dador, de acordo com o processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 5; e
  - (b) o rastreio de uma amostra do receptor quanto à reactividade com o precursor isolado das células endoteliais;

em que o facto de não haver reactividade na amostra do receptor com o precursor isolado das células indicar compatibilidade entre o dador e o receptor.

7. Processo de diagnóstico *ex vivo* de um distúrbio vascular ou relacionado com a auto-imunidade num indivíduo, caracterizado pelo facto de compreender:
  - (a) o isolamento de um precursor de células endoteliais de acordo com o processo da reivindicação 1;
  - (b) o contacto do precursor de células endoteliais com uma amostra contendo ou que se suspeita que contenha um auto-anticorpo do indivíduo; e
  - (c) a identificação de um complexo de auto-anticorpo/precursor de células endoteliais, se presente

em que a presença do complexo indica a presença do distúrbio no indivíduo.

8. Processo de determinação *ex vivo* da eficácia do tratamento ou da avaliação do prognóstico de um distúrbio vascular ou relacionado com a auto-imunidade num indivíduo, caracterizado pelo facto de compreender:

(a) o isolamento de um precursor de células endoteliais de acordo com o processo da reivindicação 1;

(b) o contacto do precursor de células endoteliais com uma amostra contendo ou que se suspeita que contenha um auto-anticorpo do indivíduo; e

(c) a medição de um complexo de auto-anticorpo/precursor de células endoteliais, se presente, para traçar um perfil do indivíduo; e

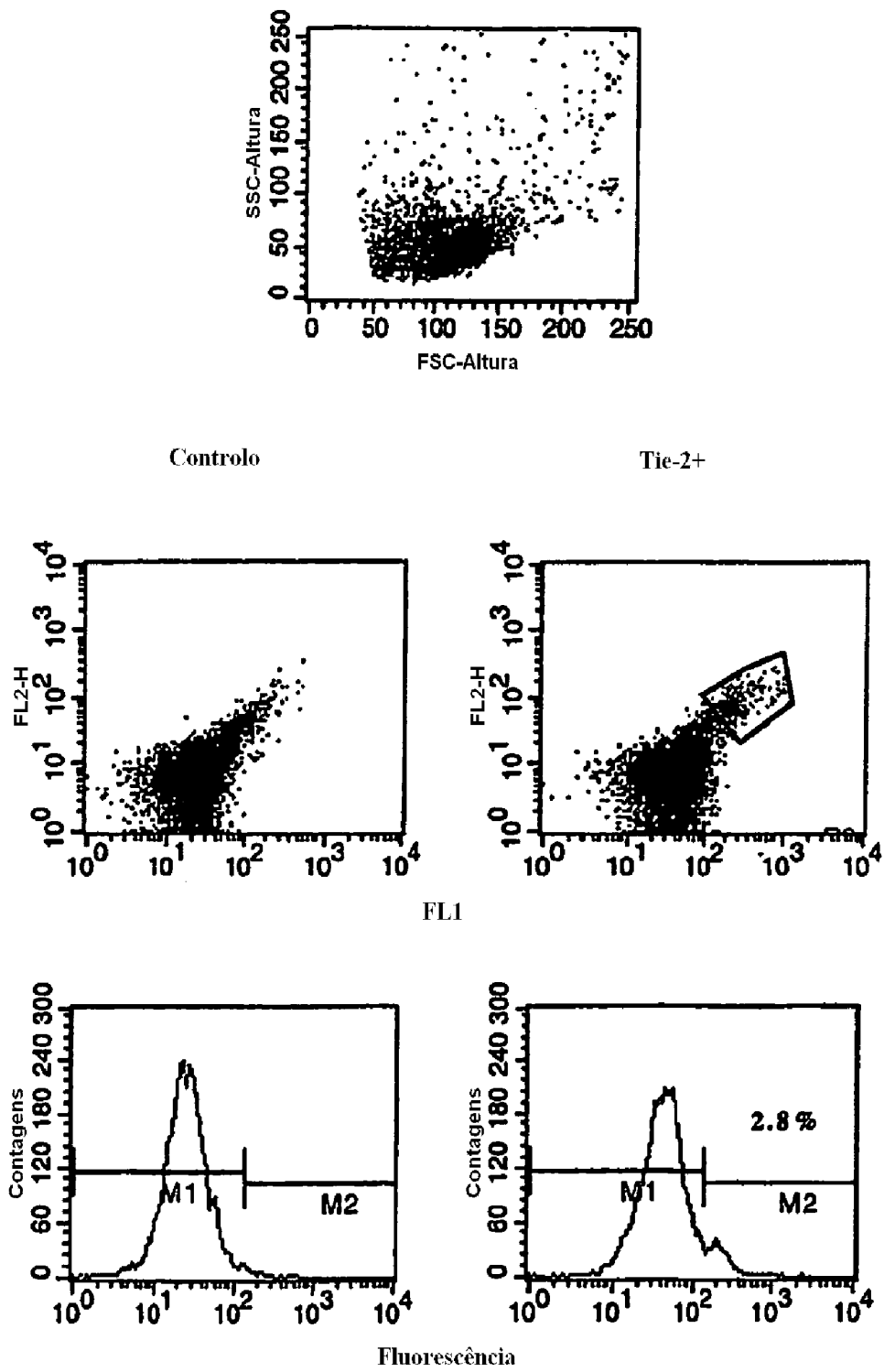
(d) a comparação do perfil do indivíduo com um perfil de referência,

em que a semelhança entre o perfil do indivíduo e o perfil de referência indica que o tratamento é eficaz e um prognóstico favorável para o indivíduo.

9. Processo de acordo com as reivindicações 7 ou 8, caracterizado pelo facto de o distúrbio se seleccionar no grupo que consiste em vasculite, aterosclerose, distúrbios hemorrágicos, dificuldades de sarar feridas e transplantes.

Lisboa, 17 de Fevereiro de 2010.

Figura 1



**Figure 2**

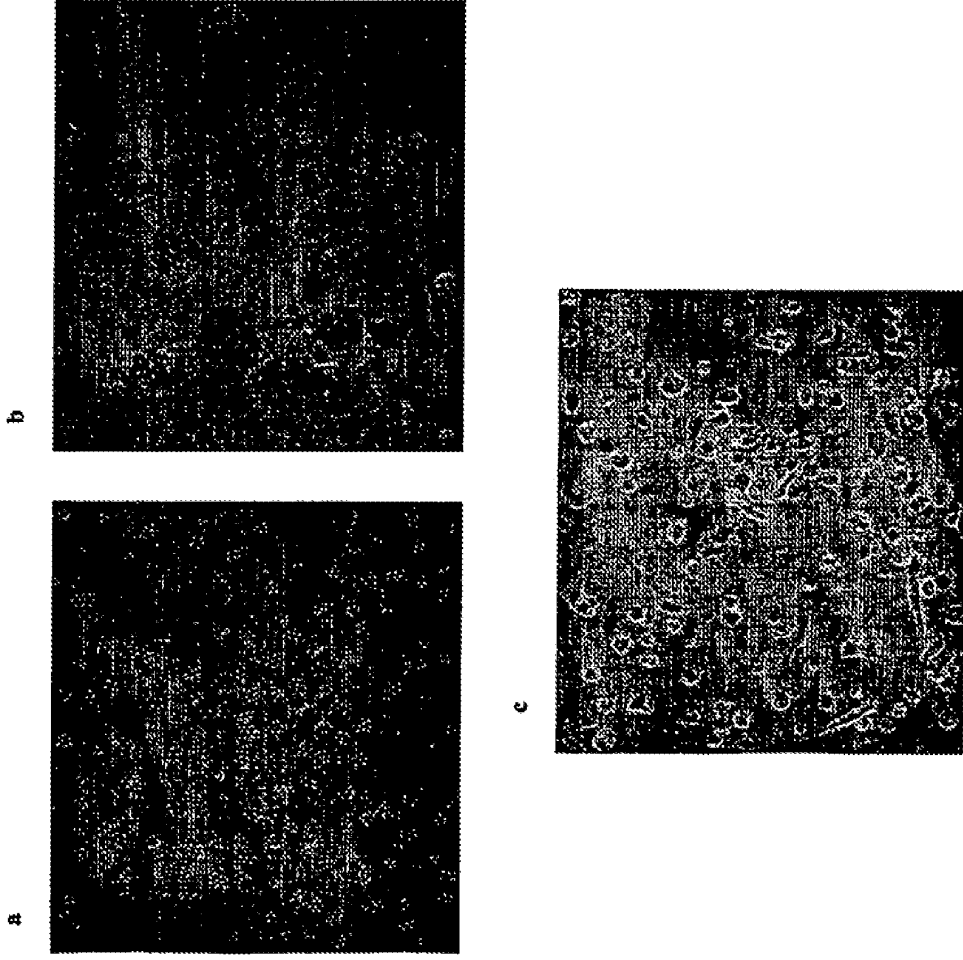


Figura 3

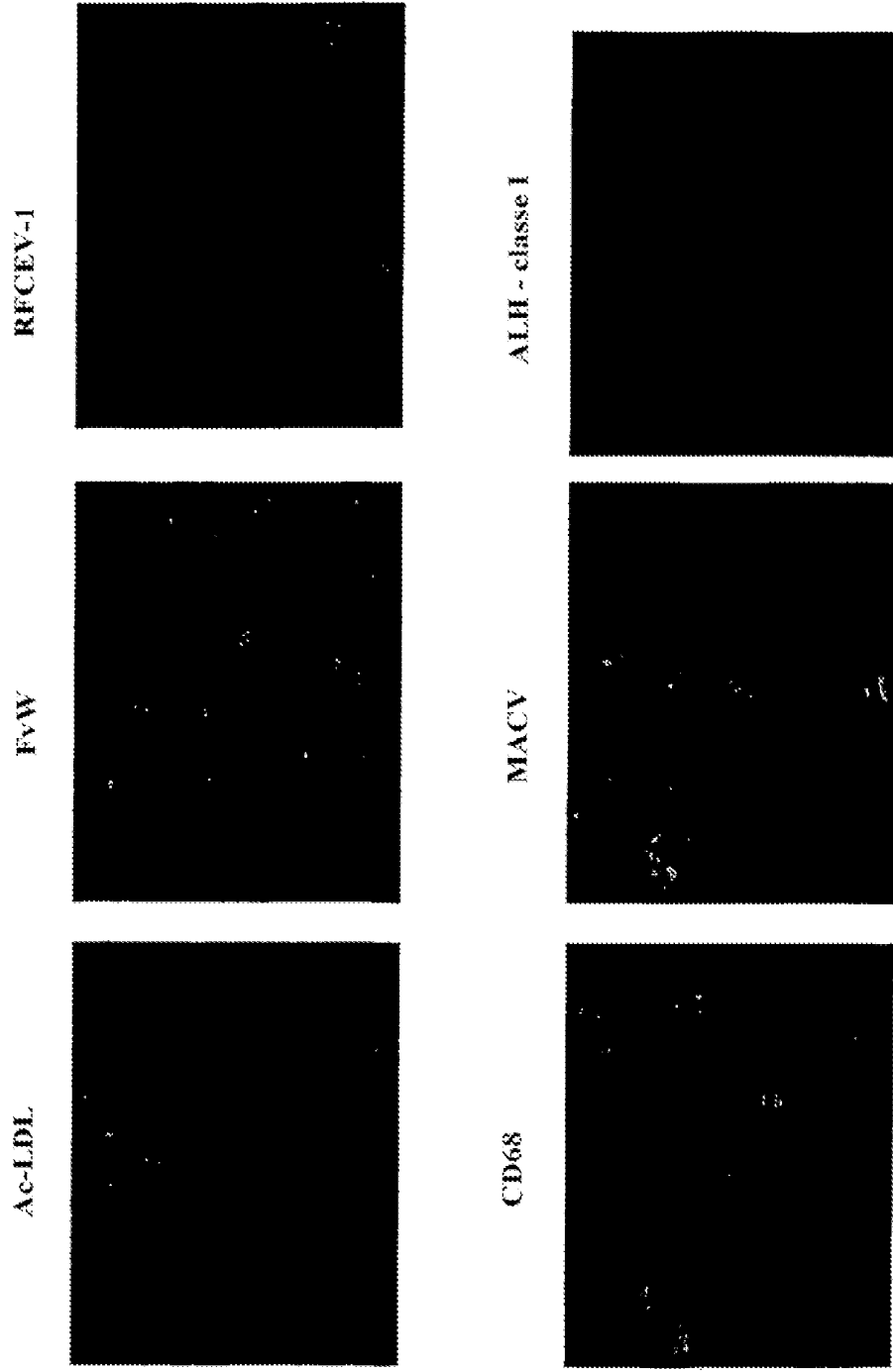


Figura 3b

### Expressão de MICA e ALH da classe II

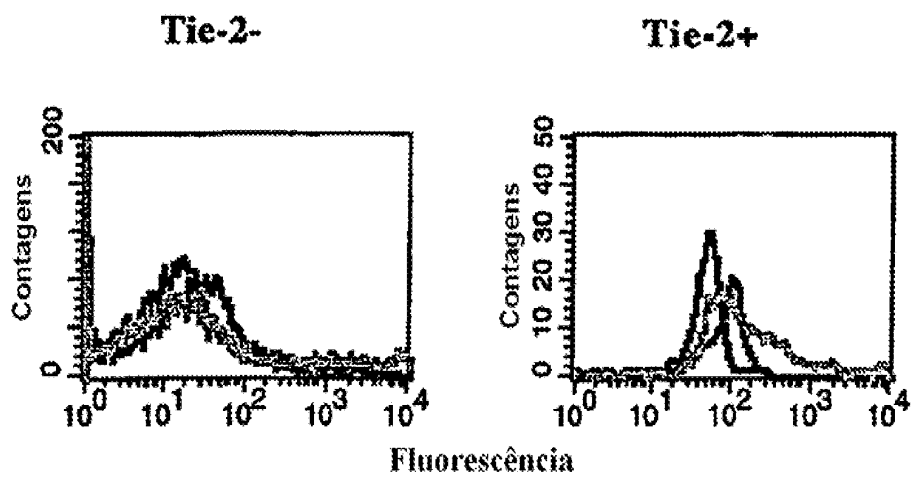


Figura 4

Prova directa de compatibilidade de Tie-2+  
(células endoteliais) específicas do dador

