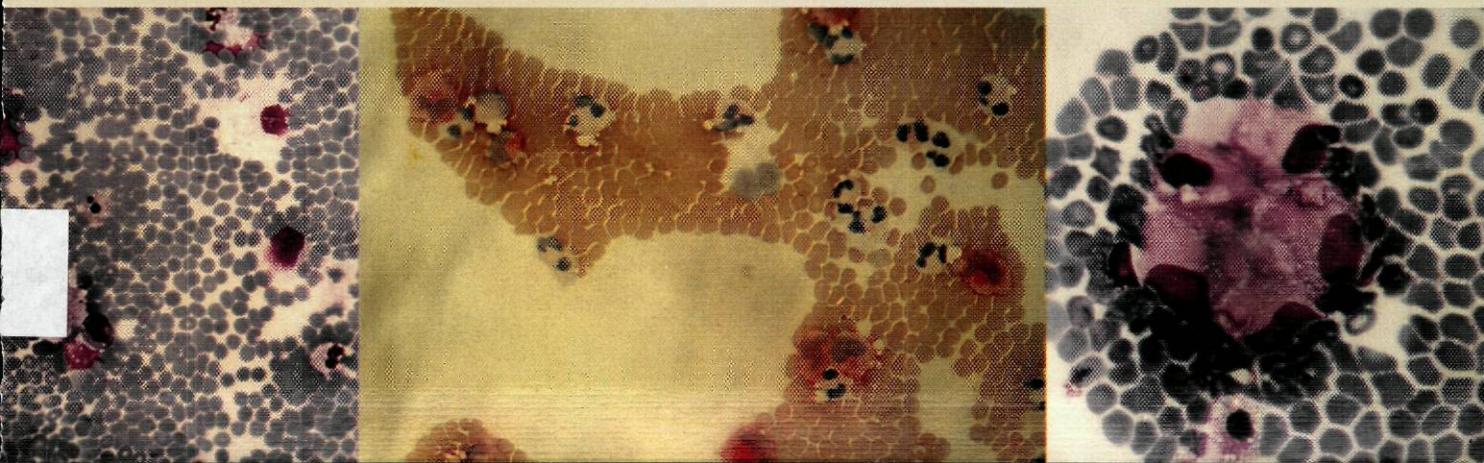


José Gerardo Gonçalves de Oliveira

Estudo da dinâmica das células infiltrantes
no aloenxerto renal

Porto - 1997



José Gerardo Gonçalves de Oliveira

**Estudo da dinâmica das células infiltrantes no
aloenxerto renal**

**Dissertação de Candidatura ao Grau de Doutor apresentada à Faculdade de
Medicina do Porto**

Porto . 1997

Artº 48º, #3º

“A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação”

(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto, 29 de Janeiro de 1931, Decreto nº 1937).

Título: Estudo da dinâmica das células infiltrantes no aloenxerto renal
Autor: José Gerardo Gonçalves de Oliveira
Edição: Do autor
Impressão: Medisa - Edição e Divulgações Científicas, Lda
Ano: 1997
Copyright: © José Gerardo Gonçalves de Oliveira

Corpo Catedrático da Faculdade de Medicina do Porto

Professores efectivos

Doutor José Fernando Barros Castro Correia
Doutor Daniel dos Santos Pinto Serrão
Doutor Amândio Gomes Sampaio Tavares
Doutor António Carvalho Almeida Coimbra
Doutor António Manuel Sampaio Araújo Teixeira
Doutor Mário José Cerqueira Gomes Braga
Doutor José Augusto Fleming Torrinha
Doutor Joaquim Germano Pinto Machado Correia Silva
Doutor Serafim Correia Pinto Guimarães
Doutor Manuel Miranda Magalhães
Doutor José Carvalho de Oliveira
Doutor António Alberto Falcão de Freitas
Doutor António Fernandes Oliveira Barbosa Ribeiro Braga
Doutor Valdemar Miguel Botelho Santos Cardoso
Doutor Victor Manuel Oliveira Nogueira Faria
Doutor António Augusto Lopes Vaz
Doutor António Luís Tomé Rocha Ribeiro
Doutor Levi Eugénio Ribeiro Guerra
Doutor José Manuel Costa Mesquita Guimarães
Doutor Celso Renato Paiva Rodrigues da Cruz
Doutor Cândido Alves Hipólito Reis
Doutor Alexandre Alberto Guerra Sousa Pinto
Doutor Eduardo Jorge Cunha Rodrigues Pereira
Doutor António Germano Pina Silva Leal
Doutor Manuel Augusto Cardoso de Oliveira
Doutor Norberto Teixeira Santos
Doutor Manuel Maria Paula Barbosa

Doutor Manuel Machado Rodrigues Gomes
Doutora Maria Conceição Fernandes Marques Magalhães
Doutor Carlos Rodrigo Magalhães Ramalhão
Doutor Luís António Mota Prego Cunha Soares de Moura Pereira Leite
Doutor José Vaz Saleiro e Silva
Doutor Manuel Alberto Coimbra Sobrinho Simões
Doutor Francisco José Zarco Carneiro Chaves
Doutor Jorge Manuel Mergulhão Castro Tavares
Doutora Maria Isabel Amorim de Azevedo
Doutor Henrique José Ferreira Gonçalves Lecour de Meneses
Doutora Maria Amélia Duarte Ferreira
Doutor José Agostinho Marques Lopes
Doutor Patrício Manuel Vieira Araújo Soares da Silva
Doutor Daniel Filipe de Lima Moura

Professores Jubilados e Aposentados

Doutor Abel José da Costa Sampaio Tavares

Doutor Albano dos Santos Pereira Ramos

Doutor António Fernandes da Fonseca

Doutor Artur Manuel Giesteira de Almeida

Doutor Aureliano da Fonseca

Doutor Casimiro Águeda de Azevedo

Doutor Fernando Carvalho Cerqueira Magro Gomes Ferreira

Doutor Francisco de Sousa Lé

Doutor João da Silva Carvalho

Doutor Joaquim Oliveira da Costa Maia

Doutor José Manuel Gonçalves Pina Cabral

Doutor José Pinto de Barros

Doutor Júlio Machado de Sousa Vaz

Doutor Manuel José Bragança Tender

Doutor Manuel Teixeira Amarante Júnior

Doutor Walter Friedrich Alfred Osswald

Doutor Wilhelm Ludwig Osswald

Ao Professor Doutor Levi Eugénio Ribeiro Guerra

Ao Dr. Armando Augusto Mendes

Curiosamente, o meu primeiro encontro com a Imunologia Clínica engendrou mais resistência que atracção. Pareceu-me, de imediato, uma floresta densa, plena de falhas de conhecimento, mais ou menos colmatadas por teorias elegantes e frágeis.

A fisiologia apresentava-me um campo igualmente extenso, mas menos armadilhado. E foi para aí que dirigi a minha atenção preferencial. De tal maneira que, mesmo após o meu primeiro estágio no Hospital Hammersmith, de Londres, reputadíssimo em investigação em doenças imunes e onde, naturalmente, aprendi a gostar de Imunologia, principalmente na vertente das doenças auto-imunes, me propunha fazer um doutoramento nos Estados Unidos, sob a orientação do Prof. Doutor Robert Schrier, sobre mecanismos de transporte tubular renal. Quando solicitei a autorização do Prof. Doutor Levi Guerra, então Director do H. S. João, foi-me, por ele, sugerido reorientar-me para a área da transplantação renal.

Estagiei, então, em Bruxelas, como assistente do Prof. Doutor Charles van Ypersele, em vez de me doutorar em Denver.

Encarei este atraso na minha carreira como um serviço que prestava à instituição hospitalar a que pertencia, obrigado que me sentia a corresponder, com a minha pequena quota parte, aos esforços gigantescos que o Prof. Doutor Levi Guerra desenvolvia para redinamizar a transplantação renal.

Felizmente, aconteceu-me o melhor, ou seja, primeiro, aprendi a gostar de transplante renal depois, apaixonei-me.

Para o desenvolvimento deste trabalho, a segunda fase promotora foi marcada pela aprendizagem da biópsia aspirativa com agulha fina, em Oxford, com o Prof. Doutor David Hughes. A observação simultânea do sangue periférico e das punções aspirativas entusiasmou-me e fez-me vislumbrar imediatamente o enorme potencial de investigação que este exame poderia abrir.

Novamente, o Prof. Doutor Levi Guerra desempenhou papel primordial. Primeiro, porque me apoiou fortemente durante a difícil fase de aprendizagem dum teste de diagnóstico, depois, porque me estimulou continuamente a desenvolver o meu trabalho de investigação sobre as células das punções aspirativas.

Senti-me muito honrado quando o Prof. Doutor Levi Guerra aceitou ser o meu orientador e, ao longo destes anos, o seu estímulo, conselho e acompanhamento foram condições necessárias para levar a bom termo o projecto.

A maior parte dos trabalhos laboratoriais foram realizados no Centro de Histocompatibilidade do Norte (CHN), dirigido pelo Dr. Armando Mendes. Estou-lhe imensamente grato por me ter acolhido com extraordinária simpatia, por me ter aconselhado e incentivado. Pouco tempo demorou a sentir o CHN como a minha segunda casa de trabalho. O entusiasmo do Dr. Armando Mendes pelas investigações que eu ia desenvolvendo, levou-o comigo a Buenos Aires, para assistir ao VII Congresso Internacional de Citologia e Imunologia no Transplante, de que guardo as mais gratas recordações.

Ao Prof. Doutor Fleming Torrinha, devo agradecer o seu apoio e autorização para realizar parte da investigação, no Serviço de Imunologia da Faculdade de Medicina.

Ao Prof. Doutor David Hughes, devo muitas horas de trocas de impressões, de grande estímulo, encorajamento nos momentos mais difíceis e ensinamentos, de grande relevância para este trabalho. Gentilmente, doou todo o material usado nos estudos de imunocitoquímica apresentados e foi no seu laboratório, no Hospital John Radcliffe, de Oxford, que os fiz. Os contactos que o Prof. Doutor David Hughes me proporcionou, especialmente com os Profs. Doutores Ken Welsh e Jonathan Austyn, foram imensamente úteis e gratificantes.

Ao Prof. Doutor Mohamed Sayegh, o meu grande obrigado por me ter recebido no Laboratório de Immunogenetics do Hospital Brigham and Womens', de Boston. Aí realizei uma parte dos meus trabalhos de doseamentos de factores de crescimento e o seu entusiasmo pelos resultados preliminares então conseguidos, levou-o a fornecer-me gratuitamente os restantes kits necessários para completar o trabalho, no Porto.

Ao Prof. Doutor Cerqueira Magro, a convite de quem iniciei a minha actividade como docente voluntário da Faculdade de Medicina, agradeço o estímulo, simpatia e atenção com que sempre me honrou.

Ao Prof. Doutor Manuel Santos Rosa, agradeço os conselhos, ensinamentos e a extrema simpatia com que me recebeu.

Ao Prof. Doutor Manuel Pestana, agradeço a enorme amizade com que sempre me distinguiu e os encorajamentos, quer nos momentos mais complicados, quer nos mais felizes.

Aos Profs. Doutores Henrique Barros e Altamiro Pereira, agradeço o tempo e interesse que disponibilizaram na ajuda do tratamento estatístico.

Ao Dr. Sousa Fernandes, na altura responsável da Unidade de Nefrologia do H. S. João, o meu obrigado e reconhecimento por me ter autorizado e apoiado no início da realização das punções aspirativas, então apenas um meio de diagnóstico.

O Dr. Armando Mendes indicou a Dra D. Paula Xavier para me acompanhar e ajudar nos meus trabalhos. Durante estes quatro anos, uma relação de consideração e amizade foi crescendo, estimulada pela grande cooperação que frequentemente a levou a substituir-me no laboratório, quando os afazeres clínicos e férias mo impediram. As trocas diárias de impressões foram pertinentes no progresso dos meus trabalhos.

O Dr. João Pedro Ramos realizou os trabalhos de análise por citometria de fluxo, aqui apresentados. A sua enorme competência, entusiasmo, dedicação e boa vontade foram fundamentais. Várias vezes trabalhamos a horas bizarras, sempre com óptima disposição. Também entre nós se desenvolveu uma relação de grande amizade. Recordo que, durante uma visita do Prof. Doutor David Hughes ao H. S. João, levei-o ao Serviço de Imunologia e CHN e ele invejou-me pelo excelente ambiente de que beneficiava junto da teia de colaboradores/amigos, neste meu projecto.

À Dra. D. Barbara Murphy, o meu obrigado pela gentileza com que me recebeu em Boston, assim como pela colaboração prestada.

À Sra. D. Conceição Magalhães, agradeço o interesse e boa vontade, sempre manifestada na marcação das amostras no Serviço de Imunologia e que muito tempo lhe consumiu.

À Sra. D. Sandra Neto, o meu obrigado pelo trabalho e enorme disponibilidade que sempre mostrou, quando foi necessário substituir-me nos manuseamentos laboratoriais no CHN.

Às Sras D. Isaura Oliveira e D. Graciete Oliveira, agradeço reconhecidamente todo o trabalho e boa vontade nas colheitas de sangue aos doentes estudados.

Às Sras Enfermeiras e Srs Enfermeiros, agradeço a colaboração prestada para a realização das punções aspirativas.

Aos Colegas do Serviço de Nefrologia, agradeço o apoio e incentivos, que me ajudaram nestes anos de trabalho.

Aos Técnicos Superiores de saúde do CHN, agradeço a lhaneza e enorme simpatia com que me distinguiram, o entusiasmo e apoio prestados.

Ao Pessoal Administrativo e Auxiliar do Serviço de Nefrologia e do CHN, agradeço a amizade e ajudas dispensadas.

Ao laboratório Sandoz/Novartis, agradeço o prémio com que me distinguiu, importante, quer como estímulo, quer como suporte financeiro para a aquisição de kits para doseamento dos factores de crescimento celular.

Aos meus Pais, tenho procurado vindo a agradecer.

À minha Irmã, meu Cunhado e Sobrinho, meus vizinhos, o obrigado e desculpas por tantos trabalhos.

À minha Mulher, o obrigado pelo carinho desmedido, ajuda, compreensão e estímulo, em todos os momentos.

Índice

I- Introdução geral	1
II- Proliferação de culturas de biópsias aspirativas em transplantados renais	21
Introdução	21
Doentes e métodos	22
Análise de dados	26
Resultados	27
Discussão	34
III- Análise por citometria de fluxo dos linfócitos T no sangue periférico e infiltrantes nos rins transplantados	39
Introdução	39
Doentes e métodos	41
Análise de dados	44
Resultados	44
Discussão	61
IV- A nova formulação de CsA altera os subtipos de linfócitos T na circulação e dentro do aloenxerto renal	67
Introdução	67
Doentes e métodos	68
Análise de dados	71
Resultados	71
Discussão	75
V- A análise de citocinas presentes nos sobrenadantes de culturas de biópsias aspirativas permite a previsão e o diagnóstico de rejeição aguda no transplante renal	79
Introdução	79
Doentes e métodos	80
Análise de dados	83
Resultados	83
Discussão	87
VI- Monócitos-Macrófagos e citocinas/quemocinas em culturas de biópsias aspirativas: síntese aumentada de IL-1ra nos doentes com transplante renal livres de rejeição	95
Introdução	95
Doentes e métodos	96
Análise de dados	99
Resultados	100
Discussão	107

VII- Culturas de biópsias aspirativas de transplantados renais livres de rejeição produzem um factor solúvel supressor específico da resposta anti-dador	113
Introdução	113
Doentes e métodos	115
Análise de dados	119
Resultados	119
Discussão	125
VIII- Conclusões e Discussão Geral	131
Conclusões	131
Discussão geral	134
IX- Resumo	171
X- Summary	173
XI- Résumé	175
XII- Bibliografia	177

Os resultados apresentados nos Capítulos II, III, IV, V, VI e VII fazem parte das seguintes publicações

Oliveira G, Xavier P, Mendes A, Guerra LE (1994). Proliferation of cells obtained by FNAB at 7th and 30th days post-kidney transplant. *Kidney Int*, 45:285-286P.

Oliveira G, Ramos JP, Xavier P, Mendes A, Torrinha F, Guerra L (1994). FAC analysis of lymphocytes from peripheral blood and aspiration biopsies in renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol*, 5:1028P.

Oliveira G, Xavier P, Ramos JP, Neto S, Magalhães M, Torrinha F, Mendes A, Guerra L (1995). Effects of renal transplant fine needle aspirate cultures supernatants on mixed lymphocyte reactions with analysis by flow cytometry. *Nephrol Dial Transplant*, 10:1055P.

Oliveira G, Xavier P, Mendes A, Guerra LE (1995). Effects of renal transplant fine needle aspirate cultures supernatants on mixed lymphocyte reactions using donor-recipient combinations. *Eur J Immunogenetics*, 22:42P.

Oliveira G, Ramos JP, Xavier P, Magalhães M, Torrinha F, Mendes A, Guerra LE (1995). Analysis by FACs of lymphocyte subpopulations present in the peripheral blood (PBL) and fine needle aspiration biopsies (FNAB) in renal transplant patients (RTX). *J Am Soc Nephrol*, 6:1110P.

Oliveira G, Xavier P, Teixeira F, Ramos JP, Neto S, Magalhães M, Torrinha F, Guerra L (1995). Analysis of cytokines present in fine needle aspiration cultures supernatants and its effects on lymphocyte subpopulations. *J Am Soc Nephrol*, 6:1061P.

Oliveira G, Ramos JP, Xavier P, Magalhães M, Torrinha F, Mendes A, Guerra LE (1996). Comparative analysis of lymphocyte subpopulations in renal Tx patients treated with CsA and Neoral CsA. *Nephrol Dial Transplant*, 11:278P.

Oliveira G, Ramos JP, Xavier P, Murphy B, Magalhães M, Torrinha F, Sayegh MH, Guerra L (1996). Immunologic study of a case with recurrent focal and segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*, 7:1714P.

Oliveira G, Ramos JP, Xavier P, Magalhães M, Torrinha F, Mendes A, Mendes, Guerra L (1996). FACs analysis of lymphocyte subpopulations present in the peripheral blood and fine-needle aspiration biopsies in chronic rejecting renal Tx. *J Am Soc Nephrol*, 7:1891P.

Oliveira G, Xavier P, Murphy B, Mendes A, Sayegh MH, Guerra L (1996). Fine-needle aspiration biopsies cultures from chronic rejecting renal Tx patients produce IL-10 predominantly. *J Am Soc Nephrol*, 7:1891P.

Oliveira G, Xavier P, Murphy B, Neto S, Mendes A, Sayegh MH, Guerra L (1996). Cytokine analysis of human renal allograft aspiration biopsies predicts acute rejection. *J Am Soc Nephrol*, 7:1918P.

Oliveira G, Xavier P, Mendes A, Guerra LE (1997). Cultures of aspiration biopsies in the immunologic monitoring of renal transplants. *Nephron* (em publicação).

Oliveira JGG, Xavier P, Neto S, Mendes AA, Guerra LER (1997). Monocytes-Macrophages and cytokines/chemokines in fine-needle aspiration biopsies cultures: enhanced IL-1ra synthesis in rejection-free kidney transplant patients. *Transplantation* (em publicação).

Oliveira JGG, Ramos JP, Xavier P, Magalhães MC, Mendes AA, Guerra LER (1997).
Analysis of fine-needle aspiration biopsies by flow cytometry in kidney transplant
patients. Transplantation (em publicação).

Se a actividade não é mais que um hábito, é pelo menos um hábito excelente. Se me perguntais qual é o verdadeiro pecado hereditário da natureza humana, imaginais que vos respondo: é a soberba, ou a gula, ou a ambição, ou o egoísmo?

Não, direi que é a indolência. Quem vence a indolência vence todo o resto. Os bons princípios paralisam-se sem actividade mental.- Zimmermann

Glossário de Abreviaturas

APAAP - fosfatase alcalina-anti-fosfatase alcalina

AUC - área debaixo da curva

BAAF - biópsia aspirativa com agulha fina

CAA - célula apresentadora de antigéneo

CD - “cluster differentiation”

CIE - células infiltrantes no aloenxerto

Cmáx - concentração máxima

CMH/MHC - complexo major de histocompatibilidade

CML - cultura mista linfocitária

CPM - contagens por minuto

CsA - ciclosporina A

ELISA - aferição por método enzimático em meio sólido

Fc γ RI - parte constante do receptor I de imunoglobulina G

FITC - isotiocianato de fluoresceína

GM-CSF - factor de crescimento de colónias de granulócitos e macrófagos

HLA - antigéneos leucocitários humanos

ICAM-1 - molécula de adesão intercelular 1

IFN - interferão

IL - interleucina

IL-1ra - antagonista do receptor de interleucina 1

IL-4sR α - cadeia alfa do receptor solúvel de interleucina 4

LFA - antigéneo associado a função leucocitária

MCP-1 - proteína 1 quimotática de monócitos

M-CSF - factor estimulante de colónias de macrófagos

MIP-1 α - peptídeo 1 alfa inflamatório macrófágico

mRNA - ácido ribonucleico mensageiro

NK - “natural killers”

PBS - soro fisiológico com ph ajustado por fosfato

PCR - reacção amplificada por polimerase

PE - ficoeritrina

PERCP - proteína clorofilo perinidina

RPMI - Royal Park Memorial Institute

SIM - sandimmune

T - timócito

TGF- β - factor de transformação e crescimento beta

Th - timócito indutor

T0 - tempo pré-dose

VCAM-1 - molécula de adesão 1 da célula vascular

VLA - “very late antigen”

I- Introdução geral

O primeiro transplante renal com sucesso foi realizado, no ano de 1954, entre dois gémeos haploidênticos, no hospital Peter Bent Brigham, Boston (Tilney, 1986). Desde aí, um longo caminho foi percorrido, felizmente, recheado com mais histórias de sucesso do que com fracassos.

Em Portugal, o primeiro transplante renal foi feito, em Coimbra, pela equipa chefiada pelo Senhor Professor Doutor Linhares Furtado, no ano de 1975.

Este atraso tem sido recuperado de forma vigorosa, de tal modo que Portugal se encontra, actualmente, entre os primeiros cinco países do mundo com maior número de transplantes renais per capita.

Naturalmente, nestes 40 anos várias modificações ocorreram. Não foi só o número de transplantes que aumentou. Também a sobrevida do doente e do enxerto renal têm evoluído positivamente (Williams, 1995; Opelz, 1994; Suthanthiran e Strom, 1994), de tal forma que o transplante renal assumiu-se como a forma preferencial de tratamento da insuficiência renal crónica terminal para quase todas as doenças renais, sendo proposto para pacientes com idade mais avançada, englobando a faixa dos 65-70 anos (Heldeman, 1995). Na maior parte dos casos, a transplantação renal pode oferecer quantitativa e qualitativamente melhor sobrevida que a diálise (Krakauer e col., 1983; Williams, 1995).

A transplantação em geral e a do rim em especial, contribuiu de modo muito relevante para o avanço da Imunologia. São cada vez mais os imunologistas que se dedicam a tempo inteiro à investigação básica e clínica da transplantação. O aprofundamento dos conhecimentos sobre o sistema antigénico leucocitários do homem (HLA) muito deve ao mundo da transplantação (Rapaport e Dausset, 1995).

O primeiro transplante renal só foi possível porque o dador e o receptor eram gémeos univitelinos, caso raro na transplantação e privilegiado do ponto de vista de tolerância imunológica. Na realidade, os primeiros transplantes, feitos no início do século, quer em animais, quer no homem, apenas demonstraram a impossibilidade da sua realização com o recurso das técnicas então disponíveis, embora os relatos disponíveis não sejam suficientemente descritivos.

O início formal da era moderna da transplantação é assinalado pelos trabalhos iniciais de Medawar, sobre enxertos cutâneos alogénicos no coelho (Medawar, 1944). A motivação para estes estudos teve origem nos esforços denodados de

cirurgiões devotados ao tratamento dos pilotos da Força Aérea Britânica, brutalmente feridos durante a Batalha da Inglaterra, que frequentemente necessitavam de extensa cirurgia plástica reconstrutiva.

Os primeiros resultados, dramáticos para o mundo clínico e ao mesmo tempo extraordinariamente produtivos do ponto de vista científico, por possibilitaram o erguer do complexo edifício sobre a imunologia da rejeição do aloenxerto, levaram Medawar a afirmar que a transplantação estaria definitivamente proibida como tratamento no homem. Foi necessário esperar pelo desenvolvimento de drogas que permitissem ajudar a ultrapassar a formidável barreira da rejeição.

Inicialmente, foi demonstrado que a irradiação subletal por raios X de todo o corpo tinha capacidade de prolongar a sobrevida do aloenxerto, mas foi a descoberta da 6-mercaptopurina, em 1959, por Schwartz e Damashek (Schwartz e Damashek, 1959; Schwartz e Damashek, 1960) que permitiu a entrada tímida na fase de aplicação clínica da transplantação. Estes investigadores demonstraram que a 6-mercaptopurina induzia a tolerância imunológica em coelhos. Desde aí, o arsenal terapêutico não tem cessado de aumentar e já inclui corticosteróides (Goodwin e col., 1963), ciclosporina A (Calne e col., 1978), deoxispergualina (Yuh e Morris, 1993), tacrolimus (Starzl e col., 1989), ácido micofenólico (Sollinger e col., 1992), rapamicina (Calne e col., 1989), globulinas policlonais antilinfocíticas (Sheil e col., 1971) e timocíticas (Kreis e col., 1981), anticorpos monoclonais pan-células T (Cosimi, 1987), anticorpos monoclonais dirigidos para várias moléculas da superfície linfocitária (Isobe e col., 1992), alguns deles conjugados com toxinas bacterianas (Soulillou e col., 1990), e outros ainda em investigação mais atrasada, como brequinar (Makowka e col., 1993) e leflunomida (Kuchle e col., 1991). Este diverso e poderoso grupo de drogas, além do seu, mais ou menos eficaz, uso na clínica, tem permitido um maior conhecimento dos mecanismos, complexos e redundantes, implicados na rejeição do aloenxerto. De todos estes fármacos, destaca-se a ciclosporina A, nas duas vertentes enunciadas.

Vários motivos se podem encontrar para justificar este crescimento permanente do grupo de drogas imunossupressoras em uso ou em ensaio para a transplantação, mas certamente os mais determinantes podem ser divididos em dois tipos: um, os efeitos laterais dos fármacos disponíveis, outro, o estímulo para melhoria de resultados, especialmente a busca da pedra filosofal do mundo da transplantação, a tolerância imune.

Na actualidade, dois tipos de tratamento são usados, de forma quase universal, como manutenção pós-transplante: a associação de ciclosporina A com (metil)prednisolona ou o mais popular esquema em uso na Europa, a associação tripla de ciclosporina A com azatioprina e (metil)prednisolona. Os resultados, similares com os dois esquemas, podem ser considerados positivos.

Embora não haja dados exactos sobre a situação portuguesa e menos ainda sobre o Hospital de S. João do Porto, dado o recente início do programa de transplantação renal neste hospital, temos a indicação, através de comunicações em reuniões de nefrologia nacionais, que os resultados portugueses não deverão ser essencialmente diferentes dos observados na Europa, nomeadamente em Espanha. Neste país, a sobrevida do aloenxerto de rim de cadáver, aos cinco anos, é igual a 64%, na população adulta (Berthoux e col., 1996).

O preço a pagar em efeitos laterais está, no entanto, longe de ser desprezível. A ciclosporina A provoca um extenso leque de efeitos indesejáveis. Infelizmente é nefrotóxica, quer de forma aguda ou mais importante de modo crónico, pode provocar acidose hiperclorémica e hiperpotassemia, pode provocar um síndrome aparentado com o síndrome hemolítico-urémico, possui hepatotoxicidade, pode provocar pancreatite aguda, pode despoletar diabetes mellitus, hiperuricemia, gota, toxicidade neurológica com várias apresentações, desde a mais comum, o tremor, até às convulsões mais ou menos graves, hipertensão arterial, neoplasias, especialmente linfoma e outras complicações menos deletérias mas mesmo assim relevantes, como o hirsutismo, especialmente mais frequente nos povos mediterrânicos, hipertrofia gengival e ainda muitas outras complicações (Ramos e col., 1991). O uso de azatioprina também se acompanha de efeitos laterais de grande importância de que destacamos as de tipo hematológico, incluindo a leucopenia, a anemia e a trombocitopenia, as do foro gastrointestinal, a saber, a hepatotoxicidade, a icterícia colestática e a pancreatite aguda, as neoplasias, novamente os linfomas de características diferentes dos associados à ciclosporina A, tumores cutâneos e ainda várias reacções de hipersensibilidade, incluindo a nefrite intersticial, a artrite e a raríssima, mas potencialmente fatal, pneumonite (Ramos e col., 1991). Igualmente os corticosteroídes estão associados a diferentes efeitos laterais, desde um maior risco e gravidade de infecções, obesidade e diabetes mellitus, miopatia, necrose óssea avascular, cataratas e glaucoma, hipertensão arterial, doença péptica, pancreatite

aguda, alterações psiquiátricas e outros efeitos indesejáveis ainda (Ramos e col.,1991).

Também os outros fármacos usados na imunossupressão se associam a vários efeitos laterais, de maneira que se torna compreensível todo o esforço dispendido na investigação de novas drogas para uso clínico.

Se excluirmos a morte do receptor, a causa mais frequente de perda do aloenxerto renal é ainda a rejeição, aguda ou crónica, responsável por cerca de três quartos das perdas dos transplantes renais (Berthoux e col., 1996). No Hospital de S. João, a frequência de rejeição aguda tem oscilado à volta de 20%.

Além dos custos financeiros inerentes ao tratamento da rejeição, o número de crises de rejeição correlaciona-se de forma inversa com a sobrevida do enxerto (Gulanikar e col., 1992). Consequente à juventude do nosso programa de transplantação renal, os dados disponíveis sobre a rejeição crónica não permitem ainda um tratamento estatístico adequado. Facilmente se compreende o grande interesse em melhorar os conhecimentos sobre a etiopatogenia da rejeição.

Na fig.1, apresentamos um esquema, necessariamente reduzido, sobre a resposta imune envolvida na rejeição. Imediatamente se observa o papel inicial e fundamental da apresentação de antigéneo; as células T não são capazes de reconhecer antigéneo nativo livre, mas podem reconhecer peptídeos constituídos por um número limitado de amino ácidos (Townsend e Bodmer, 1989; Germain e Margulies, 1993; Cresswell, 1994). Estes peptídeos associam-se com os antigéneos do complexo major de histocompatibilidade (CMH) das células apresentadoras de antigéneo (CAA) e são depois transportados para a superfície dessas células. Durante o desenvolvimento do sistema imune, o reportório de T é seleccionado, negativamente, no tímus, sempre que T reconhece peptídeos derivados de proteínas próprias, (descrição muito simplificada). Ao mesmo tempo, ocorre uma selecção positiva de T reactivas a CMH próprio, de forma que o reportório de T, maduros, inclui células capazes de responder a peptídeos estranhos no contexto preferencial de CMH próprio, a restrição por CMH (von Boehmer e col., 1993; Blackman e col., 1988). Paradoxalmente, a estimulação por células transportadoras de aloantigéneo induz uma potente resposta imune (Sherman e Cattopadnyay, 1993).

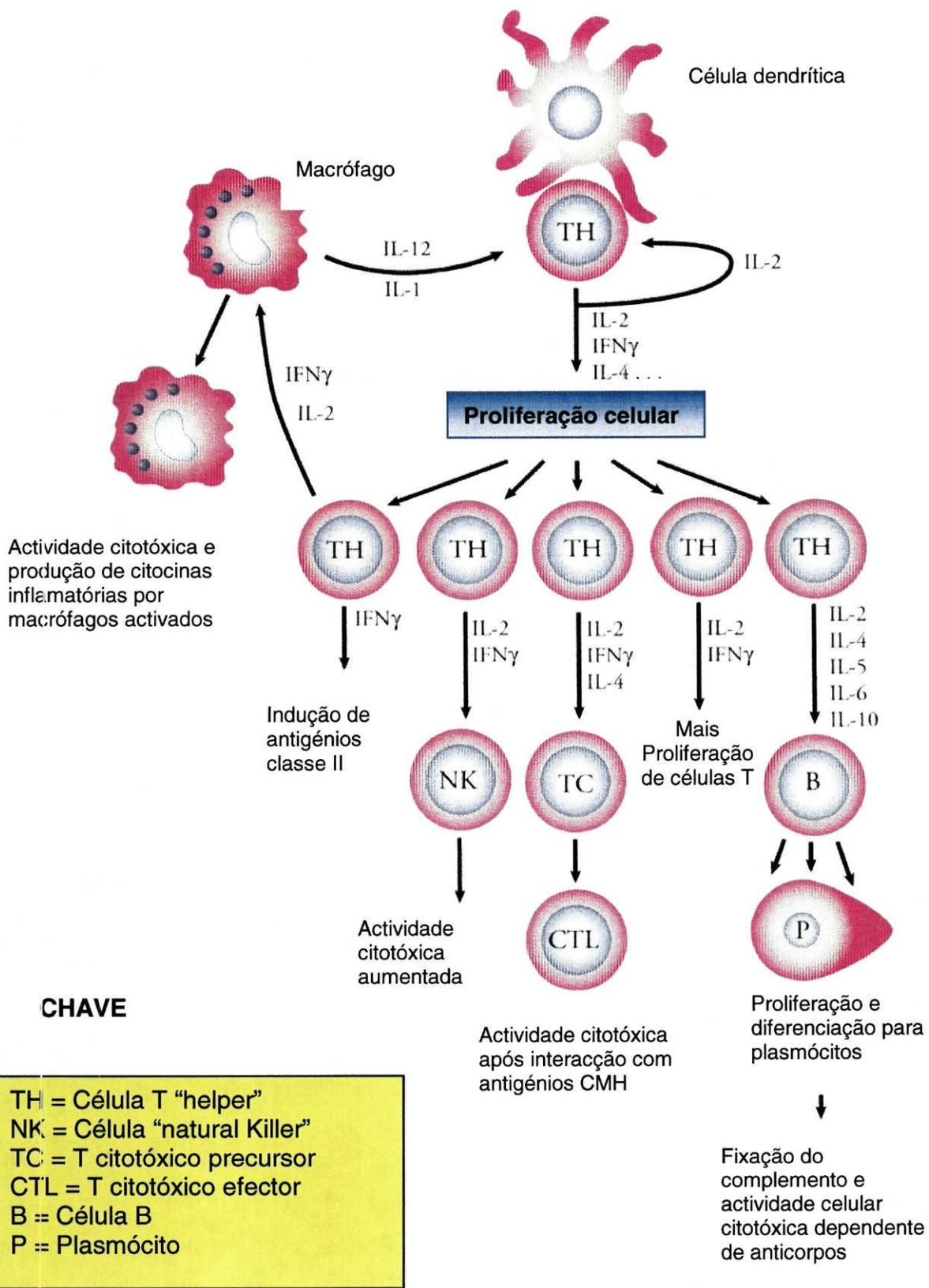


Fig 1: mecanismos de activação imune

Há duas maneiras possíveis para reconhecimento do aloantígeno: a via directa e a via indirecta (Austyn e Larsen, 1990), fig.2.

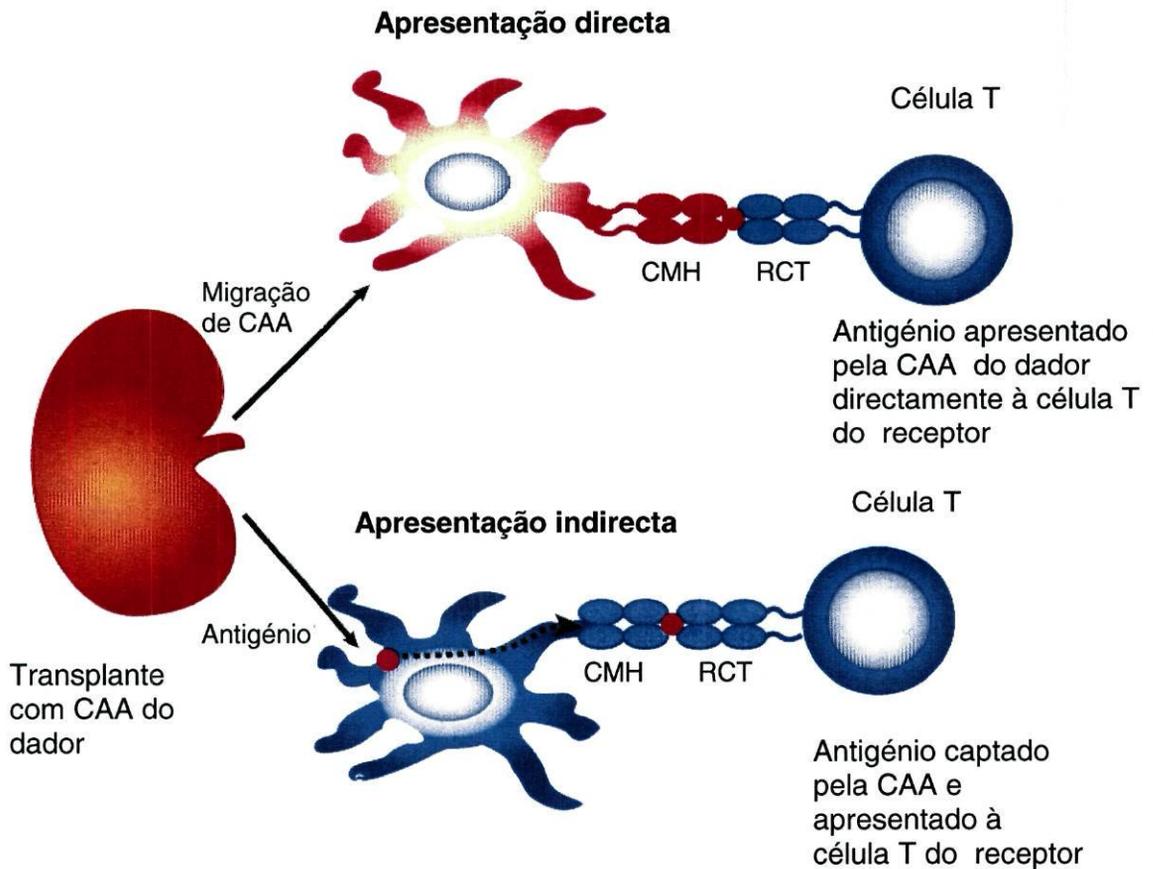


Fig 2: Apresentação de antígeno pelas vias directa e indirecta

Durante a apresentação directa, as células T reconhecem aloantígenos CMH nas células do enxerto. Deste modo, os leucócitos do dador, presentes como passageiros no enxerto, poderão desempenhar papel muito importante na sensibilização do receptor, especialmente as células dendríticas que apresentam antígenos das classes I e II na membrana e que são conhecidas como uma das CAA profissionais (Steinman, 1991). Estas células migram rapidamente do enxerto para o tecido linfóide do receptor, onde podem ser reconhecidas pelas células T do receptor (Austyn e Larsen, 1990; Austyn, 1992).

Embora haja evidência, em modelos animais, que isto possa acontecer (Pober e col., 1996) e assumir papel predominante nas rejeições precoces, pós-transplantação, estudos preliminares com anticorpos monoclonais, para obter delecção dos leucócitos passageiros nos enxertos renais, no homem, não deram os resultados esperados (Hume, 1993). A apresentação indirecta tinha sido vista como a forma predominante na transplantação humana, até há bem pouco tempo. Nesta via, antigéneos CMH do dador sofreriam um processo intra CAA do recipiente que depois os apresentariam na membrana, integrados no complexo CMH do receptor (Sherwood e col., 1986; Shoskes e Wood, 1994). Talvez as duas vias joguem o seu papel em tempos diferentes pós transplantação.

Outras dúvidas surgem sobre quais as células que poderão desempenhar papel CAA. No transplante de rim, se só admitíssemos a via indirecta, CAA seriam células dendríticas, linfócitos B, linfócitos T activados e monócitos-macrófagos, todos do receptor. No entanto, com a via directa, o leque de células que poderão estar cometidas no processo CAA seria muito mais largo. Além das descritas CAA profissionais, outras células de outras linhagens poderão estar envolvidas. As células endoteliais são uma das candidatas. O seu papel na activação da resposta imune primária é controverso, mas em sistemas de culturas de células e na ausência de células dendríticas, células endoteliais isoladas são capazes de estimular CD4 e CD8 T (Pober e Cotran, 1990; Hughes e col., 1990). Na realidade, em algumas rejeições agudas aceleradas, o atingimento quase limitado ao endotélio renal e a precocidade da resposta imune fazem pensar num mecanismo de apresentação directa através do endotélio. Além disso, não nos podemos esquecer que o endotélio partilha com os monócitos um sistema antigénico não CMH. Nessas rejeições, mediadas por esta diferença antigénica, será legítimo também pôr como hipótese primeira o endotélio como apresentador directo de antigéneos. Não nos podemos esquecer que apesar do que foi dito, o alvo preferencial do ataque imunológico, no transplante renal, são as células tubulares proximais renais (Duquesnoy, 1990). De facto, há também evidência de que pode haver reconhecimento de antigéneo CMH restrito, mas que se exprime apenas nas células renais (Hadley e Mohanakumar, 1993). Voltaremos a isto mais adiante.

Há evidência experimental que as células tubulares renais podem constituir-se em CAA. Num estudo muito interessante, a nível animal, (Singer e col., 1993) foi documentada quer a capacidade de células tubulares renais apresentarem antigéneo,

assim como a faculdade de inibirem a resposta de T CD4+ específico para o antigéneo. Este estudo não confirmou outro, que apontava para a necessidade de células renais exprimirem CD28 de forma a constituírem-se em CAA (Wilson e col., 1995). Outros autores também confirmaram a capacidade das células renais apresentarem antigéneo (Rubin-Kelley e Jevnikar, 1991). Por outro lado, as células renais poderão também participar na indução de tolerância, pelo menos na tolerância ao próprio (Singer e col., 1994) e, provavelmente, nos transplantes. Daqui resulta que para a compreensão da imunologia da rejeição e da tolerância no transplante renal, se a análise for limitada aos linfócitos e monócitos-macrófagos, apenas se obterá, certamente, uma imagem parcial dos acontecimentos relevantes para as duas situações.

Para o diagnóstico de rejeição aguda no transplante renal a biópsia renal clássica continua a ser o meio mais usado. Apesar das várias tentativas de procura de sinais periféricos de rejeição, apenas a creatinina plasmática mantém a sua indiscutível utilidade. Na realidade, vários autores, que estudaram as alterações nos linfócitos da sangue periférico por citometria de fluxo (Ellis e col., 1982; Morris e col., 1982; Chatenoud e col., 1983; Henney e col., 1986; Smith e col., 1989), foram incapazes de achar correlações significativas com a situação clínica. Apenas um grupo apresentou dados promissores nos casos de rejeição aguda tardia, ao estudar o sangue periférico (Reinke e col., 1994). Provavelmente, isto reflecte o habitual atraso no diagnóstico destas crises de rejeição, que deve permitir uma escalada da resposta imunológica de forma a ser observada na periferia. Mesmo a biópsia renal enferma de várias limitações. Se é verdade que a introdução da biópsia com pistola automática tornou o exame menos incómodo para o doente, mais seguro e mais fiável na obtenção de tecido em quantidade suficiente para permitir o diagnóstico, um estudo recente demonstrou claramente que, para se conseguir resultados de boa qualidade diagnóstica, torna-se necessário realizar duas picadas/exame (Sorof e col., 1995).

A introdução dos critérios de Banff (Solez e col., 1993), tabela 1, trouxe mais uma melhoria na reprodutibilidade do diagnóstico pela biópsia renal, embora esta classificação não seja aceite por todos.

1. Normal

2. Rejeição hiperaguda

3. Alterações ligeiras

Esta categoria é usada quando a arterite da íntima está ausente e apenas se observa ligeira ou moderada infiltração focal por mononucleares com focos de tubulite ligeira (1 a 4 células mononucleares/secção tubular).

4. Rejeição aguda

Grau I, rejeição aguda ligeira

Casos com infiltração intersticial significativa (>25% do parênquima afectado) e focos de tubulite moderada (>4 células mononucleares/secção ou grupo de 10 células tubulares).

Grau II, rejeição aguda moderada

Casos com (A) infiltração intersticial significativa e focos de tubulite severa (>10 células mononucleares/secção tubular) e/ou (B) arterite da íntima ligeira a moderada.

Grau III, rejeição aguda severa

Casos com arterite da íntima severa e/ou arterite transmural com alteração fibrinóide e necrose das células musculares lisas da média. Infarto focal recente e hemorragia intersticial sem outra causa óbvia são também interpretados como sinal de grau III.

5. Nefropatia crónica do aloenxerto

(Lesões vasculares e glomerulares contribuem para a definição do tipo de nefropatia crónica; espessamento fibroso recente da íntima sugere a presença de rejeição crónica).

Grau I - nefropatia crónica do transplante

- atrofia tubular e fibrose intersticial ligeira

Grau II - nefropatia crónica moderada do transplante

- atrofia tubular e fibrose intersticial moderada

Grau III - nefropatia crónica severa do transplante

- atrofia e perda tubular e fibrose intersticial severa

6. Outros (alterações consideradas independentes de rejeição)

tabela 1: classificação de Banff

De qualquer forma e amiúde, o patologista encontra problemas de difícil classificação. De facto, em doentes com função estável do aloenxerto, infiltrados intersticiais de mononucleares podem ser encontrados, pelo menos durante os primeiros meses (Colvin, 1996). Se, por um lado, estes monucleares residentes talvez possam contribuir para o estabelecimento de tolerância, por outro lado, também podem desenvolver lesão subclínica, pelo menos, inicialmente, já que os aloenxertos que mostram menor extensão de infiltrado são aqueles que apresentam melhor função aos 12 meses pós transplantação (Rush e col., 1995).

Para tornar ainda mais difícil a tarefa dos anatomo-patologistas, durante os primeiros dias pós-transplantação e se houver necrose tubular aguda, é frequente a observação de número variável de polimorfonucleares e monócitos-macrófagos, sendo a interpretação deste achado também não desprovida de dificuldades.

Gaber (Gaber e col., 1992) demonstrou que polimorfonucleares peritubulares observados em biópsias clássicas, feitas durante a fase inicial pós-transplantação, tinham valor preditor de rejeição celular. Por outro lado, monócitos-macrófagos são células extremamente complexas e dotadas de variadas funções, entre elas, a apresentação de antigéneo. Ainda, após tratamento eficaz de crises de rejeição aguda, mais de metade dos doentes continuavam a apresentar inflamação persistente nas biópsias (Gaber e col., 1996). Mesmo um infiltrado mononuclear limitado não pode ser visto de forma ligeira. Apesar de na classificação de Banff, a categoria de alterações ligeiras não mandar tratamento anti-rejeição, foi demonstrado por outros (Rush e col., 1995), num grupo de 60 doentes, com boa função do rim transplantado, que um quadro de alterações ligeiras acarreta um agravamento significativo da função renal, quando comparado com aqueles que mostram uma histologia normal. Esta dificuldade na interpretação dos infiltrados intersticiais por mononucleares, no transplante do rim, também já tinha sido descrita em modelos animais, onde por vezes se regista uma dissociação completa e até correlação inversa entre a presença de infiltrado de células citotóxicas e rejeição (Pawelec e col., 1990). Além destas limitações, a biópsia renal clássica não tem possibilitado uma melhor compreensão dos fenómenos de tolerância, muito provavelmente porque a sua morbilidade impede por razões éticas e de bom senso, o seu emprego suficientemente repetido para se atingir tal desiderato. Além disso, torna-se necessário um estudo dinâmico das células imunocompetentes. Se o sangue periférico já mostrou que não poderá contribuir de forma significativa para atingir este objectivo, outros meios deverão ser procurados.

Locais adequados para estudo seriam certamente o baço e os gânglios linfáticos que drenam o local de implantação do enxerto e, eventualmente, o timo (Starzl e col., 1992). Como se compreende, no homem, este tipo de estudo é impossível com as técnicas ao nosso alcance. Outras alternativas devem ser procuradas.

A biópsia aspirativa com agulha fina foi introduzida no transplante renal por P. Hayry, em 1981 (Hayry e von Willebrand, 1981), que demonstrou quer a sua utilidade, quer a segurança deste meio de diagnóstico.

No serviço de Nefrologia do Hospital S. João, pudemos introduzir este exame em 1990 e desde essa data realizámos cerca de 450 exames em mais de 130 doentes transplantados renais. Também pudemos comprovar a sua segurança, já que apenas registámos até agora um caso de hematúria macroscópica que resolveu espontâneamente em seis horas, e, ainda assim, não temos a certeza que o exame provocou a hemorragia, já que a biópsia foi feita num doente com doença poliquística renal autossómica dominante e a ecografia feita depois da biópsia não mostrou qualquer anomalia no aloenxerto. Também confirmámos a sua utilidade no diagnóstico das complicações pós-transplante renal. Nessa altura, analisámos os resultados verificados nos primeiros 49 doentes estudados. Na tabela 2 apresentámos a distribuição dos diagnósticos por biópsia aspirativa.

graus	I	II	III	IV	V	VI
nº	12	6	2	18	22	12

tabela 2: distribuição dos diagnósticos das biópsias aspirativas nos primeiros 49 receptores estudados. I: alta probabilidade de rejeição aguda; II: probabilidade moderada de rejeição aguda; III: probabilidade ligeira de rejeição; IV: probabilidade moderada de não rejeição; V: alta probabilidade de não rejeição; VI: amostra inadequada.

A análise destes primeiros 72 exames revelou uma sensibilidade de 84%, especificidade de 92.5%, um valor preditor positivo para rejeição aguda de 92% e um valor preditor negativo de 85%.

Na figura 3 apresentamos reproduções de fotografias de punções aspirativas de receptores estáveis e com rejeição aguda.

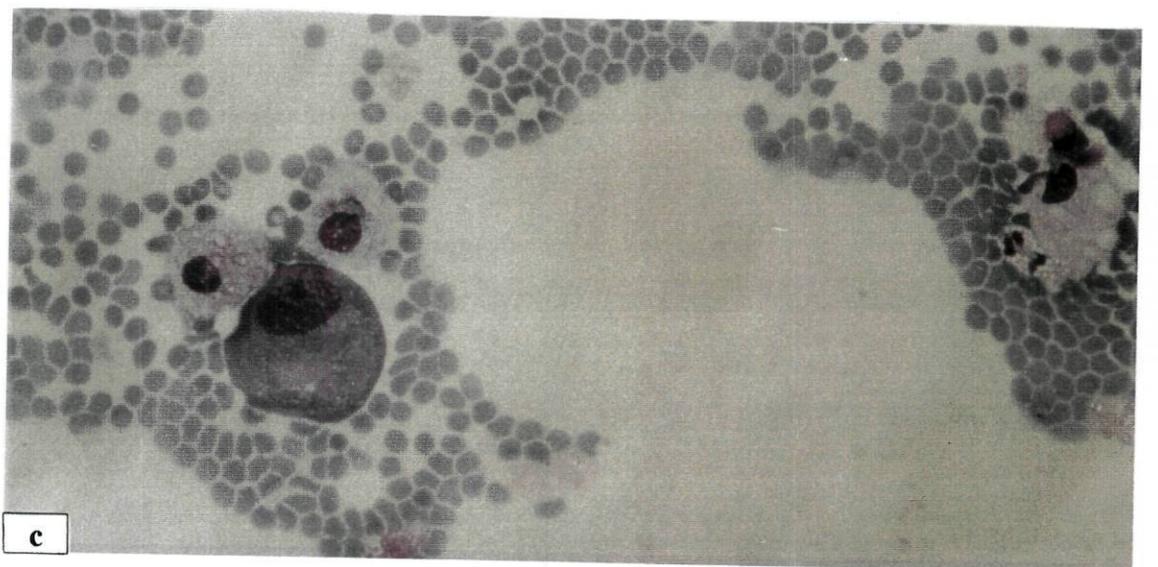
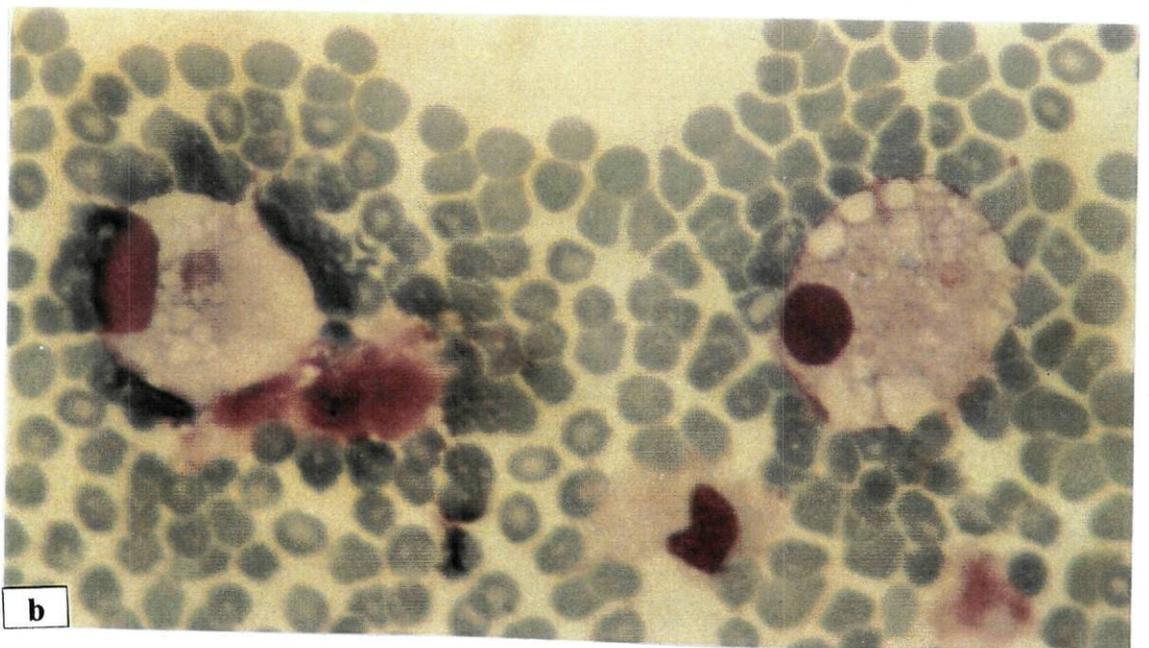
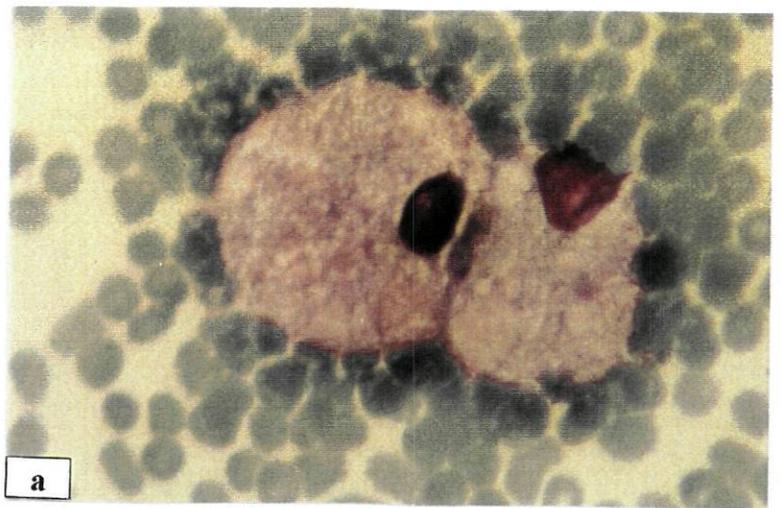


Fig 3a - 3c: Células renais de necrose tubular aguda

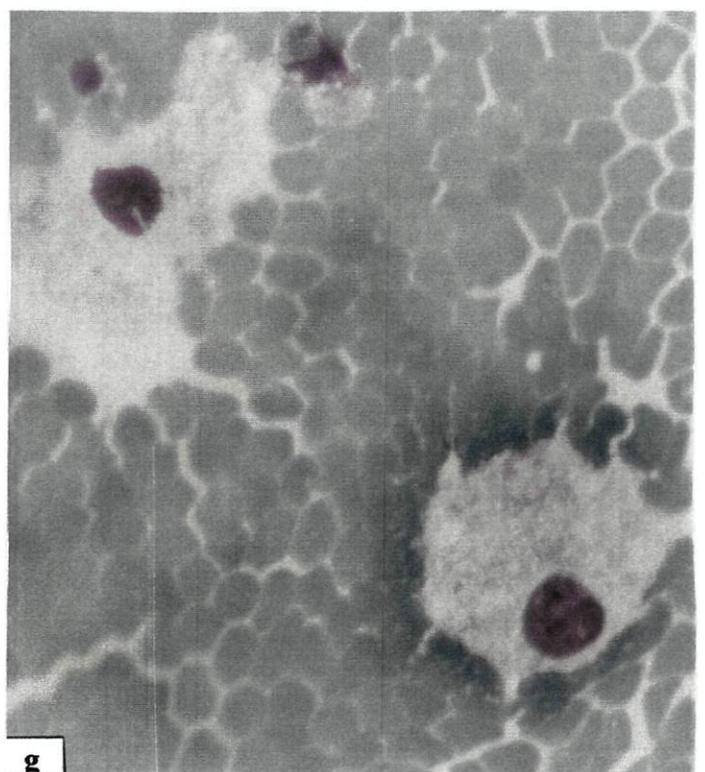
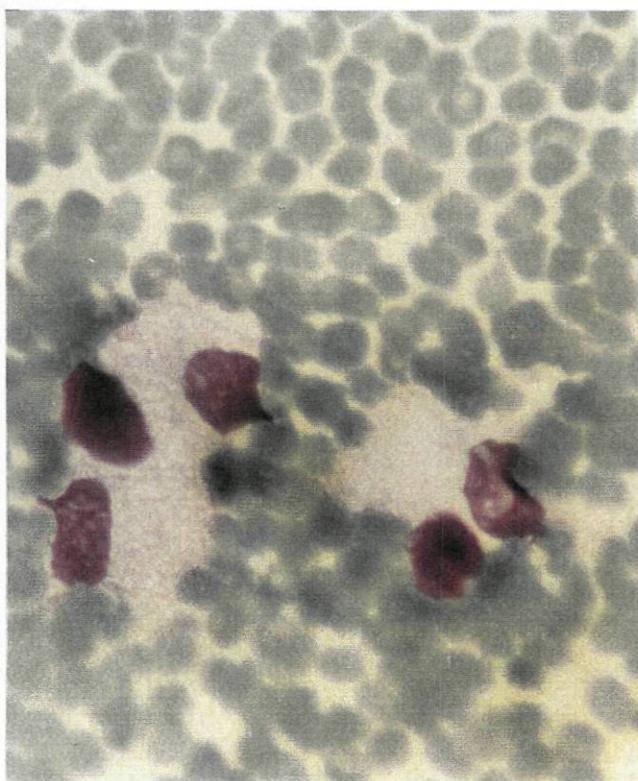
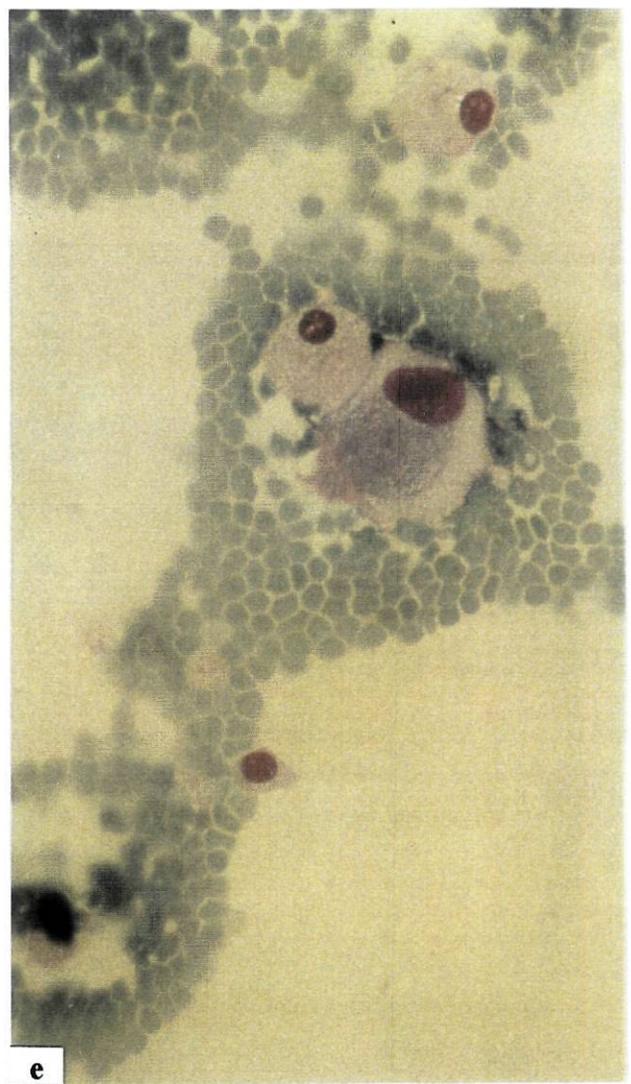
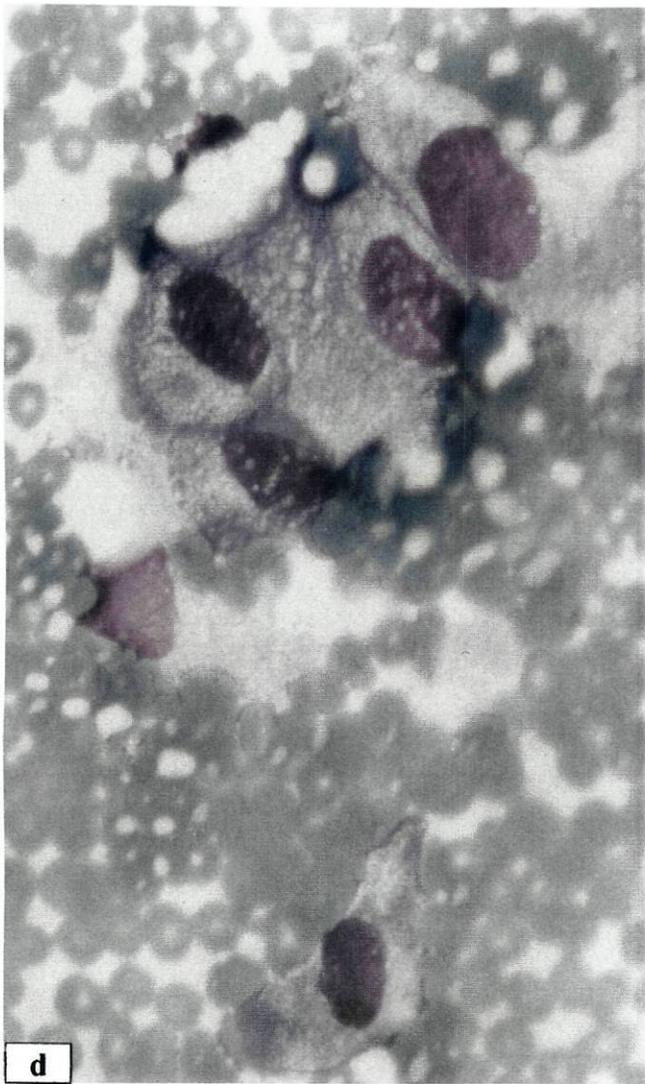


Fig 3d - 3g: Biopsia aspirativa de 7 dias pós-Tx de receptores estáveis

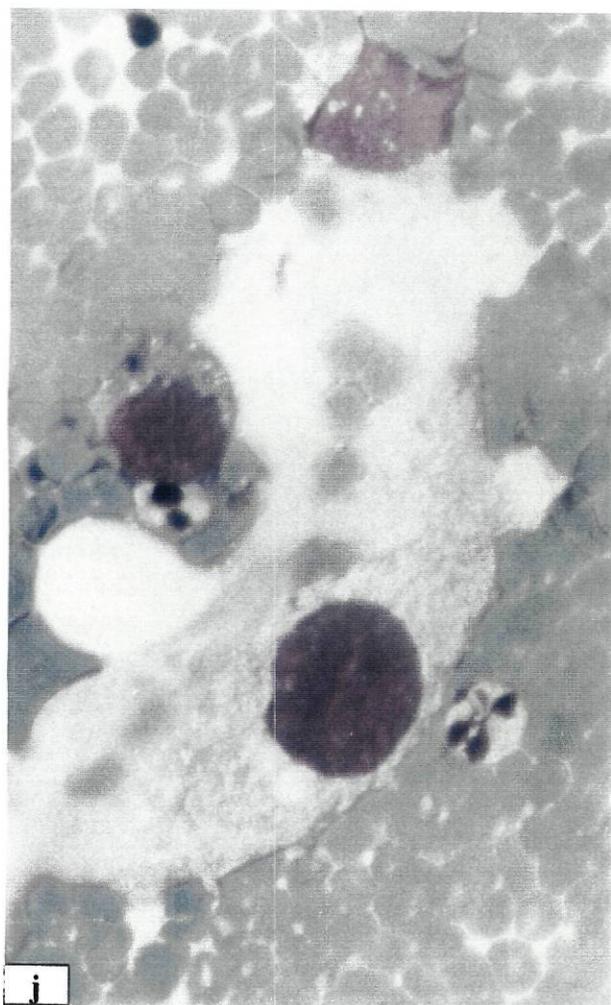
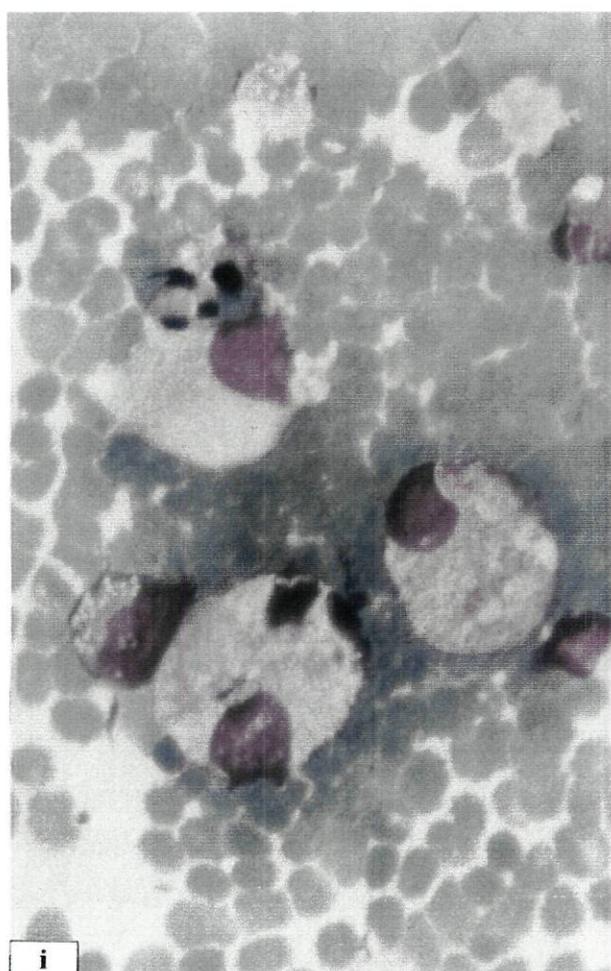
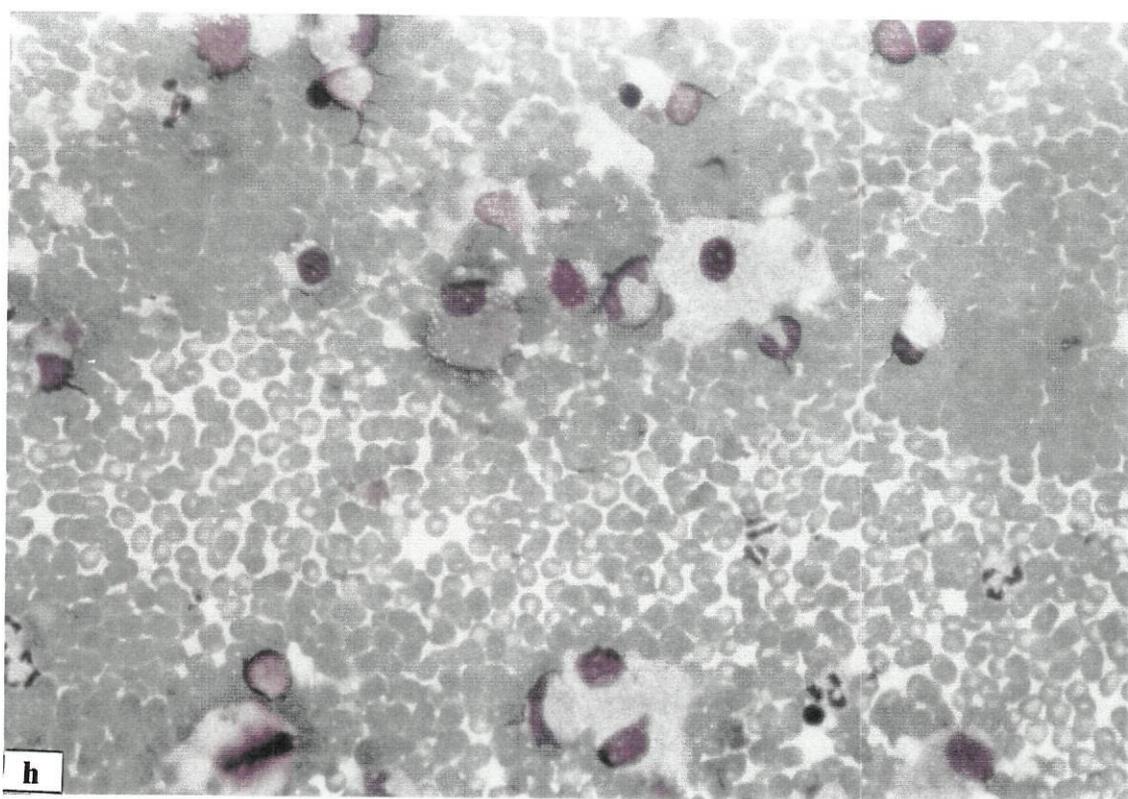


Fig 3h - 3j: Receptores com rejeição aguda; mononucleares aderentes a células renais

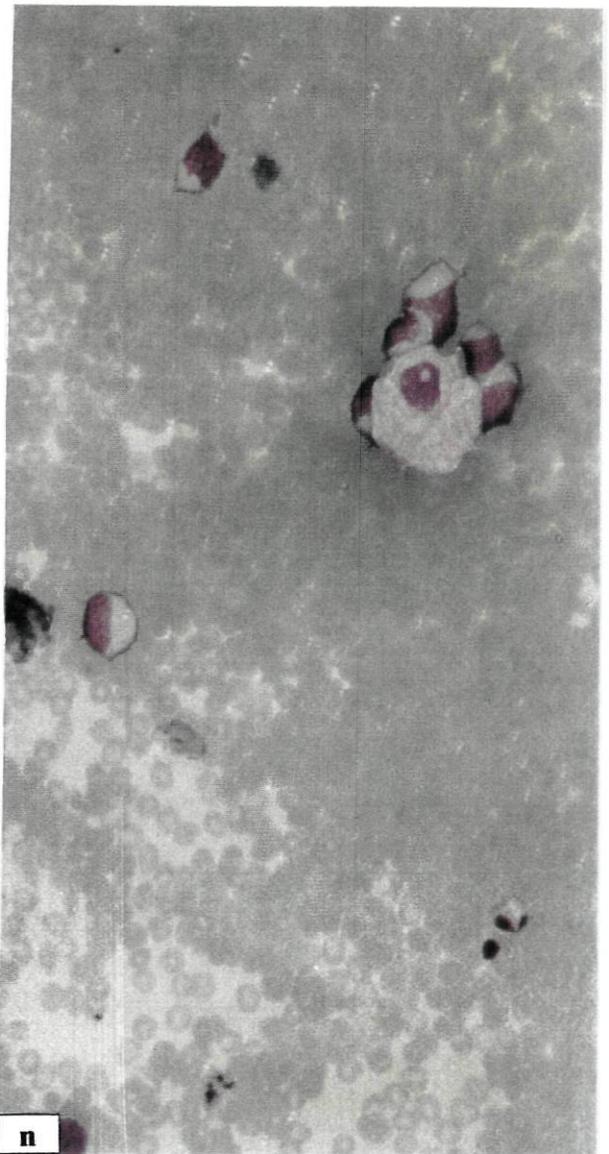
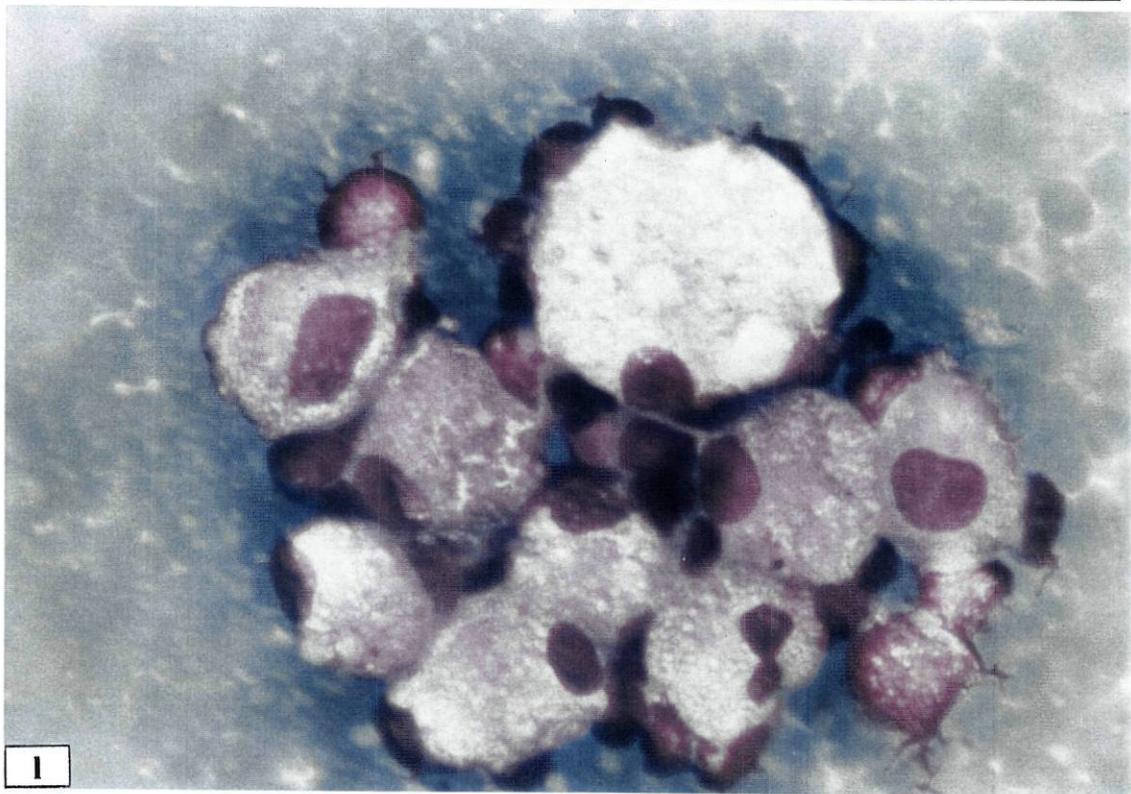


Fig 31 - 3n: Receptores com rejeição aguda; numerosas células imunocompetentes aderentes a células renais

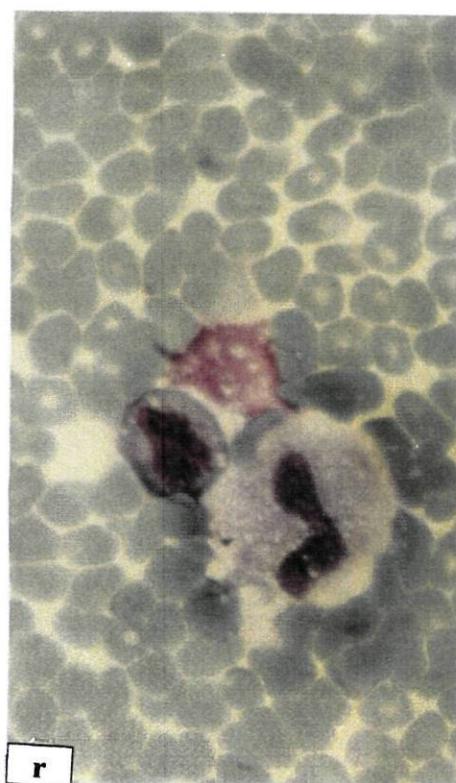
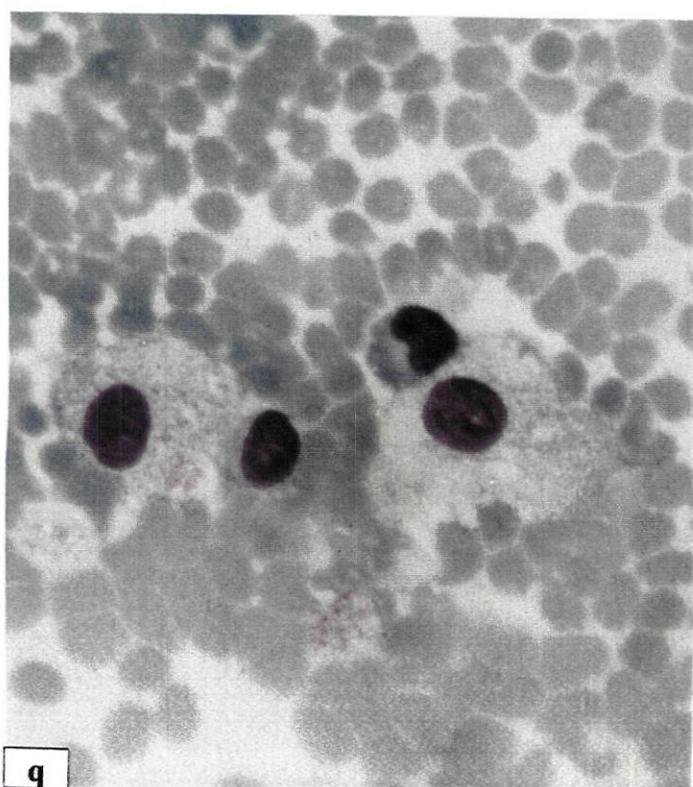
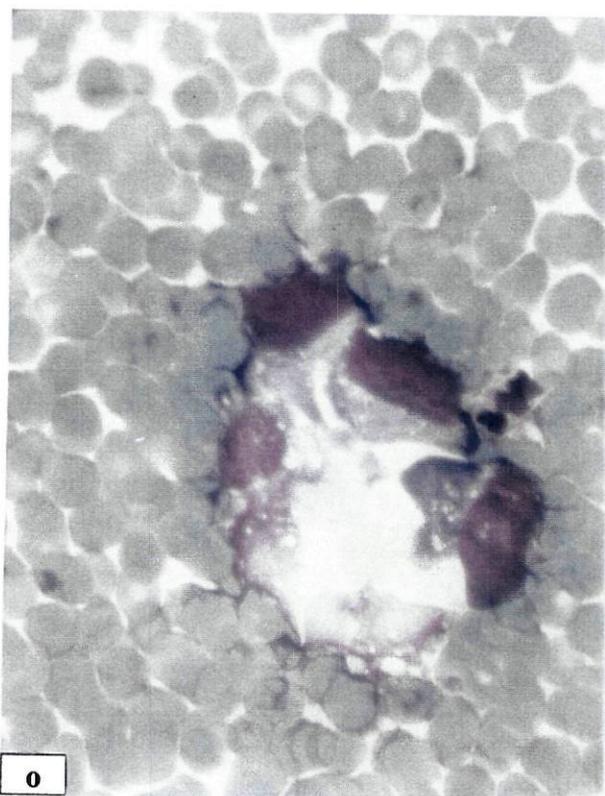


Fig 3o - 3r: Receptores com rejeição aguda

Estes resultados podem ser considerados bastante promissores, e ainda mais relevantes, se tomarmos em conta que correspondem à fase de aprendizagem do método, que se nota pela relativamente alta taxa de amostras inadequadas para o diagnóstico, que actualmente melhorou para a casa dos 7% e a baixa taxa de rejeição aguda nesse período, à volta de 15%.

A biópsia aspirativa, pela sua segurança, torna eticamente aceitável a sua repetição, o que poderia finalmente permitir um estudo mais completo da dinâmica das células infiltrativas no enxerto (CIE). Outros autores fizeram esta investigação noutros tipos de transplante de órgãos e inclusive no rim, recorrendo aqui à biópsia clássica. Por exemplo, no transplante de coração, em CIE derivadas de biópsias endomiocárdicas há maior frequência de linfócitos T citotóxicos específicos para o dador do que nas populações de linfócitos obtidos do sangue periférico (Duquesnoy e col., 1991; Smitters e col., 1990). Além disso, a capacidade de proliferação de CIE é maior se são obtidas de transplantes cardíacos em processo de rejeição aguda do que quando derivam de transplantes sem rejeição (Weber e col., 1988). Mesmo nos casos de transplante (Tx) cardíaco com doença coronária, apenas tem sido possível obter linfócitos T aloreactivos a partir das coronárias de vários subtipos, incluindo CD3+CD4-CD8-, que são supostos libertarem menos eficientemente interleucina (IL)-2 e interferon (IFN)- γ , habilitando-os a participarem nas rejeições celulares de mais fraca intensidade. Observa-se também um número significativo de linfócitos gama-delta, quase ausentes no sangue periférico (Duquesnoy e col., 1991), embora ainda não tenha sido encontrado implicação patofisiológica para este achado.

No Tx pulmonar, alguns trabalhos têm sido relatados com CIE obtidos a partir de lavados broncoalveolares (Duquesnoy e col., 1991; Rabinowich e col., 1990), onde se obteve resposta positiva nos testes de proliferação de linfócitos aloreactivos em 91% dos casos em que havia rejeição aguda, enquanto que naqueles derivados do sangue periférico apenas se observava proliferação em 45% dos testes de casos de rejeição aguda (Rabinowich e col., 1990).

Alguns artigos foram publicados sobre CIE proliferados de biópsias clássicas em Tx renais (Moreau e col., 1985). Os resultados têm sido consistentes entre os vários autores, nomeadamente quando há rejeição aguda, em que é possível observar uma correlação positiva entre a intensidade do infiltrado na biópsia e a magnitude do crescimento de CIE, logo na primeiras 24 horas de cultura (Mayer e col., 1985), sendo mesmo possível prever ao fim de 6 horas de incubação quais as biópsias que irão

fornecer linfócitos com crescimento, durante longo período (Kirk e col., 1992), que por sua vez se correlaciona com rejeição aguda. Quando se estuda doentes com Tx renal, tratados com ciclosporina A, a proporção de CD4+ e CD8+ em crescimento destas culturas é sensivelmente igual e, aparentemente, quanto maior for a expansão de CIE, maior é a possibilidade do doente desenvolver uma crise de rejeição aguda irreversível (Kolbeck e col., 1988). É muito interessante o relato de um autor sobre lise de células tubulares proximais pelos linfócitos proliferados de biópsias de rins em curso de rejeição aguda, lise que era inibida fortemente por anticorpo monoclonal anti-CD3 e moderadamente por anti-classe I HLA (Bonneville e col., 1988).

O nosso estudo foi dedicado à definição de vários parâmetros que pudessem classificar com mais precisão a dinâmica das células infiltrantes no transplante renal.

Tentámos aproveitar a facilidade que a biópsia aspirativa nos dá em obter células parenquimatosas renais conjuntamente com CIE. Na figura 3 apresentámos imagens de punções aspirativas de receptores sem e com rejeição aguda. Como atrás dissemos, as células tubulares renais, além de constituírem o alvo das células imunocompetentes envolvidas no processo de rejeição, não parecem assumir um papel de parceiros passivos nesta interacção. Inclusive, talvez nalgumas situações os aloantigénios dominantes na resposta anti-transplante só sejam expressos pelas células renais. Pensamos que as culturas de biópsias aspirativas podem ser o modelo “in vitro” mais aproximado da situação “in vivo”, constituindo coculturas de células-alvo e de células efectoras, quer em situações de rejeições aguda e crónica, quer em situações de tolerância, e, nesta última situação, pusemos a hipótese que a tolerância seria activa e não apenas um processo de ignorância, na linha do que alguns relatos prévios têm sugerido (Lundin e col., 1991; Sundstrom e col., 1995; Heelan e col., 1996). Avaliámos a resposta proliferativa das células da biópsia aspirativa em cultura, a fenotipagem por citometria de fluxo dos linfócitos T presentes no transplante e no sangue periférico, estes últimos, para comparação com os primeiros, a influência da mudança de formulação da ciclosporina A nestes subtipos de linfócitos T, a quantificação de monócitos-macrófagos nas biópsias aspirativas, a produção de citocinas e quemocinas pelas células das biópsias em cultura e o efeito que sobrenadantes das culturas das biópsias aspirativas poderiam eventualmente ter na resposta linfocitária mista dador-receptor, comparada com receptor-testemunho.

As hipóteses em investigação, tal como descritas no projecto de tese proposto e aceite pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina do Porto eram:

1: as células infiltrantes obtidas pela biópsia aspirativa teriam uma capacidade de proliferação diferente, consoante os doentes estudados estivessem livres ou não de crises de rejeição;

2: as células T infiltrantes obtidas por biópsia aspirativa eram diferentes para vários subtipos das presentes no sangue periférico e variavam também com a resposta do receptor ao aloenxerto;

3: com a introdução da nova formulação de ciclosporina A, várias diferenças deveriam aparecer nos fenótipos de T, quer do grupo de CIE quer do sangue periférico (este estudo foi introduzido posteriormente ao desenho inicial do projecto já que a nova formulação de ciclosporina A também foi posterior à entrega do projecto);

4: monócitos-macrófagos deveriam estar presentes de forma distinta com as diferentes situações clínicas pós transplantação, de acordo com as suas variadas funções;

5: as CIE em cultura deveriam sintetizar citocinas e quemocinas em diferentes quantidades, conforma os diferentes estados de resposta imune ao aloenxerto;

6: as culturas de CIE poderiam sintetizar factores solúveis que poderiam promover a aceitação do aloenxerto, testada pela resposta linfocitária mista.

II- Proliferação de culturas de biópsias aspirativas em transplantados renais

Introdução

A capacidade de proliferação de CIE em diferentes transplantes de órgãos tem sido estudada, já que constitui um dos sinais fundamentais do estado de activação celular. No transplante de rim alguns estudos foram publicados, mas com material obtido por biópsia clássica (Moreau e col., 1985; Bonneville e col., 1988) e apenas tratando doentes com crises de rejeição aguda. Esses estudos avaliaram a capacidade de formação de colónias de linfócitos T a partir de mononucleares extraídos dos rins em processo de rejeição, faltando assim a comparação com casos sem crises de rejeição.

No Tx cardíaco, outros autores realizaram estudos similares (Carlquist e col., 1988; Harcombe e col., 1994). O grupo de Harcombe observou uma relação entre o crescimento de T e a rejeição aguda significativa, quando o meio de cultura era suplementado com IL-2 ou fitohemaglutinina, mas, não, quando empregaram anti-CD3, que os autores especularam induzir uma estimulação policlonal. Contudo, depois do período inicial pós-transplante deixava de ser possível prever uma rejeição aguda subsequente quando as culturas eram feitas durante períodos de acalmia imunológica (Harcombe e col., 1994).

No transplante pulmonar, Rabinowich (Rabinowich e col., 1990) relatou que CIE, colhidas por lavagem broncoalveolar, proliferavam de forma significativamente maior se proviessem de doentes com rejeição aguda ou rejeição crónica comparados com clinicamente quiescentes, assim como CIE respondiam mais a IL-2 nos primeiros que nos doentes estáveis (Rabinowich e col., 1990). Há no entanto um problema de análise estatística neste estudo, já que os autores usaram um teste t de Student emparelhado para comparar doentes, com e sem rejeição.

No transplante de fígado, o mesmo grupo relatou dados similares (Saidman e col., 1990). Neste estudo, além dos casos de rejeição e não rejeição, também os doentes com hepatite B e Tx de fígado foram avaliados e apesar destes fígados com hepatite estarem infiltrados por considerável número de linfócitos activados e por

outros mononucleares, curiosamente o crescimento linfocitário foi marcadamente menor que nos casos com rejeição (Saidman e col., 1990).

Pusemos como hipótese que as biópsias aspirativas poderiam ser sujeitas a cultura e que a avaliação da proliferação poderia trazer informação adicional sobre o estado dinâmico de CIE nos transplantes renais. Sabíamos que outros tinham tentado obter linhas celulares puras a partir das biópsias aspirativas e tinham falhado (dados não publicados). Por isso não tentamos isolar linfócitos ou outros mononucleares das amostras colhidas, até porque o pequeno número de células obtidas em cada exame diminuiria ainda mais durante os processos necessários para esse isolamento.

Doentes e métodos

Doentes

Noventa e cinco adultos receptores de transplante renal com rim de cadáver foram admitidos ao estudo, 57 do sexo masculino e 38 do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 16 e os 62 anos.

Os diagnósticos das doenças renais originais estavam distribuídos da seguinte forma:

- glomerulonefrite crónica: 41
- nefrite hereditária: 8
- nefrite tubulointersticial: 8
- doença poliquística renal autossómica dominante: 9
- nefropatia de IgA: 12
- nefropatia diabética: 7
- nefrosclerose hipertensiva: 4
- glomerulosclerose focal e segmentar: 2
- glomerulonefrite rapidamente progressiva: 2
- lupus eritematoso sistémico: 1
- púrpura de Henoch-Schönlein: 1

Todos os doentes, com a excepção de três casos, eram receptores de primeiro transplante renal. Os dadores e os receptores foram tipados por testes de microlinfotoxicidade recorrendo a aloantisoros estandardizados.

Imunossupressão: noventa e dois doentes receberam terapêutica tripla que incluiu dose baixa de azatioprina, ciclosporina A e prednisolona; os três receptores de segundo transplante foram tratados com esquema quádruplo que incluiu globulina antitimocítica de coelho ou de cavalo, durante os primeiros dez dias pós transplantação. A dose de CsA, administrada oralmente desde o início foi dividida em duas tomas diárias e sofreu ajustamentos indicados pelos níveis de ciclosporinemia pré-dose, medidos por método TDx™ com anticorpo monoclonal da Abbott. Para cada doente, determinámos a média dos níveis de ciclosporinemia medidos no dia anterior à biópsia aspirativa e no próprio dia do exame, de forma a atenuarmos as conhecidas variações de CsA no sangue, durante o período inicial pós-transplante.

Vinte e três doentes sofreram um total de 31 crises de rejeição aguda, sempre confirmadas por biópsia clássica, quer com agulha Tru-cut™ quer com agulha Biopty™, feitas no mesmo dia ou no dia seguinte ao da biópsia aspirativa.

As biópsias clássicas foram feitas quando a ceatinemia sérica aumentava \geq 0.5mg/dl ou quando a creatinemia permanecia maior que 3.0mg/dl, decorridas duas semanas pós-transplantação ou ainda quando o doente mantinha dependência de diálise por mais de 7-10 dias pós-cirurgia. Os diagnósticos de rejeição foram confirmados por uma resposta favorável ao tratamento anti-rejeição instituído em todos os casos, excepto em quatro doentes que acabaram por perder os enxertos na sequência de processos irreversíveis. O tratamento anti-rejeição foi diferente nos vários casos, mas em todas as rejeições agudas com a excepção de seis crises, bolus de metilprednisolona, 500mg/dia, durante 3-4 dias caracterizou o primeiro passo da terapêutica.

Métodos

Em cada exame foram realizadas duas aspirações com agulhas de punção pediátrica, 23 G, de acordo com a técnica descrita previamente por P. Hayry (Hayry e von Willebrand, 1981), embora com algumas modificações. Brevemente, a localização do rim foi feita por palpação manual e o local de picada escolhido foi o pólo superior do enxerto, lateralmente à linha de sutura. A confirmação da localização intra renal da agulha foi obtida de modo empírico, quer pela sensação de ressalto, ao atravessar a cápsula renal, quer pela pulsatilidade da agulha. Imediatamente, uma seringa de 20 ml de capacidade era acoplada à agulha e aspiração vigorosa seguida de movimentos perpendiculares à parede de cerca de 1cm, foram feitos até aparecer as primeiras gotas de sangue, indicadoras da necessidade de retirar rapidamente a agulha, sempre com a seringa em posição de máxima aspiração.

A amostra obtida era introduzida em 5 ml de meio de cultura RPMI (Royal Park Memorial Institute) com heparina lítio a 125 U/ml. O processo era repetido imediatamente, geralmente usando o mesmo material. O uso de heparina lítio era fundamental para evitar uma rápida formação de gel pela amostra e para não perturbar quer a leitura ao microscópio ou interferir com o crescimento celular, que acontece com outros tipos de heparina. As biópsias aspirativas eram feitas aos 6-7 dias, 13-14 dias e 28-30 dias pós-transplante como rotina, (referidos como dias 7,14 e 30 nos resultados e discussão) e nas alturas em que a hipótese de uma crise de rejeição aguda se colocava. Nestes casos as biópsias aspirativas eram sempre feitas antes das respectivas biópsias clássicas. Além disso, o horário dos exames foi sempre o mesmo para todos os doentes, entre 90 a 150 min após a toma matinal de CsA e prednisolona.

As biópsias aspirativas feitas na ausência de suspeita de rejeição aguda não foram seguidas por biópsia clássica.

Do material obtido diluído em RPMI, 1 ml era submetido a citocentrifugação numa citocentrifugadora da Shandon™, durante 8 minutos a 800 rotações por minuto. Após 10 minutos de secagem ao ar, procedíamos à coloração por método Romanowski, modificado com Rapi-Diff™, seguida por nova secagem ao ar e, finalmente, observação ao microscópio a 400× de ampliação.

Este processo era repetido para o sangue periférico do doente. A classificação usada foi a proposta previamente (Hayry e von Willebrand,1981).

I - Alta probabilidade de rejeição

Índice total corrigido maior que 3.5 mostrando blastos com/sem macrófagos (mas macrófagos sem linfócitos indicam rejeição avançada e irreversível ou rejeição em fase de recuperação ou necrose tubular aguda em processo de regeneração).

Grau II - Probabilidade moderada de rejeição

Índice total corrigido maior que 3.5 devido a linfócitos, monócitos e/ou linfócitos ativados. Ausência de blastos.

Grau III - Probabilidade ligeira de rejeição

Índice total corrigido entre 2.5 e 3.5 devido a linfócitos, monócitos e/ou linfócitos ativados. Ausência de blastos.

Grau IV - Probabilidade moderada de não rejeição

Índice total corrigido entre 0 e 2.5 devido a pequeno número de linfócitos e/ou monócitos.

Grau V - Alta probabilidade de não rejeição

Sem células infiltrantes no aspirado para além das provenientes por contaminação por sangue periférico.

Grau VI - Amostra inadequada

Menos de 10 células parenquimatosas renais por 100 leucócitos.

tabela 1: classificação das punções aspirativas

Deste modo, quando as amostras eram classificadas com o grau VI, não eram submetidas a cultura.

A cultura era feita com os 4ml remanescentes, em meio de cultura RPMI, suplementado com Heparina, penicilina e estreptomicina e l-glutamina. Como meio macromolecular de suporte foi usado soro autólogo, a 10% de concentração, obtido de sangue colhido imediatamente antes da toma matinal dos imunossuppressores.

A escolha de soro autólogo em detrimento das duas outras alternativas mais comuns, soro vitelino fetal ou soro AB, foi baseada em várias razões.

Soro vitelino fetal contém vários factores de crescimento, especialmente TGF- β que apresenta reactividade cruzada com TGF- β humano, o que perturbaria posteriormente a avaliação deste factor, tal como fizemos mais tarde.

Apesar disso, num número limitado de casos, fizemos as culturas com soro vitelino fetal e com soro autólogo e a análise comparativa dos resultados mostrou uma maior proliferação celular quando soro vitelino fetal era usado (Oliveira, resultados não publicados).

A decisão de declinar o uso de soro AB baseou-se num achado num doente com rejeição aguda, em que a proliferação celular foi significativamente inferior com soro AB comparada com a observada com soro autólogo. Ainda voltaremos a este assunto mais tarde.

Ao meio de cultura foi adicionado ainda IL-2 fornecida por SigmaTM, à concentração de 10U/ml. Esta dose de IL-2 assegurava-nos que não haveria estimulação policlonal pela IL-2, nomeadamente de “natural killers” (Duquesnoy e col., 1991), mas permitia-nos testar a resposta das células em cultura à estimulação por IL-2. A suspensão celular era ajustada para uma concentração de 2.5×10^5 células/ml. As culturas foram feitas em placas de cultura da CostarTM, com 96 poços de fundo redondo, com 200 μ l de capacidade. Três poços recebiam a amostra ainda sem IL-2 e três poços recebiam a suspensão celular já com IL-2. A incubação foi feita durante 72 horas a 37°C num ambiente de 5% de CO₂. A proliferação celular foi avaliada pela incorporação de timidina H³⁺, durante as últimas 18 horas de incubação, num contador beta da BeckmanTM.

Análise de dados

As médias e os desvios padrões das médias foram determinados para cada conjunto de três poços, com e sem IL-2. Kruskal-Wallis ANOVA e Friedman ANOVA foram usadas para avaliar dados não emparelhados e emparelhados respectivamente, recorrendo ao programa Statistica da StatsoftTM.

A sensibilidade foi calculada como $\text{verdadeiros positivos} \times 100 / \text{verdadeiros positivos} + \text{falsos negativos}$ para rejeições agudas. A especificidade foi calculada como $\text{verdadeiros negativos} \times 100 / \text{verdadeiros negativos} + \text{falsos positivos}$ de casos sem rejeição aguda. O valor preditor positivo foi achado como $\text{verdadeiros positivos} / \text{verdadeiros positivos} + \text{falsos positivos}$ e o valor preditor negativo foi calculado como $\text{verdadeiro negativo} / \text{verdadeiro negativo} + \text{falsos negativos}$. Verdadeiros positivos foram definidos como rejeições agudas, provadas por critérios clínicos e critérios histopatológicos com proliferações celulares superiores a 850 contagens por minuto (cpm). Verdadeiros negativos foram definidos por ausência de clínica de rejeição aguda e biópsia clássica sem sinais de rejeição (nos casos em que foi feita) e uma proliferação celular inferior a 850 cpm. O coeficiente κ de correlação foi determinado para os pares poços sem IL-2 / poços com IL-2.

Resultados

Noventa e três de noventa e cinco receptores consecutivos de transplante renal foram admitidos ao estudo. Um doente recusou entrar no protocolo de estudo e outro doente morreu por hemorragia digestiva no fim do segundo mês pós transplante. Deste modo ficámos com 70 doentes no grupo de doentes estáveis, grupo A, sem rejeição e com 23 receptores que desenvolveram crises de rejeição, grupo B.

O tempo de aparecimento das crises imunológicas foi 30 ± 17 dias pós Tx. Oito doentes foram excluídos dos exames feitos aos 14 dias e doze no dia 30, todos pertencendo ao grupo A por causa de problemas clínicos variados (complicações vasculares, doença renal do dador, obstrução urológica e episódios infecciosos).

Para o grupo A, a incompatibilidade HLA-A-B-DR foi 3 ± 0.67 e para incompatibilidade HLA-B-DR foi 2 ± 0.56 . No grupo B, as incompatibilidades HLA foram 4 ± 1.26 e 2 ± 0.9 , respectivamente. Ao comparar os dois grupos não observámos diferenças significativas, quer para HLA-A-B-DR ou B-DR. Todos os doentes, com excepção de dois tinham um painel de anticorpos linfocitotóxicos $\leq 10\%$.

As taxas de sucesso das biópsias aspirativas, definidas como o quociente do número de exames não classificados com grau 6 sobre o total de exames, dentro do

grupo A, aos 7, 14, 30 dias foram respectivamente 90.6%, 90.6% e 95.1%. Dentro do grupo B, foi 90%. Apenas uma complicação foi registada: um caso de hematúria macroscópica com a duração de 6 horas e que resolveu espontaneamente, sem ter causado desconforto importante para o doente.

A segurança do método permitiu-nos obter cerca de um terço das amostras do grupo A, dentro do habitual atendimento na consulta de pós-transplante renal, sendo necessário um descanso em decúbito durante cerca de 30 minutos após o exame.

Na tabela 2 apresentamos: o número de exames, as médias e os desvios padrões das médias das proliferações medidas nas culturas celulares, quer nos poços sem IL-2, quer nos poços com IL-2, os quocientes entre as médias das proliferações das culturas com e sem IL-2, assim como os níveis de CsA (médias de 2 dias) no sangue e as creatinemias do dia da biópsia aspirativa.

	nº testes	sem IL-2	com IL-2	+/- IL-2	CsA	creatinina
7 d	63	352 ±38.3	419 ±37.9	1.14±0.08	166± 14.5	2.5± 0.9
14 d	56	379 ±46.5	420 ±43.5	1.37±0.09	184± 16.5	2.1± 0.45
30 d	55	343 ±33.4	438 ±52.9	1.25±0.08	222± 12.1	1.5± 0.22
rej.	28	948 ± 108	1374±137	1.65± 0.6	190± 16.5	3.5± 4.1

tabela 2

Na figura 1 apresentamos os resultados das proliferações graficamente.

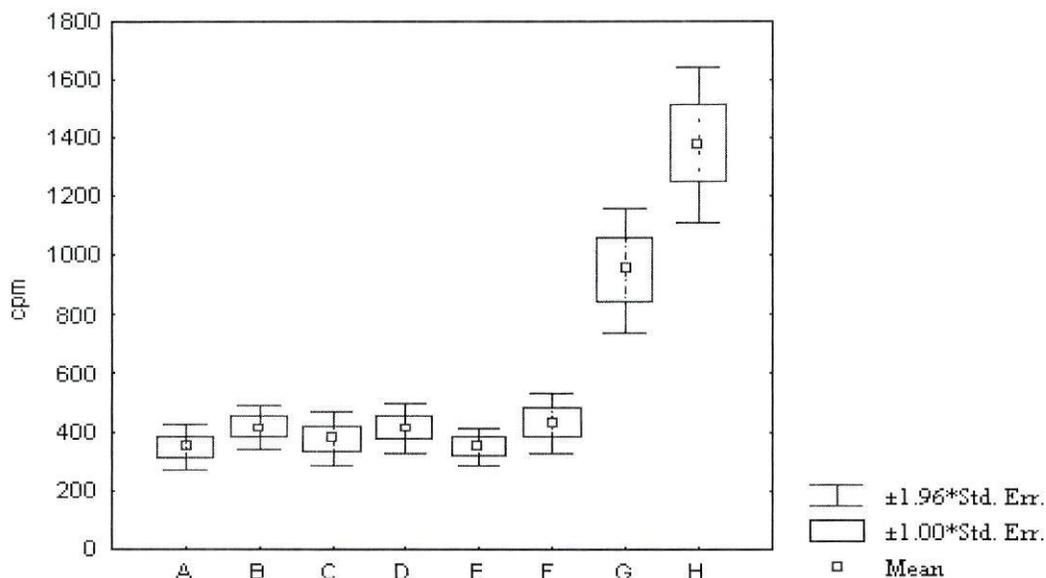


figura 1 - A: dia 7, sem IL-2; B: dia 7, com IL-2; C: dia 14, sem IL-2; D: dia 14, com IL-2; E: dia 30, sem IL-2; F: dia 30, com IL-2; G: rejeição, sem IL-2; H: rejeição, com IL-2.

Comparando os valores de CsA no sangue, não encontramos diferença significativa entre o grupo A e o grupo B. Dentro do grupo A, a ciclosporinemia era significativamente maior no dia 30 do que no dia 7 pós transplante, $p=0.04$.

Registámos uma correlação directa entre as proliferações observadas nos poços sem IL-2 e os poços com IL-2 para o grupo A, sendo $r = 0.88$ aos 7 dias, $r = 0.75$ aos 14 dias e $r = 0.63$ aos 30 dias. Pelo contrário, para o grupo B a correlação não era significativa, $r = 0.03$. Para o grupo A registámos correlações inversas, mas não significativas, entre as proliferações celulares e as creatininas plasmáticas aos 7, 14 e 30 dias.

O estudo das correlações entre as proliferações celulares e as ciclosporinemias, nos dois grupos, não revelou nenhum resultado significativo. Para o grupo A analisámos separadamente as proliferações celulares em relação com a creatinina plasmática, observadas nos poços que receberam IL-2, subdividindo os doentes entre aqueles com boa função do aloenxerto e outros com má função, traduzida por creatinemia $\leq 2.5\text{mg/dl}$ e $> 2.5\text{mg/dl}$, aos 7 dias e $\leq 2.0\text{mg/dl}$ e $> 2.0\text{mg/dl}$, aos 14 e 30 dias, apresentado na tabela 3.

	creatinemia, mg/dl	proliferação, cpm	Friedman ANOVA
7 dias	≤ 2.5mg/dl	416± 45	0.47
	> 2.5mg/dl	369± 37	
14 dias	≤ 2.0mg/dl	358± 39	0.057
	> 2.0mg/dl	523± 48	
30 dias	≤ 2.0mg/dl	340± 32	0.51
	> 2.0mg/dl	331± 20	

tabela 3

Na tabela 4, apresentamos as proliferações celulares medidas nas rejeições que responderam a tratamento com bolus de metilprednisolona e nas rejeições irreversíveis ou que necessitaram de terapêutica com soros antilinfocíticos, assim como os quocientes entre os poços sem IL-2 e os poços com IL-2 para os dois tipos de rejeições agudas; as creatinemias e as ciclosporinemias também são mostradas.

Como se observa não há qualquer diferença significativa quando os dois subgrupos são comparados.

	resposta a metilpred.	irreversível/antilinfocíticos
sem IL-2, cpm	1134± 556	749± 640
com IL-2, cpm	1133± 313	1178± 771
com IL-2 / sem IL-2	0.90± 0.60	1.86± 0.69
CsA, ηg/ml	232± 88	175± 93
creatinemia, mg/dl	3.14± 2.95	3.98± 3.32

tabela 4

Na tabela 5, estão apresentados os resultados da análise por ANOVA, tornando-se evidente as diferenças altamente significativas entre as proliferações das amostras dos doentes sem rejeição, comparadas com as dos doentes com crises de rejeição aguda, quer entre os poços sem IL-2 quer entre os poços que receberam estimulação por IL-2.

	sem IL-2	com IL-2
dia 7 versus dia 14	ns (a)	ns (a)
dia 7 versus dia 30	ns (a)	ns (a)
dia 7 versus rejeição	0.0001	<0.0001
dia 14 versus dia 30	ns (a)	ns (a)
dia 14 versus rejeição	0.003	<0.0001
dia 30 versus rejeição	0.0001	<0.0001

tabela 5: análise por Kruskal-Wallis ANOVA. (a): não significativo.

No grupo B, tínhamos 16 doentes que aos 7 dias pós-transplantação não sofriam rejeição aguda mas que 10 ± 10.5 dias mais tarde desenvolveram uma crise de rejeição. Comparámos então as proliferações celulares observadas ao dia 7 entre estes doentes do grupo B e os doentes do grupo A. As médias e os desvios padrões eram similares entre os dois grupos de forma que $p = 0.38$.

Tendo em conta as proliferações médias e os desvios padrões das médias, registados nas diferentes situações, testámos a sensibilidade, a especificidade e os valores preditores positivo e negativo de 850 cpm medido nos poços com IL-2. A sensibilidade para rejeição era 96.4% se proliferação > 850 cpm e a especificidade para ausência de rejeição era 91.3% se proliferação ≤ 850 cpm. O valor preditor positivo para rejeição, considerando todas as amostras, se proliferação > 850 cpm era 66.6% e o valor preditor negativo se proliferação ≤ 850 cpm era 98.7%.

Se restringíssemos a análise às amostras de doentes com aumento das suas creatinemias igual a 15% no dia anterior à biópsia aspirativa e no dia da biópsia, então o valor preditor positivo de rejeição aguda se proliferação > 850 cpm atingia 93.3%.

Dado os bons resultados no diagnóstico de rejeição aguda, tentámos encurtar o tempo da cultura de modo a obtermos informação mais precocemente. Assim num grupo de 21 receptores, 15 livres de rejeição e seis com episódios de rejeição aguda, o tempo de incubação foi reduzido para 24 horas, com administração de timidina marcada às 12 horas e leitura no contador beta às 24 horas. Os resultados estão apresentados na tabela 6.

	nº de testes	sem IL-2	com IL-2
7 d	11	441 ± 170.1	447 ± 157.4
14 d	15	411 ± 194.7	322 ± 152.4
30 d	13	329 ± 219.4	307 ± 258.3
rej.	6	347 ± 271.2	411 ± 117.1

tabela 6

Ao compararmos os resultados não observámos nenhuma diferença significativa.

Na fig 2-a e 2-b apresentámos imagens de duas culturas de punção aspirativa de dois receptores com rejeição aguda.

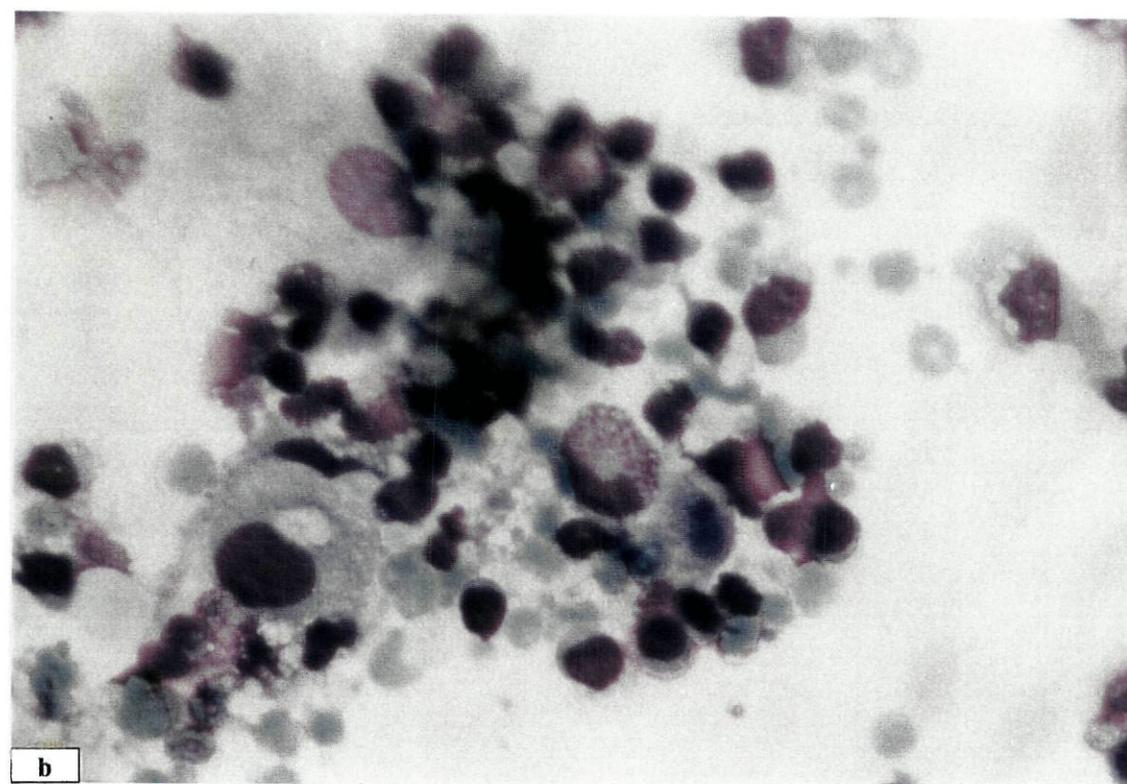
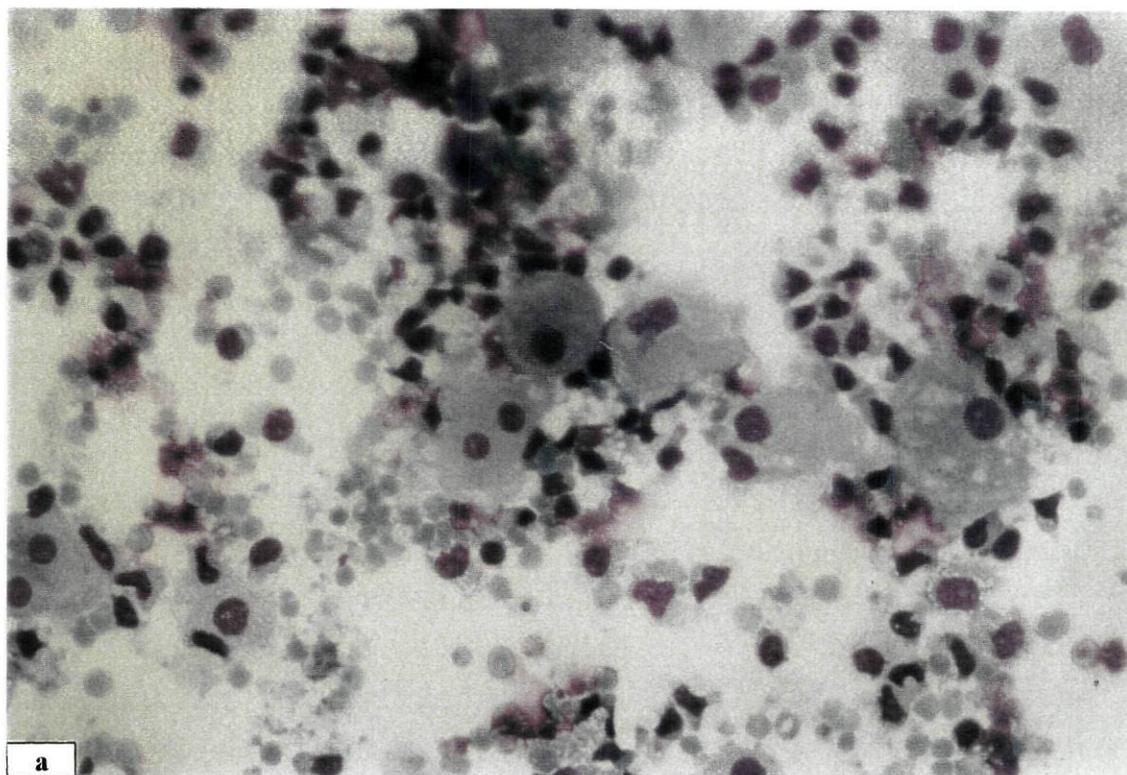


Fig. 2a - 2b

Discussão

Tanto quanto sabemos este nosso estudo constitui o primeiro relato sobre a capacidade proliferativa de culturas de biópsias aspirativas em transplantados renais. Um estudo similar ao nosso, feito com células de lavados broncoalveolares em transplantes pulmonares, mostrou uma proliferação espontânea absoluta de 519 ± 86 cpm e 735 ± 123 cpm em doentes estáveis e com rejeição aguda, respectivamente. Esta similitude de valores absolutos nos dois tipos de transplantes é interessante. A proliferação espontânea geralmente apresenta uma grande variância. No entanto, no nosso estudo, isso não se verificou, conforme se comprova pelos pequenos desvios padrões da média. Decidimos fazer as culturas também com suplemento de IL-2. A dose de interleucina usada é pequena e é significativamente inferior à aconselhada para estimulação vigorosa de linfócitos, entre as 50 e as 200U/ml (Duquesnoy e col., 1991). Assim pudemos estar certos que não estávamos a estimular inespecificamente as células em cultura. Além disso, pudemos notar a estabilidade dos valores absolutos das proliferações das culturas das amostras recolhidas durante o primeiro mês pós-transplante nos doentes clinicamente quiescentes o que trouxe mais consistência aos nossos resultados. A razão para usar IL-2 baseou-se no conhecimento que linfócitos activados (Dallman e col., 1991) exprimem maior quantidade de receptores para IL-2 que linfócitos não activados e assim, a diferença entre a resposta proliferativa entre doentes quiescentes e doentes com rejeição aguda deveria ser maior nas culturas que recebessem suplementação com IL-2 que nas culturas em meio desprovido de IL-2.

Realmente esta hipótese verificou-se, quer considerando os quocientes das proliferações com / sem IL-2 nas diferentes situações, quer tendo em conta a magnitude das diferenças estatísticas entre os doentes do grupo A e do grupo B, nas duas formas de cultura. Comparando os quocientes com / sem IL-2 entre o dia 7 versus rejeição e o dia 30 versus rejeição havia uma diferença significativa, $p = 0.04$. Este achado poderá ser um indicador indirecto da falência de CsA em suprimir a síntese de IL-2 e conseqüente expressão do receptor de IL-2 na membrana do linfócito T, nos casos de rejeição aguda. No entanto, mesmo os poços sem IL-2 seriam suficientes para a discriminação das duas situações clínicas, com o custo de

menores valores preditores, positivo e negativo. Voltaremos a este assunto noutros capítulos.

Não retornaremos às razões da opção pelo uso de soro autólogo em detrimento de outras alternativas mais clássicas. Queremos apenas realçar que ao escolher este caminho tivemos que ser rigorosos nos horários das colheitas das amostras, de maneira que por um lado, o sangue donde o soro foi obtido correspondia sempre aos níveis pré-dose de CsA e de prednisolona e as punções aspirativas coincidiriam com a altura do pico de CsA no sangue dos doentes. De qualquer modo, o estudo que fizemos sobre as correlações verificadas entre as ciclosporinemias e as proliferações não revelou qualquer valor significativo.

Com esta metodologia de cultura observámos uma capacidade de proliferação significativamente superior das culturas das amostras de doentes com rejeição aguda, comparadas com as amostras de doentes livres de rejeição. Mais importante: ao usar o valor de 850 cpm como divisória entre rejeição aguda e não rejeição, o valor preditor positivo para rejeição atingiu os 93.3% entre o grupo com disfunção do aloenxerto, definido por um aumento da creatinina sérica de 15% nos dias anterior ao punção, sem conhecimento de outros dados clínicos e mesmo sem tomar conta da classificação atribuída ao aspirado, conforme os critérios definidos anteriormente (Hayry e von Willebrand, 1981).

O valor dos nossos resultados assume maior significância se atentarmos na taxa de rejeição aguda pós-transplantação, que neste grupo de doentes estudados se ficou pelos 26.6%.

Estes resultados são um pouco melhores que os relatados para estudos similares nos transplantes cardíaco e pulmonar, recorrendo a células obtidas por biópsias endomiocárdicas (Carlquist e col., 1988; Harcombe e col., 1994) e lavados broncoalveolares (Rabinowich e col., 1990) que, no entanto, foram feitos em transplante de órgãos sujeitos a maior prevalência de rejeições agudas. Do total de 174 biópsias aspirativas adequadas para cultura, ou seja, não classificadas com o grau 6 (Hayry e von Willebrand, 1981) nos doentes do grupo A, apenas registámos 15 proliferações acima de 850 cpm, mas só duas foram observadas em doentes com disfunção do aloenxerto. Os outros treze falsos positivos verificaram-se em receptores

com rim de boa função e nestes doentes os nossos achados não levantaram dilemas clinicamente importantes.

Achamos interessante que os graus atribuídos após a leitura das lâminas estavam distribuídos por 4, com grau 1 (alta probabilidade de rejeição), 4, com grau 2 (probabilidade moderada de rejeição), 4, com grau 3 (probabilidade ligeira de rejeição) e 1, com grau 4 (probabilidade moderada de não rejeição). Infelizmente, destes doentes não temos qualquer biópsia clássica. Todos eles continuam a gozar de excelente função do aloenxerto, pelo menos, mais de um ano pós-transplante.

Estes resultados poderão ser, em parte, explicados por acasos no sítio de punção, mas mais provavelmente pelo facto bem conhecido de infiltração por mononucleares, aparentemente inocentes, relatados em estudos de biópsias clássicas protocolares, tal como recentemente Kooijmans-Coutinho e col. apresentaram.

Nesse artigo (Kooijmans-Coutinho e col., 1995) foi descrito que cerca de um terço dos receptores de rim mostravam monócitos à volta dos túbulos renais, apesar de não estar em curso qualquer crise de rejeição clínica. Monócitos-macrófagos podem produzir IL-12 e outras citocinas que, por sua vez, constituem um estímulo para a proliferação de linfócitos inocentes que parqueiem no aloenxerto. Outro estudo documentou que a intensidade, o padrão e mesmo o fenótipo dos linfócitos T infiltrantes no transplante renal não estão correlacionados com a velocidade de crescimento desses linfócitos (Kolbeck e col., 1988), fenómeno que poderia bem estar presente nalguns dos falsos positivos que registámos.

Por outro lado, a libertação local de mediadores de inflamação também poderia ter tido alguma responsabilidade, especialmente via uma proliferação de monócitos-macrófagos (Kerr e col., 1994). É conhecido que os monócitos podem constituir uma das principais causas para falsos diagnósticos de rejeição aguda pela biópsia aspirativa no transplante renal (von Willebrand e Hughes, 1994).

Isto, em parte, é muito ligeiramente sugerido pelas correlações inversas não significativas entre as proliferações e as creatininas séricas registadas nos doentes do grupo A e ainda, pela diferença quase significativa encontrada nas amostras do dia 14, neste grupo de doentes, com as proliferações a serem maiores quando as amostras eram obtidas nos doentes com creatinina sérica >2.0mg/dl do que nos casos em que as amostras provinham de receptores com creatinemias inferiores a 2.0mg/dl.

A magnitude das proliferações não permitiu prever se a rejeição aguda iria ser sensível a tratamento com corticosteroides ou não. Talvez isto seja um reflexo de uma maior quota parte de mecanismos humorais nestas rejeições agudas, alternativamente, poderá reflectir um estadio mais avançado da resposta imune, ou seja, as células imunocompetentes estariam a desempenhar funções de citotoxicidade depois de terem passado por uma fase de divisão celular. Inclusive, poderia ter havido morte de células renais nas culturas.

Realmente, temos dados preliminares que apontariam para esse fenómeno esperado, traduzido por maior quantidade de mononucleares aderentes às células renais após incubação de 96 horas destas amostras de doentes com rejeição aguda (fig.2-a, 2-b, cap.II).

Também não observámos qualquer correlação significativa entre o número de compatibilidades HLA dador-receptor e a resposta proliferativa das culturas, quer nos doentes do grupo A, quer nos doentes do grupo B. Supomos que este resultado traduza essencialmente as pequenas e não significativas diferenças para compatibilidades HLA na nossa população de receptores. A ausência de qualquer correlação significativa entre os valores de CsA no sangue e as proliferações observadas deverá ser a contrapartida da pouca relevância dos níveis pré-dose de CsA, como avaliação do seu efeito nas células imunocompetentes. Há algum tempo que está determinado que só os valores da área de baixo da curva de concentração de CsA permitem uma boa previsão da eficácia terapêutica (Kasiske e col., 1988), e mesmo assim, só provavelmente um estudo dos efeitos de CsA nos seus alvos até agora conhecidos, como a calcineurina, poderá eventualmente trazer informação mais sólida sobre a sua influência nos mononucleares imunocompetentes (Batiuk e col., 1996).

A proliferação celular medida ao dia 7 pós transplante não permitiu distinguir os doentes que iriam permanecer livres de rejeição aguda daqueles que iriam sofrer uma crise imunológica, dentro do primeiro mês pós-transplante. Este resultado não será inesperado, tendo em conta que a proliferação celular reflecte já um estadio avançado da activação celular que compreensivelmente só será visível apenas muito pouco tempo antes da evidência clínica de rejeição.

Mais tarde também voltaremos a este assunto.

Em resumo, observámos uma resposta proliferativa das culturas das biópsias aspirativas dos doentes com crises de rejeição aguda significativamente superior às das culturas das amostras dos receptores livres de crises de rejeição. O valor preditor positivo para rejeição aguda em doentes com aloenxerto disfuncionante era de 93.3% ao usarmos, como valor de separação, 850 cpm para os poços estimulados com IL-2. Este método poderá constituir um meio útil e seguro para a monitorização imunológica no transplante renal, com a vantagem de ser um meio de diagnóstico independente do observador.

Especulamos que ao repetir este método de avaliação duas a três vezes por semana, durante os primeiros tempos pós-transplante, os resultados talvez possam ainda ser superiores. Contudo uma nota de cautela impõe-se: pensamos que os nossos resultados poderão não ser reproduzidos por outros que lidem com receptores tratados com diferentes esquemas terapêuticos, especialmente, nos receptores com elevados anticorpos linfocitotóxicos.

O estudo da proliferação das células infiltrantes nos aloenxertos renais será um dado importante, entre outros, para a melhor compreensão do diálogo entre as células infiltrantes e os seus alvos, assim como dos mecanismos resultantes.

III- Análise por citometria de fluxo dos linfócitos T no sangue periférico e infiltrantes nos rins transplantados.

Introdução

A citometria de fluxo permitiu a identificação de vários marcadores na superfície celular, alguns dos quais ainda sem definição das funções associadas, outros para os quais se imputam várias significâncias. Algumas destas moléculas aparecem apenas em determinados estadios de diferenciação e activação celular; outras, são características de linhas celulares.

Os últimos tempos têm trazido um natural desenvolvimento da nomenclatura para estas moléculas, especialmente a introdução do termo CD, equivalente a “cluster” de diferenciação e que usaremos neste capítulo.

Algumas esperanças foram depositadas na citimetria de fluxo como adjuvante no diagnóstico das rejeições pós-transplantação. Vários autores estudaram as alterações fenotípicas dos linfócitos T circulantes no Tx renal. Infelizmente, os resultados têm sido inconsistentes (Ellis e col., 1982; Morris e col., 1982; Chatenoud e col., 1983; Henney e col., 1986; Smith e col., 1989). No entanto, um grupo relatou dados bastante promissores ao estudar as rejeições agudas tardias no pós-transplante renal (Reinke e col., 1994). Aparentemente a expressão de DR nos linfócitos T circulantes aumentava de forma significativa nessas crises imunológicas tardias. Os autores especularam, que o factor predominante explicativo dos resultados residiria no maior intervalo entre o início da rejeição e a suspeita clínica, tempo que permitiria uma maior activação linfocitária, a ponto desta poder ser observada na periferia, condição geralmente não reunida nas rejeições mais precoces, cujo diagnóstico é também mais imediato. De facto, durante pelo menos esta fase inicial pós-cirurgia, outros autores já tinham verificado a pouca concordância entre os achados no sangue periférico e os acontecimentos intra-enxerto renal (Totterman e col., 1989; Smitters e col., 1990; Mayer e col., 1985). Noutro estudo diferente, o grupo de Yard (Yard e col., 1993) observaram uma diferença importante na cadeia β entre os receptores dos linfócitos T infiltrantes, comparado com o que era observado na periferia.

A biópsia aspirativa com agulha fina é um método seguro e útil no diagnóstico das complicações pós-transplante renal (Bogman, 1995; Gray e col., 1992) e consegue atingir quase o mesmo valor diagnóstico da biópsia renal clássica (Gray e col., 1992; Hayry, 1989). Os fundamentos da biópsia aspirativa repousam nas diferenças do número e da intensidade de activação observadas nos mononucleares presentes na punção, comparados com o que é observado no sangue periférico, especialmente os linfoblastos e os monoblastos que aparecem predominantemente nas amostras aspiradas em doentes com rejeição aguda e que são responsáveis pela maior quota parte no incremento total corrigido que classifica a biópsia aspirativa (Hayry, 1989).

Pusemos como hipótese de estudo que a análise por citometria de fluxo dos linfócitos T presentes nas biópsias aspirativas, complementada pela investigação das eventuais alterações nos T circulantes, pudesse trazer informação adicional útil quer para o diagnóstico clínico pós-transplantação renal, quer para uma compreensão dos fenótipos celulares associados a crises imunológicas.

*Doentes e métodos**Doentes*

Oitenta e três adultos receptores de transplante de rim de cadáver foram admitidos no estudo, 51, do sexo masculino e 32, do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 16-62 anos. As doenças renais originais estavam distribuídas conforme a tabela 1.

diagnóstico	número
glomerulonefrite crónica/desconhecido	31
nefrite hereditária	7
nefrite tubulointersticial	8
nefropatia de IgA	12
doença poliquística do adulto	8
nefropatia diabética	7
nefrosclerose hipertensiva	4
glomeruloesclerose focal e segmentar	2
glomerulonefrite rapidamente	2
progressiva	
lupus eritematoso sistémico	1
púrpura Henoch-Schönlein	1

tabela 1

Todos, excepto dois, eram receptores de primeiro transplante renal. Todos, igualmente, estavam a receber tratamento substitutivo renal por hemodiálise regular, com excepção de dois doentes, em diálise peritoneal contínua ambulatoria. Os doadores e os receptores foram tipados por testes de microlinfotoxicidade com aloantígenos bem

estandardizados. Todos os receptores tinham um painel de anticorpos linfocitotóxicos inferior a 10%.

Desde o início a imunossupressão foi feita com terapêutica tripla clássica. Assim, CsA era administrada a 10mg/kg de peso p.o., dividida em duas doses com ajustamentos mandatados pelos níveis de CsA pré-dose no sangue total, medidos por método TDx™ monoclonal, da Abbott. Azatioprina foi administrada a 1.5mg/Kg de peso p.o. desde o 2º dia pós-cirurgia, após uma dose inicial peri-operatória de 5mg/Kg i.v., com ajustamentos sugeridos pelo número de leucócitos circulantes. Prednisolona foi administrada em duas doses de 500mg i.v., antes e imediatamente após a cirurgia, sendo posteriormente ministrada a 1mg/Kg peso, p.o., com diminuição lenta até atingir cerca de 20mg/dia, no fim do primeiro mês.

As crises de rejeição aguda foram tratadas com 3-4 bolus de 500mg i.v. de metilprednisolona e se a rejeição fosse resistente aos corticosteroídes ou se o quadro histológico mostrasse uma rejeição vascular predominante, os doentes seriam tratados com soro antitimocítico de coelho ou de cavalo ou ainda por anticorpo monoclonal anti-CD3, durante 7-10 dias.

Os diagnósticos de rejeição aguda foram feitos por biópsia renal clássica em todos, menos dois casos, onde a biópsia aspirativa constituiu o único método de estudo (ambos recuperaram completamente no seguimento de tratamento com metilprednisolona). Além disso, o diagnóstico histológico foi confirmado por uma resposta positiva ao tratamento anti-rejeição instituído, com excepção de cinco receptores que perderam os aloenxertos por rejeição aguda irreversível.

As rejeições crónicas foram definidas por lento e progressivo aumento da creatinemia sérica, após exclusão de outras causas de deterioração da função dos aloenxertos e confirmada em seis casos pela biópsia clássica.

Métodos

As biópsias aspirativas foram realizadas, de acordo com os métodos descritos previamente no capítulo 2, nos dias 7 e 30 pós-transplante renal nos doentes estáveis e sempre que havia uma suspeita de rejeição aguda ou crónica. As punções aspirativas

foram feitas sempre antes das biópsias clássicas e dentro de 90 a 150 minutos após as doses matinais de CsA e prednisolona. Um mililitro do aspirado, diluído em meio RPMI com heparina lítio, era analisado por citometria de fluxo.

O nosso interesse focalizou-se nos fenótipos de linfócitos T. Para caracterizá-los, usamos anticorpos monoclonais que reconhecem moléculas de diferenciação (CD2, marcador pan T e coadjuvante do receptor de T; CD3, molécula associada ao receptor dos linfócitos nos T; CD4, subtipo de T indutores; CD8, T citotóxicos/supressores; CD57, presente nos T e “natural killer”). Usámos marcadores de activação linfocitária, da fase inicial como CD25, cadeia α do receptor de IL-2, CD69, membro do complexo gene NK, CD71, receptor da transferrina nas células em proliferação, assim como um marcador de fase mais tardia de activação, DR, antigéneo classe II de HLA. Também estudámos os subtipos de CD4 que exprimem CD45RA, células virgens/indutores de supressores e CD29, cadeia β da molécula de adesão VLA-4, associada a células memória ou estimulantes de indutores. CD54, ou seja, ICAM-1 também foi estudado.

As amostras ficaram guardadas à temperatura ambiente até à sua preparação feita num período de 2 horas desde a obtenção.

Resumidamente, uma incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente era feita com 100 μ l da suspensão celular misturada com 10 μ l dos seguintes anticorpos monoclonais adquiridos a Becton Dickinson (BD) ou Coulter (C): Leucogate™ Simulset™ estandardizada (BD-S), FITC/PE/PERCP (BD) e FITC/PE (C) como controlos isotópicos, CD4-FITC/CD45RA-PE da linha estandardizada Cytostat™ (C-CS), CD4-FITC/CD29-PE (C-CS), CD3-FITC/CD8-PE (C-CS) mais HLADR-PERCP (BD), CD3-FITC/CD25-PE (BD), CD57-FITC/CD8-PE (BD-S), CD3-FITC/CD69-PE (BD), CD3-FITC/CD71-PE (BD) e CD2-FITC/CD54-PE (BD), todos conjugados directamente e usados de forma estandardizada para citometria de fluxo. A lise eritrocitária e a preservação celular foi feita numa estação Coulter Multi-Q-Prep™ com reagentes Coulter Q-Prep™. Em seguida, as amostras foram refrigeradas a 5°C até a aquisição num FACScan Becton Dickinson, recorrendo a “software” Lysys II™ seguida de análise em BD PcLysys™, versão 1.1. As amostras foram lavadas duas vezes em PBS imediatamente antes da aquisição. Os mesmos

métodos foram usados com sangue periférico, obtido imediatamente antes da dose matinal de CsA e prednisolona.

Análise de dados

A análise estatística foi feita através do teste t de Student não emparelhado para os níveis de CsA no sangue, Wilcoxon e teste U de Mann-Whitney, para amostras emparelhadas e não emparelhadas, respectivamente com correcção para comparações múltiplas pela fórmula de Edward: $P_c = 1 - (1 - P_o)^n$, onde P_c designa P corrigido, P_o corresponde ao P observado e n é o número de comparações. Ainda foram avaliadas correlações lineares entre as várias subpopulações linfocitárias estudadas, assim como entre elas e os níveis de ciclosporinemia. Foi empregue o programa Statsoft de Statistica™.

Resultados

Foram feitas noventa e três biópsias aspirativas com sucesso em 51 receptores estáveis durante o primeiro mês pós-transplante renal, 40 punções em 32 doentes que desenvolveram 40 crises de rejeição aguda e 8 punções em 8 doentes com rejeição crónica do aloenxerto. As taxas de sucesso das biópsias aspirativas, definidas como o número de punções não classificadas com o grau 6 (16), no total dos exames, foi 92%, aos 7 dias, 95.6%, aos 30 dias, 92.5%, nas rejeições agudas e 100%, nas rejeições crónicas. Os doentes estáveis iriam permanecer livres de qualquer episódio de rejeição, durante pelo menos 6 meses pós-transplante renal. Os diagnósticos das rejeições agudas foram feitos durante as primeiras 6 semanas pós-cirurgia, na maior parte dos casos (mediana/desvio padrão: 20 ± 10.5 dias). As biópsias aspirativas dos receptores com rejeição crónica foram obtidas 591 ± 189 dias pós-transplante. Seis, dos oito doentes, tinham sofrido previamente uma crise de rejeição aguda. Todas as biópsias aspirativas foram feitas sem qualquer complicação, excepto num caso, em que hematúria macroscópica, com a duração de seis horas e resolução espontânea, ocorreu duas horas depois da punção. A ecografia do aloenxerto não revelou qualquer

alteração e este receptor sofria de doença renal poliquística autossômica dominante do adulto, como patologia renal original.

Primeiro investigámos nos doentes estáveis se as subpopulações linfocitárias mudavam durante o primeiro mês pós-transplante, quer na periferia, quer dentro dos aloenxertos. Tal como é demonstrado pelos resultados apresentados nas tabelas 2 e 3, não observámos nenhuma diferença significativa para as várias subpopulações de linfócitos T, entre o dia 7 e o dia 30 pós-transplante, quer no sangue periférico, quer nas amostras das biópsias aspirativas.

Estes resultados sugerem que os efeitos das drogas imunossupressoras em uso nos nossos doentes, nas subpopulações linfocitárias estudadas, são aparentes muito precocemente no pós-transplante renal. Deste modo, os resultados do dia 7 foram misturados com o do dia 30 para análises posteriores.

biópsia aspirativa, mediana / desvio padrão			
	dia 7	dia 30	Wilcoxon (a)
CD3	78 / 9.2	82 / 15.0	0.99
DR	16 / 7.3	17 / 10.3	0.98
CD3CD8	22 / 9.8	30 / 10.7	0.83
CD8	27 / 11.1	32 / 9.7	0.98
CD8DR	2.5 / 0.5	2 / 3.8	0.99
CD4	43 / 14.7	45 / 12.5	0.99
CD4CD45RA	14 / 8.7	15 / 11.1	0.94
CD4CD29	26 / 10.8	25 / 9.7	0.99
CD3CD25	8.5 / 6.6	12 / 7.1	0.99
CD3DR	7 / 6.1	6 / 9.0	0.99
CD2	82 / 8.5	83 / 9.1	0.99
CD2CD54	19 / 16.4	24 / 16.0	0.99
CD3CD69	8 / 5.5	5 / 9.4	0.99
CD45RA	54 / 14.3	51 / 14.5	0.99
CD29	53 / 15.9	49 / 17.9	0.98
CD8CD57	7 / 3.0	4 / 4.4	0.99
CD3CD71	7.5 / 6.2	4 / 9.8	0.99
4.45RA/4.29 (b)	0.5 / 0.4	0.6 / 2.4	0.98
CD25	12 / 8.5	14 / 8.1	0.98
CD57	10.5 / 4.5	6 / 5.1	0.98
CD69	10 / 7.6	6 / 10.5	0.99
CD71	8.5 / 8.2	9 / 11.1	0.99
CD54	40 / 21.6	33 / 17.0	0.99

tabela 2: receptores estáveis, valores expressos em percentagens para cada subtipo de linfócito T. (a): teste Wilcoxon comparando as subpopulações aos 7 e 30 dias, corrigido para múltiplas comparações; (b): quociente CD4CD45RA sobre CD4CD29.

sangue periférico, mediana / desvio padrão			
	dia 7	dia 30	Wilcoxon (a)
CD3	74 / 9.3	78 / 10.3	0.99
DR	24 / 7.5	15.5 / 7.6	0.40
CD3CD8	21.2 / 6.6	30 / 12.8	0.98
CD8	27 / 12.1	31 / 9.5	0.99
CD8DR	1 / 2.4	2.5 / 5.0	0.90
CD4	47 / 13.8	49.5 / 10.3	0.99
CD4CD45RA	19 / 10.7	18 / 14.6	0.99
CD4CD29	27 / 8.5	27.5 / 8.4	0.99
CD3CD25	16 / 7.2	15 / 8.4	0.99
CD3DR	5 / 5.8	5 / 7.7	0.99
CD2	77 / 7.0	83 / 7.1	0.64
CD2CD54	23 / 13.2	24 / 13.1	0.99
CD3CD69	2 / 1.2	2 / 5.2	0.98
CD45RA	64 / 9.6	60 / 13.4	0.99
CD29	57 / 16.1	55 / 17.9	0.99
CD8CD57	3.5 / 2.3	5 / 4.6	0.99
CD3CD71	1 / 1.0	3 / 1.5	0.90
4.45RA/4.29 (b)	0.8 / 0.4	0.6 / 1.0	0.99
CD25	22 / 8.1	21 / 9.1	0.99
CD57	5.5 / 3.5	9 / 6.5	0.98
CD69	3 / 1.6	4 / 2.5	0.98
CD71	3.5 / 1.9	4 / 1.5	0.99
CD54	44 / 13.9	38 / 10.4	0.98

tabela 3: doentes estáveis, resultados expressos em %. (a): teste Wilcoxon comparando dia 7 com dia 30, corrigido para múltiplas comparações; (b): quociente CD4CD45RA sobre CD4CD29.

No grupo de doentes estáveis, analisámos as subpopulações linfocitárias presentes no sangue periférico e as encontradas nas amostras aspiradas dos aloenxertos. Não encontramos diferenças significativas ao comparar CD3, DR, CD3DR, CD8, CD8DR, CD2, CD2CD54, CD54, CD4, CD8CD57, CD57 e a razão CD4CD45RA / CD4CD29, presentes nos dois tipos de amostras. Pelo contrário, as outras subpopulações de T mostraram diferenças significativas, tal como se apresenta na tabela 4.

	Mediana / desvio padrão		Wilcoxon
	aspirado	sangue periférico	
CD3CD8	27 / 9.1	24 / 9.2	0.018
CD4CD45RA	18 / 11.7	24 / 12.6	0.005
CD4CD29	25 / 9.8	28.0 / 8.3	0.02
CD3CD25	9.5 / 7.9	14.5 / 8.4	0.001
CD25	14 / 9.0	20 / 9.5	<0.0001
CD3CD69	4 / 6.4	1 / 1.0	<0.0001
CD69	4.5 / 2.8	2 / 2.0	<0.0001
CD45RA	56 / 14.6	64 / 12.7	<0.0001
CD29	46.5 / 17.2	57 / 15.1	0.0003
CD3CD71	4 / 13.3	1 / 0.6	0.012
CD71	5 / 15.6	2 / 1.3	0.049

tabela 4: análise por teste Wilcoxon, corrigido para múltiplas comparações dos subtipos linfocitários presentes no aspirado versus no sangue periférico durante o primeiro mês pós Tx renal em doentes estáveis.

O mesmo tipo de análise comparativa foi feito entre T presentes na amostra da biópsia aspirativa versus T presentes no sangue periférico, para o grupo com rejeição aguda. Assim, não foram detectadas diferenças significativas para as subpopulações CD3, CD4, CD4CD29, CD3CD25, CD25, CD2, CD29, CD8CD57, CD71 e CD54.

Os outros fenótipos de T estudados apresentaram diferenças altamente significativas, sendo aparente que todos os subtipos tinham a sua expressão aumentada nas biópsias aspirativas comparadas com o sangue periférico, com excepção notória de CD4CD45RA e CD45RA que, pelo contrário, estavam significativamente mais elevados no sangue periférico que no aspirado (tabela 5).

	Mediana / desvio padrão		Wilcoxon
	Aspirado	sangue periférico	
DR	20 / 14.4	15.5 / 8.6	0.049
CD3CD8	30 / 10.9	24.5 / 9.6	0.049
CD8	33.5 / 11.7	29 / 9.4	0.025
CD8DR	5.5 / 6.6	2 / 2.6	0.002
CD4CD45RA	11 / 8.8	19.5 / 14.5	<0.00001
CD3DR	10 / 7.0	4 / 3.6	<0.00001
CD2CD54	28.5 / 18.0	19.5 / 12.3	0.005
CD3CD69	11.5 / 14.3	2.2 / 1.3	0.0008
CD69	14 / 18.7	4 / 2.5	<0.00001
CD45RA	56 / 14.3	59.5 / 12.7	0.017
CD3CD71	6 / 12.9	2 / 2.2	0.049
4.45RA / 4.29 (a)	0.46 / 0.43	0.74 / 0.66	0.010

tabela 5: análise comparativa por teste Wilcoxon dos fenótipos de linfócitos T presentes nos aspirados versus no sangue periférico, expressos em percentagem, com correcção para múltiplas comparações. (a): razão CD4CD45RA sobre CD4CD29.

Seguidamente comparámos os fenótipos de T presentes nos doentes estáveis versus casos com rejeição aguda, quer no sangue periférico, quer na punção aspirativa, por meio do teste U de Mann-Whitney, com correcção para comparações múltiplas. O sangue periférico não mostrou qualquer diferença significativa entre os dois grupos de doentes. Nas amostras da biópsia aspirativa, também não encontramos diferenças significativas para as populações de T CD2, CD3, CD3CD8, CD3CD25, CD4, CD4CD29, CD29, CD45RA, CD69, CD3CD71 e CD71. Nos casos de rejeição aguda, CD8 e CD25 estavam expressos de forma quase significativamente maior do que nos estáveis, $p=0.064$ e $p=0.060$, respectivamente. Por outro lado, as punções aspirativas mostraram diferenças significativas nas seguintes subpopulações: DR, $p=0.025$, CD8DR, 0.0005 , CD4CD45RA, $p=0.02$, CD3DR, $p=0.0005$, CD2CD54, $p=0.024$, CD54, $p=0.049$, CD3CD69, $p=0.042$, CD8CD57, $p=0.01$ e CD57, $p=0.041$. Todos estes fenótipos estavam significativamente mais elevados nos casos de rejeição, com

excepção de CD4CD45RA, cuja expressão estava significativamente diminuída, durante a rejeição aguda (fig1).

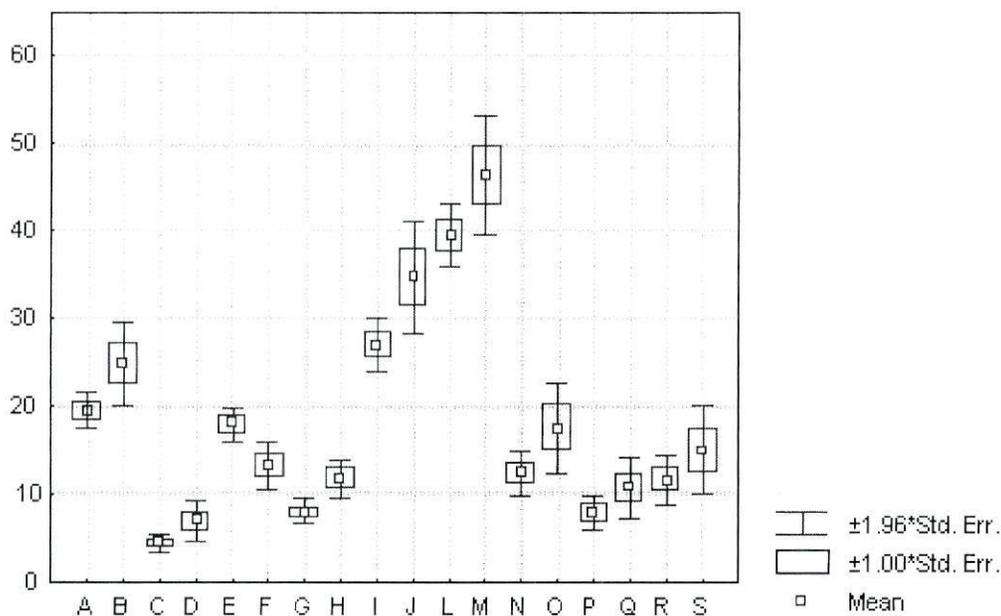


fig.1: fenótipos de T nas punções aspirativas; A,C,E,G,I,L,N,P,R: doentes estáveis; B,D,F,H,J,M,O,Q,S: rejeições agudas. A-B: DR; C-D: CD8DR; E-F: CD4CD45RA, G-H: CD3DR; I-J: CD2CD54; L-M: CD54; N-O: CD3CD69; P-Q: CD8CD57; R-S: CD57. Eixo y, valores em percentagem.

Igualmente, os quocientes punção aspirativa sobre sangue periférico eram significativamente maiores nos casos com rejeição aguda do que nos doentes estáveis, para as subpopulações CD3CD25, $p=0.048$ e CD3DR, $p<0.00001$. Por outro lado, a razão CD4CD45RA sobre CD4CD29, na biópsia aspirativa, era significativamente maior nos casos de rejeição aguda do que nos doentes estáveis, $p=0.025$.

Não registámos diferenças significativas entre os doentes estáveis e aqueles que desenvolveram crises imunológicas para compatibilidade HLA-A+B+DR ou HLA-B+DR. As ciclosporinemias estavam significativamente mais elevadas nos doentes estáveis do que nos doentes com rejeição aguda, $p=0.04$.

Foram analisadas, nos doentes sem e com rejeição aguda, as correlações entre os níveis de CsA no sangue total e as subpopulações linfocitárias estudadas. Nos

doentes estáveis, nas biópsias aspirativas, encontrámos correlação positiva significativa com CD4CD29, $p=0.030$ e correlações negativas com CD3CD25 ($p=0.024$), CD3CD71 ($p=0.047$) e com CD2CD54 ($p=0.042$). Nos doentes com rejeição aguda, apenas encontrámos uma correlação negativa significativa com CD2CD54 da punção ($p=0.027$).

Para o sangue periférico, fizemos a mesma análise, primeiro, nos doentes estáveis, onde apenas CD25 estava correlacionado negativamente com CsA ($p=0.019$) e depois nos transplantados com rejeição aguda, onde CD3 e CD2 (fig.2) mostraram correlações significativas e negativas com CsA, respectivamente $p=0.044$ e $p=0.001$.

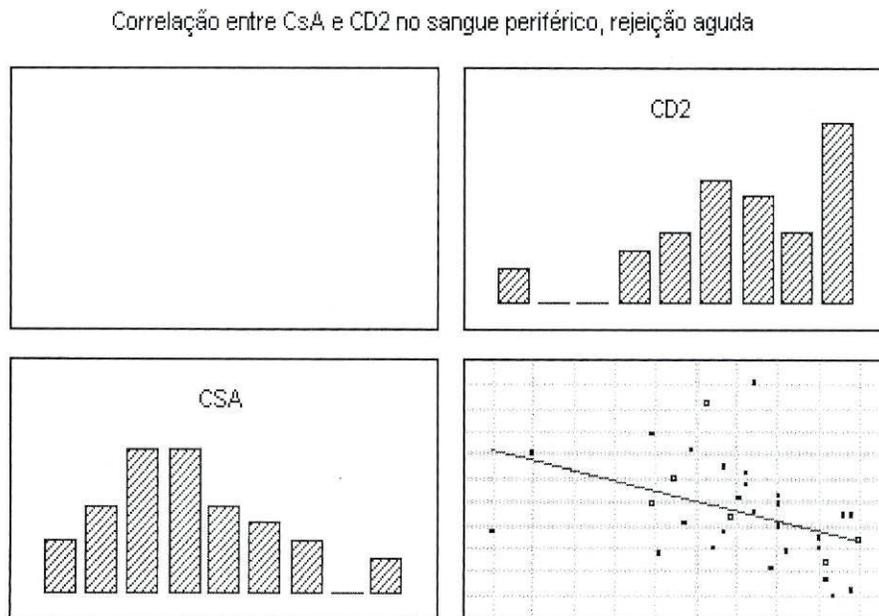


fig.2

Seguidamente, investigámos as correlações entre as várias subpopulações de T presentes intra-enxerto, nos casos de rejeição aguda. Verificámos correlações positivas significativas entre CD8CD57 versus CD57, $p<0.0001$, entre CD3DR versus CD8DR, $p=0.001$ (fig.3), e entre DR versus CD3DR, $p<0.0001$ (fig.4).

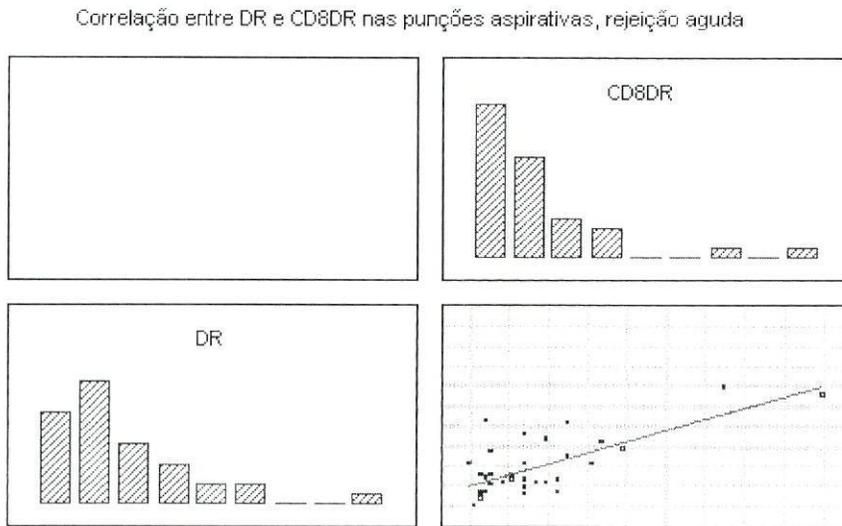


fig.3

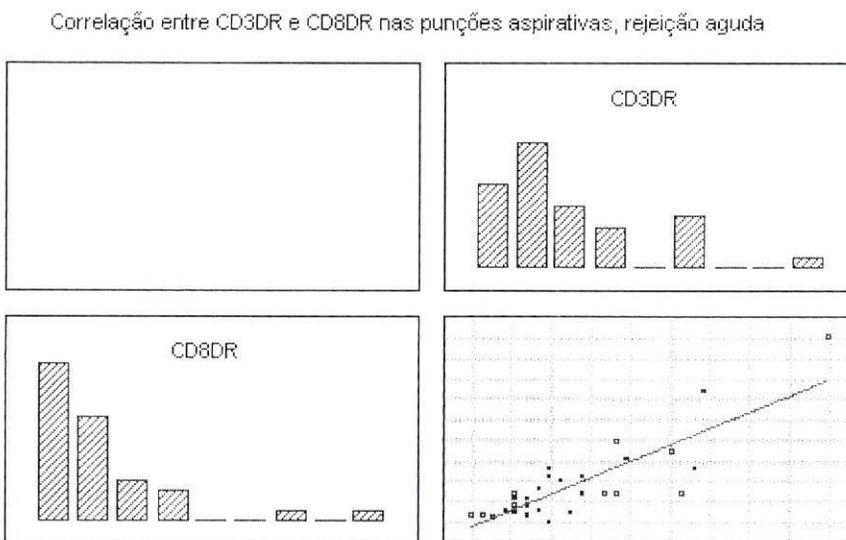


fig.4

Algo inesperadamente, encontrámos correlações negativas, se bem que sem atingir significado entre DR versus CD4CD29 ($r = -0.43$) e DR versus CD8CD57 ($r = -0.37$) o que, de certo modo, sugere que estímulos independentes são responsáveis pela direcção destes fenótipos de T intra-enxerto, durante as crises imunológicas. O mesmo foi observado para o par CD3CD25 / CD8CD57.

Os resultados obtidos no estudo por citometria de fluxo do sangue periférico não permitiam diferenciar transplantados renais sem e com rejeição. Apesar das várias

diferenças significativas encontradas em vários fenótipos de T, presentes nos aspirados, entre estes dois grupos de doentes, o desvio padrão de cada subtipo linfocitário tornava inviável o uso de apenas um fenótipo, como adjuvante no diagnóstico das crises de rejeição. Deste modo, testámos se combinando os resultados dos fenótipos que maiores diferenças mostraram durante a rejeição aguda, poderíamos conseguir diagnosticar estas crises. Para este fim, as expressões dos fenótipos DR, CD8DR, CD3DR e CD8CD57 nos aspirados, conjuntamente com os quocientes aspirado sobre sangue periférico para CD3CD25 e CD3DR foram multiplicados pelos coeficientes, determinados empiricamente, respectivamente 8, 32, 16, 4, 40 e 100 e somados. A este total foi subtraído a expressão de CD4CD45RA no aspirado e multiplicado por 4, porque este fenótipo diminuía significativamente nas rejeições agudas. Os totais finais estão apresentados na tabela 6.

	A (2)	B (3)	C (4)
mediana (1)	275	796	985
desvio padrão	231.4	308.5	249.6
Mann-Whitney	AvsB: <0.00001	BvsC: 0.31	CvsA: <0.00001

tabela 6: comparação entre doentes estáveis e dois grupos de doentes com rejeição para fenótipos de T. (1): soma da % de (DR×8 mais CD8DR×32 mais CD3DR×16 mais CD8CD57×4, observados no aspirado) + (quociente aspirado sobre sangue de CD3CD25×40 mais CD3DR×100) - (CD4CD45RA×4, no aspirado); (2): doentes sem rejeição aguda; (3): rejeições agudas com resposta a bolus de metilprednisolona, 18 casos; (4): rejeições agudas resistentes a metilprednisolona ou irreversíveis, 22 casos.

Testámos o total de 630 como valor discriminatório e desse modo, a sensibilidade e a especificidade para rejeição aguda era 84.8% e 91.5%, respectivamente. Os valores preditor negativo e positivo eram 94.5% e 77.7%.

Se excluirmos quatro falsos positivos correspondentes a transplantados com boa função do aloenxerto, então, o valor preditor positivo subia para 87.5%.

Dos trinta e dois receptores que sofreram crises imunológicas, em dez, tínhamos obtido biópsia aspirativa aos 7 dias pós-transplante, altura em que os aloenxertos mantinham uma função estável. Os dez doentes iriam desenvolver as crises imunológicas durante as primeiras seis semanas pós-transplante renal, 10 ± 10.5 dias após a punção aspirativa do dia 7. Comparámos os resultados do estudo citofluorométrico dos aspirados do dia 7, entre os receptores que iriam permanecer livres de rejeição e os observados, neste subgrupo de dez doentes. Infelizmente, não podíamos prever os episódios de rejeição aguda, apenas a expressão dos fenótipos DR e CD57 estava mais elevada no subgrupo que iria sofrer rejeição, mas de forma não significativa.

Os níveis de ciclosporinemia dos doentes com rejeição crónica não diferiam dos doentes estáveis durante o primeiro mês pós-transplante renal, nem dos doentes com rejeição aguda.

Na tabela 7, apresentámos os resultados do estudo por citometria de fluxo do sangue periférico e das amostras obtidas por punção aspirativa.

	mediana / desvio padrão	
	biópsia aspirativa	sangue periférico
CD3	82.5 / 10.2	87 / 5.1
DR	19.5 / 8.3	13 / 4.8
CD3CD8	33 / 10.9	30.5 / 8.9
CD8	36 / 11	33.5 / 9.2
CD8DR	6.5 / 5.3	3 / 5.2
CD4	48.5 / 12.7	54 / 9.9
CD4CD45RA	16 / 11.7	22 / 11.5
CD4CD29	23 / 10.8	33 / 5.9
CD3CD25	11 / 5.8	12 / 8.3
CD25	13.5 / 4.6	15.5 / 8.0
CD3DR	10.5 / 6.3	4 / 5.2
CD2	91 / 7.9	91.5 / 4.5
CD2CD54	32 / 4.1	19 / 7.8
CD54	36 / 11.7	27 / 10.5
CD3CD69	21.5 / 16.5	3 / 1.2
CD69	25 / 17.1	3 / 1.7
CD45RA	57.5 / 13.3	57.5 / 8.6
CD29	56 / 21.1	60 / 4.2
CD3CD71	11 / 12.1	1.85 / 2.2
CD71	12 / 11.7	3.5 / 2.1
4.45RA / 4.29 (a)	0.7 / 0.6	0.7 / 0.34
CD8CD57	10 / 5.1	5.5 / 2.1
CD57	14 / 5.5	6 / 2.0

tabela 7: estudos citofluorométricos nos doentes com rejeição crónica. (a): quociente CD4CD45RA sobre CD4CD29.

Determinámos os quocientes da expressão dos fenótipos no aspirado sobre o sangue periférico para CD2CD54, 1.3 ± 0.4 , CD3DR, 2.25 ± 1.8 e CD3CD69, 11.0 ± 3.8 .

Analisámos a expressão dos fenótipos de T no sangue periférico, nos doentes estáveis comparados com os doentes com rejeição crónica e encontramos diferenças significativas para CD3, CD3CD8 e CD2, mais elevados na rejeição crónica, respectivamente $p= 0.008$, $p= 0.022$ e $p= 0.039$. Pelo contrário, não registámos qualquer diferença significativa, comparando doentes com rejeição aguda versus rejeição crónica.

Achámos interessante a ausência de diferenças significativas nos fenótipos de T presentes nos aspirados dos doentes com rejeição aguda comparados com rejeição crónica. Quando fizemos a mesma análise comparativa entre os doentes estáveis e os doentes com rejeição crónica, vários subtipos diferiam de forma significativa nos aspirados, sempre com maior expressão na rejeição crónica (entre parênteses p): CD3CD8 (0.019), CD8 (0.013), CD8DR (0.0005), CD3DR (0.034), CD3CD69 (0.009), CD69 (0.0091). Também a razão, aspirado sobre sangue periférico, para CD3DR era significativamente maior na rejeição crónica (0.0002).

Nas figs 5 e 6, apresentámos dois exemplos de estudo citofluorométrico. Na fig. 5, está representado um receptor estável, analisado aos 7 dias pós-transplante. Na fig.6, um receptor com rejeição aguda.

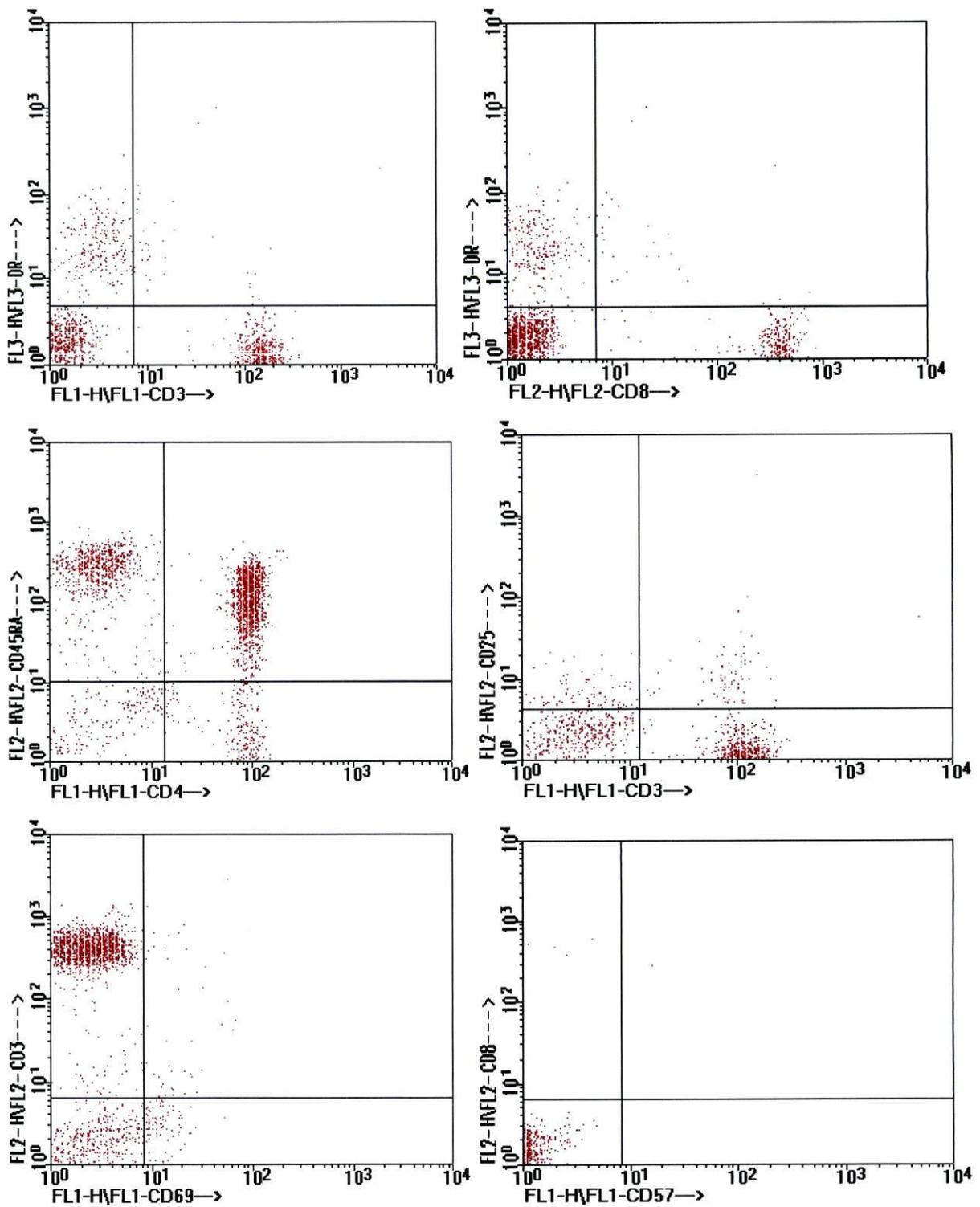


Fig 5-a: Sangue periférico de receptor estável, 7 dias pós-transplante

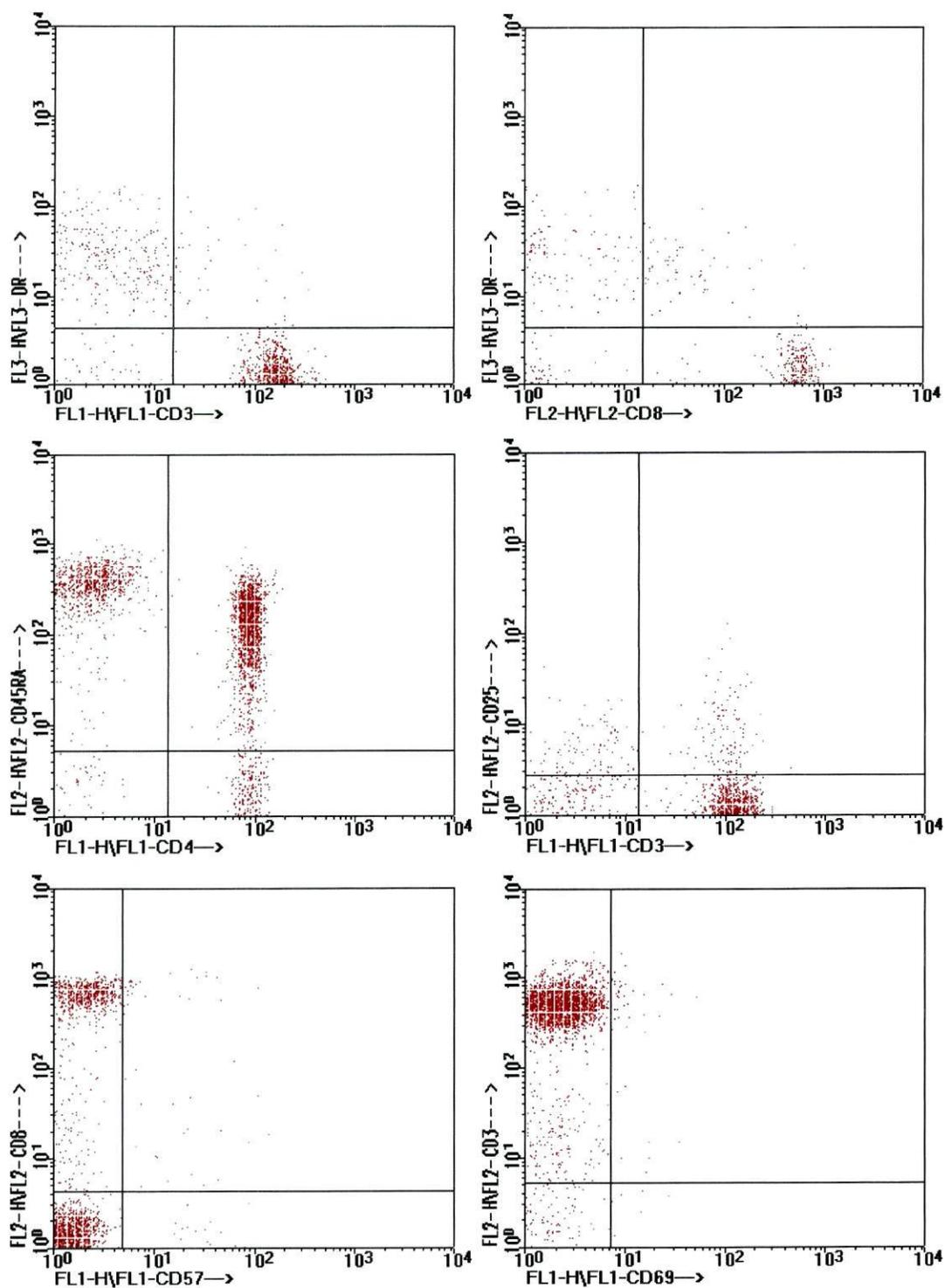


Fig 5-b: Biópsia aspirativa, receptor estável, 7 dias pós-transplante

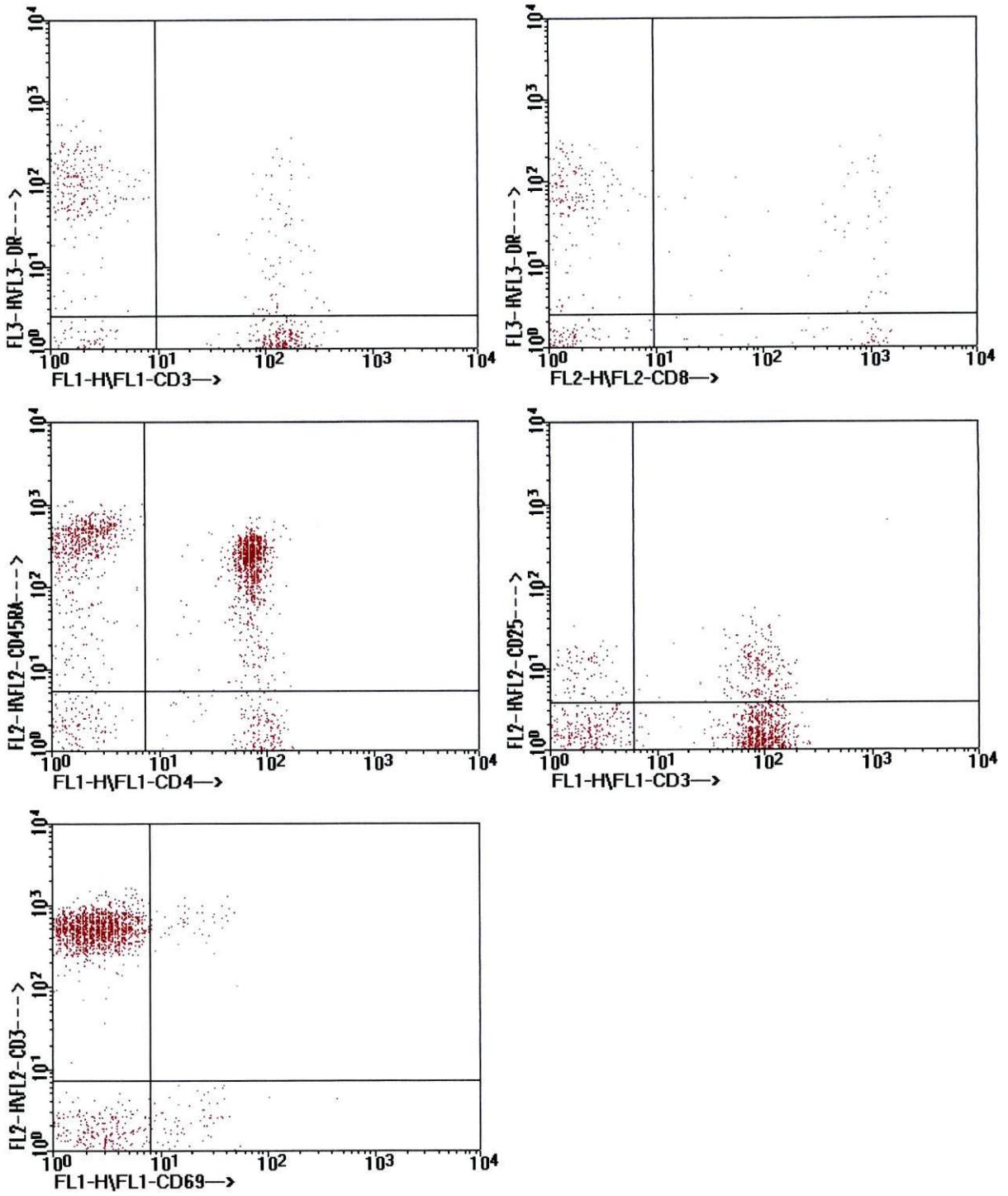


Fig 6a-: Sangue periférico de receptor com rejeição aguda

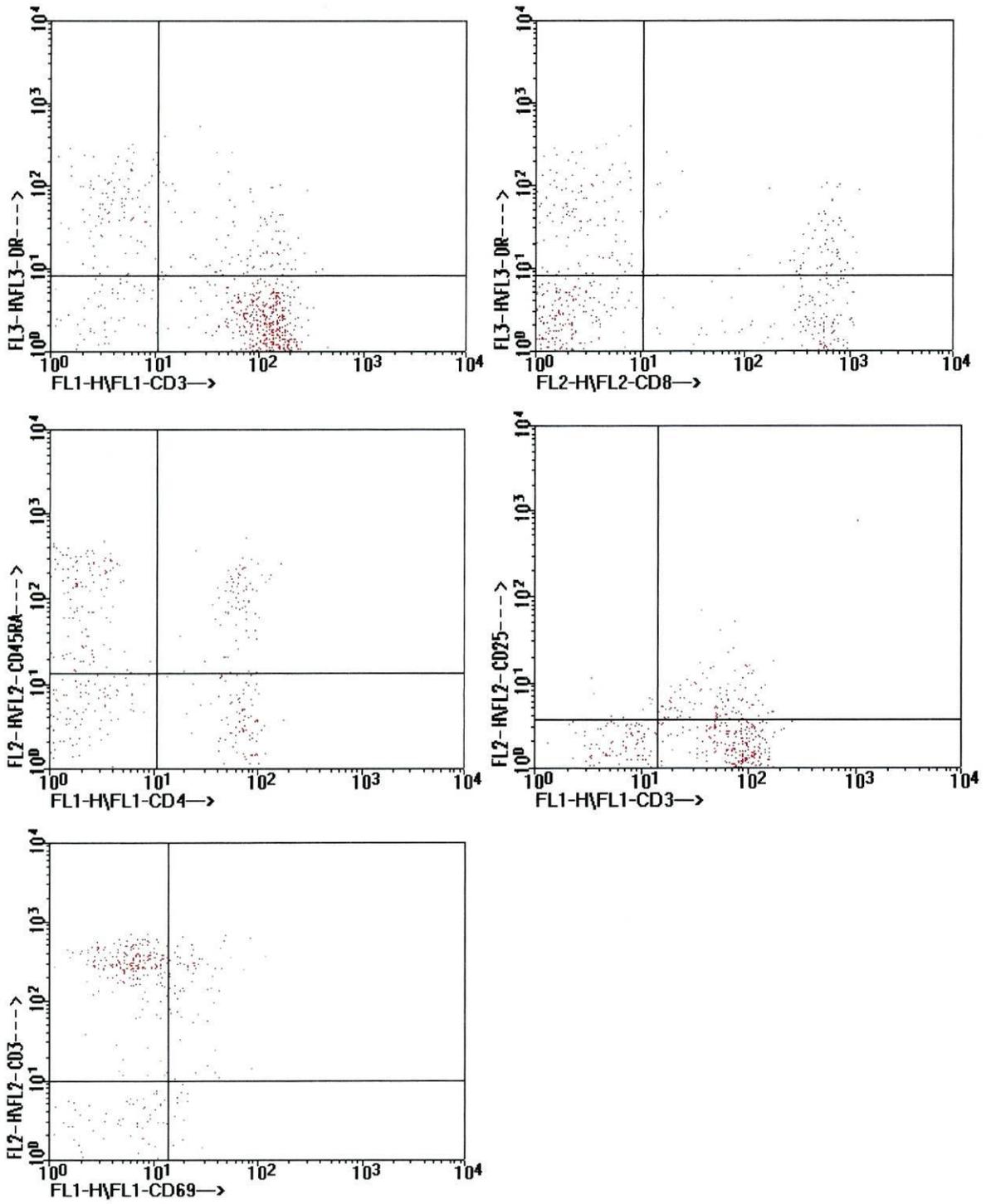


Fig 6-b: Biópsia aspirativa e receptor com rejeição aguda

Discussão

Os nossos resultados fundamentam várias conclusões.

Primeiro, o estudo citofluorométrico das punções aspirativas revelou alterações significativas em nove dos vinte dois fenótipos de T, estudados quando comparámos doentes estáveis com doentes com rejeição aguda. Foi possível atingir uma sensibilidade e especificidade adequada para o diagnóstico de rejeição aguda, pela combinação dos resultados medidos nos aspirados, conjuntamente com os quocientes aspirado sobre sangue periférico dos subtipos CD3CD25 e CD3DR.

Segundo, o estudo por citometria de fluxo do sangue periférico apenas, não traz uma contribuição útil para o diagnóstico da rejeição aguda na fase inicial pós-transplante.

Terceiro, as subpopulações linfocitárias presentes na circulação e infiltrantes nos aloenxertos parecem ser diferentes, quer nos doentes estáveis, durante o primeiro mês pós-cirurgia, quer nos doentes que desenvolvem rejeição aguda.

Quarto, na rejeição crónica, algumas subpopulações de T diferem no sangue periférico, comparadas com os doentes estáveis e esta diferença afecta um maior número de subtipos de T, de forma mais significativa, quando analisámos os linfócitos T presentes nas punções aspirativas. Pelo contrário, ao comparar doentes com rejeição crónica e aguda não encontramos diferenças significativas nos estudos do sangue periférico e das biópsias aspirativas.

Ficámos surpreendidos pela ausência de diferenças significativas nos doentes livres de rejeição, ao comparar as subpopulações de linfócitos T presentes na circulação e dentro do aloenxerto entre o dia 7 e o dia 30 pós-transplantação. Supomos que este resultado será a contrapartida para a rapidez dos efeitos das drogas imunossupressoras, em uso, têm sobre T.

Achámos muito interessante observar, nos doentes livres de rejeição, a expressão aumentada de alguns marcadores de activação dentro do aloenxerto, comparada com a medida no sangue periférico, com excepção importante de CD4CD29 e CD3CD25. Isto poderá ser um sinal indirecto de que um processo activo está em curso intra-enxerto e que eventualmente conduzirá a um estado de "tolerância", embora necessitando de drogas imunossupressoras, o que, em parte, está

de acordo com o que outros autores relataram (Armstrong e col., 1987; Wood e col., 1988; Heelan e col., 1996). A significativamente maior expressão nos doentes livres de rejeição de CD3CD69 nos enxertos renais, comparada com a verificada no sangue periférico, supostamente uma consequência da activação do complexo CD3-receptor do linfócito T (Testi e col., 1994), poderá constituir outro sinal deste mecanismo activo. Por outro lado, a menor expressão de CD3CD25 nos rins transplantados, comparada com a observada no sangue periférico destes doentes, poderá ser um reflexo da produção in situ de IL-10, como adiante veremos, com a consequente inibição de síntese de IL-2 e resultante diminuição da expressão do receptor de IL-2. Também poderá constituir a contrapartida para a maior acumulação de CsA no rim, comparada com a registada no sangue total, tal como é observado no rato, pelo menos (Batiuk e col., 1996).

Algumas dúvidas, não fundamentadas, poderiam ser levantadas pelos diferentes tempos de obtenção do sangue periférico e da punção aspirativa. De facto, se alguma influência houvesse, então o resultado seria no sentido oposto ao observado, ou seja, uma menor expressão dos marcadores de activação deveria ter sido observada nas punções aspirativas que coincidiram, grosso modo, com os picos de ciclosporinemia, enquanto que a colheita do sangue periférica seria simultânea com os níveis pré-dose de CsA (e também de prednisolona). Além disso, pelo que é conhecido da modulação de várias moléculas da membrana linfocitária, como CD3CD69 (Testi e col., 1994), permite afastar tal eventualidade.

Nos doentes com rejeição aguda, a expressão dos marcadores de activação nos linfócitos infiltrantes nos aloenxertos estava aumentada de forma significativa, comparada com a observada nos T circulantes. Ao contrário do que outros autores relataram (Batiuk e col., 1996; von Baher e col., 1989), só por si a análise por citometria de fluxo do sangue periférico não contribuiu para o diagnóstico de rejeição aguda. Realmente, tal como esses autores descreveram, também observámos uma maior expressão de CD3CD25 e CD3CD71 em circulação, nos casos de rejeição aguda, mas, no nosso estudo, de forma não significativa.

Assim como P. Reinke e col. (Reinke e col., 1994) sugeriram, também nós pensámos que apenas nos casos de rejeição aguda mais tardia, que geralmente se desenvolvem mais lentamente comparadas com as rejeições que ocorrem nas fases mais precoces pós-transplante, que nós estudamos, é possível observar no sangue periférico um significativo desenvolvimento da cascata de activação de T alocompetentes.

Diferentemente, a análise citofluorométrica das biópsias aspirativas revelou diferenças significativas nos casos de rejeição aguda para vários subtipos de T. Principalmente, as expressões de DR conjuntamente com CD3DR e CD8DR emergiram como indicadores sólidos de rejeição aguda, tal como outros autores tinham relatado previamente (Totterman e col., 1989; Ibrahim e col., 1995). Além disso, os quocientes biópsia aspirativa sobre sangue periférico para CD3CD25 e CD3DR também provaram ser altamente diferentes nas rejeições agudas, o que aponta para a deslocação preferencial intra-transplante de linfócitos T, com receptor para IL-2 e linfócitos T activados (CD3DR).

Surpreendentemente, CD25 não mudou de forma significativa no órgão transplantado, com o desenvolvimento da rejeição aguda. Este achado está em contradição com a síntese de IL-2 pelas células infiltrantes que provou ser um óptimo indicador de rejeição e mesmo prevê-la, como demonstraremos mais adiante. Especulamos que uma análise mais fina da expressão do receptor de IL-2 poderia trazer diferentes resultados, especialmente se tivéssemos analisado os diferentes graus de expressão, alto e baixo, do modo que outros têm sugerido (Dallman e col., 1991,a).

A expressão de CD8CD57 aumentou de forma significativa durante a rejeição aguda, o que está de acordo com o observado por outros autores (Gibson e col., 1996), mas não por todos (Halwani e col., 1992).

Tal como esperávamos a expressão de ICAM-1 (CD54) aumentou durante a rejeição aguda, de forma significativa. A importância desta molécula de adesão é suficientemente conhecida, a ponto de ensaios clínicos com anticorpo monoclonal anti- ICAM-1 terem sido ensaiados na clínica do transplante renal, com algum sucesso (Haug e col., 1993).

A ligeira predominância da subida de CD8, durante a rejeição aguda, por nós documentada, também vem de encontro ao que outros descreveram (Ibrahim e col., 1995).

Se levássemos em conta apenas um subtipo de T presente no rim, não seria possível obter bom indicador do desenvolvimento de um crise imunológica aguda, facto nada inesperado, tendo em conta a complexidade da cascata imunológica e os mecanismos redundantes que lhe são próprios. No entanto, através da combinação dos resultados das subpopulações de T que mais significativamente mudavam com a rejeição aguda, conseguimos obter sensibilidade e especificidade muito satisfatórias, incluindo um valor preditor positivo de 87.5%, para rejeição aguda no grupo de transplantes renais com disfunção clínica. Também o valor preditor negativo atingido, 94.5%, é muito interessante.

Queremos reforçar o valor dos nossos resultados, mais uma vez, pela baixa incidência de rejeição aguda durante o primeiro ano pós-transplante, que é aproximadamente de 20%. As crises imunológicas irreversíveis ou resistentes a pulsos de metilprednisolona mostraram sinais de maior activação linfocitária intra-enxerto, mas não de forma significativa. Pensamos que isto poderá ser a consequência do envolvimento de outras linhas celulares neste tipo de rejeições, especialmente os monócitos (Kooijmans-Coutinho e col., 1996), que não foram objecto de estudo.

As compatibilidades HLA A, B e DR não mostraram correlação significativa com os marcadores de activação dos linfócitos em circulação ou infiltrantes nos rins, quer nos doentes estáveis, quer nos doentes com rejeição aguda.

Os resultados citofluorométricos mostraram-se incapazes de prever as crises de rejeição aguda, num subgrupo de dez doentes que, ao dia 7 pós-transplante, estavam clinicamente estáveis, mas que desenvolveram as crises imunológicas 10 dias depois, em média. Isto sugere que as alterações fenotípicas observadas nos T infiltrantes durante a rejeição aguda, provavelmente têm lugar num período mais curto, antes da evidência clínica de rejeição. Apesar disso, achamos digno de nota o aumento quase significativo de CD57 e DR nos aspirados obtidos ao dia 7 pós-transplante e especulamos que tais diferenças poderão atingir significado dentro de intervalos de tempo mais curto, antes das rejeições.

A nossa busca de correlações entre os níveis de CsA no sangue e a expressão dos fenótipos de T não teve sucesso relevante. Mesmo assim, correlações significativas negativas foram observadas entre CsA e a expressão de alguns marcadores de activação intra-enxerto, tal como CD3CD25, CD3CD71 e CD2CD54, nos doentes livres de rejeição e apenas com CD2CD54, nos doentes com rejeição aguda. Inesperadamente, encontramos uma correlação positiva entre CD4CD29 intra-rim e CsA, nos doentes livres de rejeição aguda. Mais uma vez, o sangue periférico mostrou a pobreza da sua contribuição para o estudo; apenas CD25 se correlacionou significativamente de forma negativa com CsA, nos casos sem rejeição e CD3 e CD2 mostraram correlação também negativa nos casos com rejeição. Cabe, no entanto, realçar que a correlação com CD2 foi a mais relevante de todas as analisadas. Especulamos que estes resultados são o espelho da conhecida pouca correlação entre os níveis pré-dose de CsA e os acontecimentos clínicos (Lindholm e col., 1993). Talvez que a área debaixo da curva de CsA produzisse diferentes resultados.

As correlações entre as várias subpopulações de T presentes nos rins durante a rejeição aguda mostraram que o(s) estímulo(s) para a sua localização intraenxerto diferem entre algumas delas. Por outro lado, a correlação muito estreita entre CD8CD57 e CD57, $r = 0.96$ intra-enxerto é um sinal indirecto que os linfócitos "natural killer" não parecem desempenhar papel relevante na evolução das rejeições agudas. Alternativamente, este resultado poderia indicar a conhecida presença transitória e precoce destes linfócitos nas rejeições agudas, sugerindo que as punções aspirativas foram feitas numa fase mais avançada das crises imunológicas, o que não nos parece ter acontecido.

Os dados obtidos na rejeição crónica também merecem algumas considerações. Achámos relevante a ausência de diferenças significativas entre as várias subpopulações de T, presentes no sangue periférico e intraenxerto, ao compararmos os doentes com os dois tipos de rejeição. Isto sugere que os linfócitos T deverão desempenhar papel muito relevante na rejeição crónica, do modo como alguns autores entendem. Por outro lado, verificámos que ao comparar os doentes com rejeição crónica com os doentes estáveis, várias diferenças foram encontradas, quer no

sangue periférico, quer especialmente nas células T presentes nas punções aspirativas, muito particularmente CD3CD69 e CD8DR. Também o quociente aspirado sobre o sangue

periférico para CD3DR diferiu de forma muito significativa entre os doentes estáveis e os que sofriam de rejeição crónica. Por outro lado, CD3CD25 não mostrou alterações significativas.

Deste modo, o nosso estudo comprovou uma maior activação de T intraenxerto, durante as rejeições crónicas, ao mesmo tempo que sugere a importância de CD8DR neste processo. A ausência de diferença para CD3CD25, entendemos como o espelho da ineficácia de CsA na rejeição crónica, apontando para mecanismos independentes de IL-2 para o seu desenvolvimento, tal como mais adiante outros resultados irão confirmar.

Em resumo, os nossos resultados põem em evidência a utilidade do estudo por citometria das biópsias aspirativas. Provavelmente, se tivéssemos tido a oportunidade de realizar as punções com intervalos mais estreitos, conforme aliás é aconselhado (Hayry, 1989; Manfo e col., 1995), os nossos resultados poderiam ter sido ainda melhores. Mesmo assim, sugerimos que o estudo citofluorométrico pós-transplante renal está indicado, quer por poder tornar-se num meio diagnóstico rápido e seguro, durante a fase inicial pós-transplantação, quer como instrumento para uma melhor compreensão dos acontecimentos em curso no aloenxerto. A análise do sangue periférico tem também utilidade, dado que torna possível observar as relações com os aspirados para alguns subtipos de T, que provaram ser muito úteis no diagnóstico da rejeição.

Planeamos introduzir algumas pequenas modificações no painel de anticorpos para análise de forma a melhorar ainda mais os resultados do estudo citofluorométrico.

IV- A nova formulação de CsA altera os subtipos de linfócitos T na circulação e dentro do aloenxerto renal.

Introdução

A nova formulação de ciclosporina A, Neoral™ tem propriedades farmacodinâmicas diferentes (Barone e col., 1996), quando comparada com a formulação precedente, SIM™.

Vários estudos têm documentado uma maior concentração máxima sanguínea (C_{max}), um intervalo de tempo mais curto para atingir a concentração máxima (T_{max}), assim como uma maior relação área debaixo da curva de concentração sanguínea sobre a dose administrada (AUC/dose) (Barone e col., 1996; Kahan e col., 1995). No entanto, as concentrações pré-dose (T₀) não foram alteradas de forma significativa, quando Neoral™ e SIM™ são administradas em doses similares (Barone e col., 1996).

Previamente, vários estudos têm identificado a relação AUC/dose como o parâmetro mais importante de eficácia clínica, no que respeita a SIM™ (Lindholm e Kahan, 1993; Kasiske e col., 1988), quer analisando a prevalência de rejeição aguda, quer a respeitante à rejeição crónica (Kahan e col., 1996).

Os primeiros relatos sobre receptores de transplante renal, tratados com Neoral™, sugerem uma tendência para uma menor incidência de crises de rejeição aguda, que por sua vez, são de menor intensidade (Barone e col., 1996). Estudos citofluorométricos dos linfócitos T circulantes e infiltrantes no aloenxerto renal têm revelado várias diferenças para subtipos de T, na comparação de transplantados estáveis com aqueles com crises de rejeição aguda.

Assim, a expressão do receptor para a interleucina (IL)-2 está aumentada no sangue periférico (Reed e col., 1989), enquanto que CD3DR, indicador tardio de activação, está significativamente mais elevado, pelo menos, nas rejeições agudas tardias (Reinke e col., 1994). Por outro lado, as modificações observadas intra-enxerto renal são mais consistentes, principalmente aumentos da expressão do receptor de IL-2 e CD3DR têm sido observados, quer quando estudados por citometria de fluxo (Totterman e col., 1989), quer por imunoperoxidase (Serón e col., 1989). Ibrahim e

col. relataram que a elevação da razão CD45RO⁺ sobre CD45RA⁺, quando é observada em padrão difuso, na biópsia do transplante renal, tem valor como diagnóstico de crise aguda de rejeição (Ibrahim e col., 1995). CsA, através da inibição que provoca na actividade da calcineurina, diminui a produção de interleucina-2 e interferão- γ (Batiuk e col., 1996); como consequência, as expressões do receptor de IL-2 e HLA-DR diminuem, respectivamente (Batiuk e col., 1996). Também, CsA é suposta poupar as células supressoras e afectar predominantemente o subtipo de T indutores (Kupiec-Weglinski e col., 1984). Além disso, ao inibir a síntese de IL-2, CsA pode diminuir a transição de T de “virgem” para “memória” (Zhang e col., 1995).

Pusemos como hipótese de estudo que os subtipos de T, circulantes e infiltrantes no aloenxerto renal, poderiam diferir, quando NeoralTM substitui SIMTM e, especialmente, focamos a nossa atenção nos subtipos de linfócitos T, que além de sofrerem a regulação pela CsA, apresentam aumentos e diminuições significativas, quando doentes com rejeição aguda são comparados com doentes estáveis, de acordo com o que tem sido observado por outros e também segundo a nossa própria experiência (Oliveira e col., 1995).

Doentes e métodos

Doentes

Neste estudo, apenas receptores de transplante renal que permaneceram livres de crises de rejeição aguda, durante os primeiros seis meses pós-cirurgia foram admitidos, de forma a evitarmos as múltiplas variáveis inerentes aos diferentes tipos e graus de rejeição aguda.

Quarenta transplantados renais foram tratados com SIMTM: 28, do sexo masculino e 12, do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 16 e os 62 anos. As doenças renais originais distribuíram-se por glomerulonefrite crónica (10 casos), nefrite hereditária (4), nefrite tubulointersticial (4), doença renal policística do adulto (8), nefropatia diabética (6), nefropatia IgA (6), glomeruloesclerose focal e segmentar (1) e glomerulonefrite rapidamente progressiva (1).

Dezassete receptores foram tratados com Neoral™: 11, do sexo masculino e 6, do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 22 e os 46 anos. As correspondentes doenças renais tiveram como etiologia a glomerulonefrite crónica (8), nefrite hereditária (1), nefrite tubulointerstitial (4), nefropatia IgA (2), nefropatia diabética (1) e esclerose focal e segmentar (1).

Todos receberam primeiro aloenxerto de rim de cadáver e os painéis de anticorpos linfocitotóxicos foram sempre inferiores a 10%. Os dadores e os receptores foram tipados por testes de microlinfotoxicidade, recorrendo a aloantisoros convenientemente estandardizados.

A imunossupressão foi feita desde o início com terapêutica tripla. Quer SIM™, quer Neoral™ foram iniciados na dose 10mg/Kg de peso, p.o., dividida em duas tomas, com ajustamentos ditados pelos níveis de ciclosporinemia no sangue total, medidos por método TDx™ da Abbott. Azatioprina foi administrada na dose de 1.5mg/Kg de peso, p.o., desde o 2º dia pós-cirurgia, depois de dose peroperatória de 5mg/Kg i.v.. As dosagens de azatioprina sofreram ajustamentos de acordo com o leucograma. Prednisolona foi administrada em duas doses de 500mg i.v., antes e imediatamente depois da operação e seguidamente ministrada a 1mg/Kg de peso, p.o., com diminuição progressiva, de modo que no fim do primeiro mês pós-transplantação, os doentes recebiam 20mg p.o..

Métodos

Os linfócitos infiltrantes no aloenxerto foram obtidos por biópsia aspirativa com agulha fina, de acordo com os métodos descritos previamente por P. Hayry (Hayry, 1989). As punções foram feitas entre os 90 e os 150 minutos, após a dose matinal de imunossupressão, aos 7 e 30 dias pós-cirurgia. As amostras de sangue periférico correspondentes foram obtidas duas horas mais cedo que as punções aspirativas, imediatamente antes da primeira dose diária de imunossupressores. Um mililitro da punção foi analisada por citometria de fluxo.

O nosso interesse centrou-se no subtipo de linfócitos T, mencionados antes. Para caracterizarmos estas células T, foram usados anticorpos que reconhecem

antigéneos de diferenciação, CD3, (molécula associada a receptor de linfócito T), CD4, próprio de subtipo de T indutor, CD57, presente em certos subtipos de T e nos linfócitos “natural killer”, marcador precoce de activação (CD25, cadeia α do receptor de interleucina-2) e marcador tardio de activação (DR, antigéneo da classe II de HLA). Também estudámos os subtipos de CD4 que exprimem CD45RA (“virgem” ou indutor de supressão) e CD29 (integrina β -cadeia β da molécula de adesão VLA-4, T “memória” ou indutor de indutor). As amostras permaneceram à temperatura ambiente até à sua preparação, feita dentro de duas horas após a sua obtenção.

Em resumo, 100 μ l da suspensão celular foi incubada à temperatura ambiente, durante 10 minutos, com 10 μ l dos seguintes anticorpos monoclonais Becton Dickinson (BD) e Coulter (C): produto standardizado da linha Leucogate Simulset™ (BD-S), controlos isotípicos FITC/PE/PERCP (BD) e FITC/PE (C), CD4-FITC/CD29E (C-CS), CD3-FITC/CD8-PE (C-CS) mais HLADR-PERCP (BD), CD57-FITC/CD8-PE e CD3-FITC/CD25-PE (BD), todos directamente conjugados e utilizados de forma standardizada para citometria de fluxo. Os eritrócitos foram sujeitos a lise e as células foram preservadas no reagente Coulter Q-Prep™, numa estação de trabalho Coulter Multi-Q-Prep®. As amostras foram refrigeradas a 5° graus C até aquisição num FACScan Becton Dickinson, recorrendo a software Lysys II™, com análise em BD PcLysys™, versão 1.1. Todas as amostras foram lavadas duas vezes com PBS, imediatamente antes da aquisição. Os mesmos métodos foram repetidos com as amostras de sangue periférico.

A análise foi feita num FACScan da Becton Dickinson e os seguintes subtipos de linfócitos T foram estudados: DR, CD3, CD3CD8, CD8, CD8CD57, CD57, CD3DR, CD3CD25, CD25, CD4, CD4CD45RA, CD45RA, CD4CD29 e CD29.

Análise de dados

A análise estatística foi feita por teste t de Student (níveis de CsA) e teste U Mann-Whitney (subtipos de T), com correcção para múltiplas comparações pela fórmula de Edward: $P_c = 1 - (1 - P_o)^n$, onde P_c designa P corrigido e P_o equivale a P observado e n designa o número de comparações. As correlações lineares entre os vários subtipos de T e as ciclosporinemias foram estudadas, assim como entre os diferentes fenótipos de T.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina do Porto e foi obtido, para cada caso, consentimento dos doentes.

Resultados

Os níveis de CsA no sangue total, nos receptores tratados com SIM™, aos 7 e 30 dias, foram respectivamente, 207 ± 81 e 221 ± 94.6 ng/ml (mediana/desvio padrão). Nos doentes tratados com Neoral™, os níveis observados foram 225 ± 81 e 242 ± 84.9 ng/ml, respectivamente. Não havia diferença significativa ao comparar dia 7 com dia 30, quer analisando os doentes tratados com SIM™ ou Neoral™, $P=0.68$ e $P=0.89$, respectivamente. Ao compararmos os níveis de ciclosporinemia no dia 7 entre SIM™ e Neoral™, não registámos diferença significativa, $P=0.72$. O mesmo ocorreu, ao analisarmos os resultados ao dia 30 pós-cirurgia, $P=0.76$.

As incompatibilidades HLA-BDR foram 2 ± 0.6 nos receptores tratados com SIM e 2 ± 0.75 , nos tratados com Neoral™, $P=0.46$. Também não observámos diferenças significativas para as creatinemias ao compararmos os resultados ao dia 7 entre os dois grupos de doentes e o mesmo foi notado aos 30 dias.

As taxas de sucesso das biópsias aspirativas no grupo tratado com SIM™ e com Neoral™ foram 94% e 90%, respectivamente, de acordo com os critérios definidos por P. Hayry (Hayry, 1989).

Duas punções aspirativas de cada grupo de transplantados foram excluídas, com base em contaminação com sangue, de forma significativa. Nenhuma complicação foi registada, na consequência das punções-biópsia e quase metade das amostras foram obtidas em doentes em regime ambulatorio.

O número de linfócitos T, obtidos por biópsia aspirativa sujeitos a análise, variaram entre 203 e 1880, média 580 células.

O estudo citofluorométrico mostrou que em cada grupo, não havia diferenças significativas entre as amostras dos dias 7 e 30, quer nas do sangue periférico, quer nas da biópsia aspirativa, pelo que os resultados foram misturados. Deste modo, 76 amostras, obtidas por biópsia aspirativa com o sangue periférico correspondente, foram estudadas nos doentes tratados com SIM™ e 27 pares de biópsia aspirativa/sangue periférico, nos transplantados que receberam Neoral™.

Nas amostras do sangue periférico, não observámos diferenças significativas ao compararmos SIM™ com Neoral™, para os seguintes fenótipos de T: CD3, DR, CD3CD8, CD8, CD8DR, CD4 e CD4CD45RA (fig. 1).

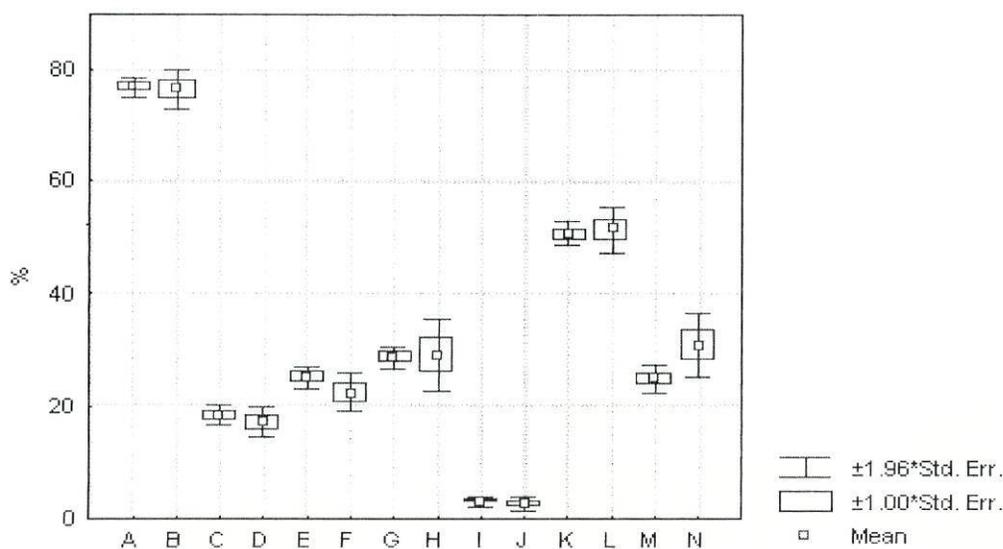


Fig. 1: fenótipos de T no sangue periférico; A,C,E,G,I,K,M: SIM™; B,D,F,H,J,L,N: Neoral™ . A-B: CD3; C-D: DR; E-F: CD3CD8; G-H: CD8; I-J: CD8DR; K-L: CD4; M-N: CD4CD45RA.

Também não observámos diferença significativa ao compararmos CD8CD57 e CD57.

Nos linfócitos infiltrantes nos aloenxertos, não observámos diferenças significativas, ao compararmos os transplantados tratados com SIM™, com aqueles tratados com Neoral™ para os seguintes fenótipos de T: CD3, DR, CD3CD8, CD8, CD4, CD4CD29 e CD29 (fig.2).

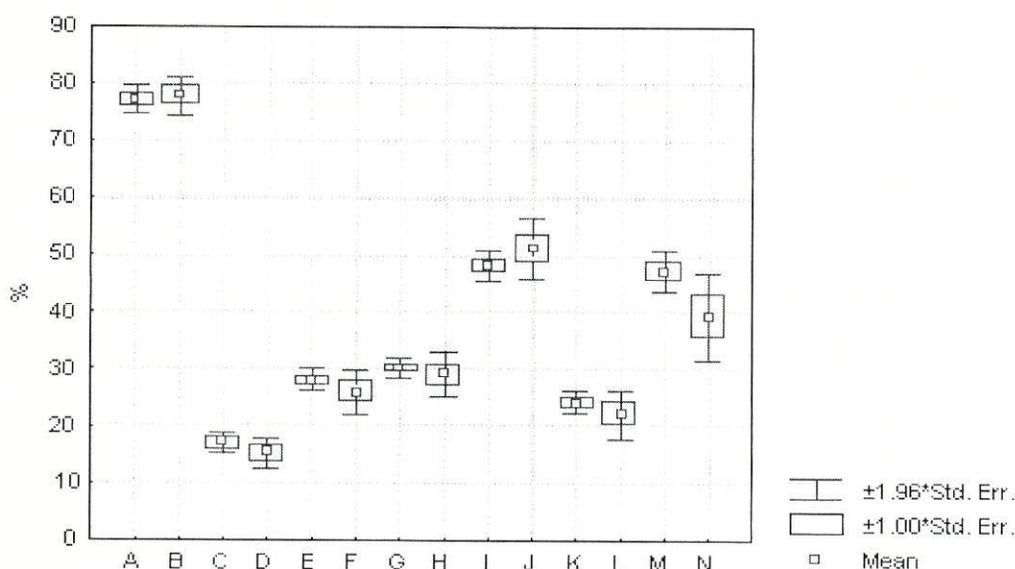


Fig. 2: fenótipos de T infiltrantes nos aloenxertos; A,C,E,G,I,K,M: SIM™; B,D,F,H,J,L,N: Neoral™. A-B: CD3; C-D: DR; E-F: CD3CD8; G-H: CD8; I-J: CD4; K-L: CD4CD29; M-N: CD29.

Também não observámos diferença significativa na comparação entre os dois grupos para CD8CD57 e CD57.

CD25 quase atingiu a significância, com expressão menor nos transplantados que receberam Neoral™, $P=0.068$.

Nas tabelas 1 e 2 apresentamos as medianas e os desvios padrões dos fenótipos que mostraram diferenças significativas, ao compararmos os grupos tratados com SIM™ versus Neoral™, analisados por teste U Mann-Whitney, com correcção para múltiplas comparações.

Sangue periférico	SIM, mediana/DP	Neoral, medi./DP	Mann-Whitney
CD3CD25	16.5/6.9	6.3/8.5	<0.001
CD25	23/8.8	13/7.9	<0.001
CD3DR	5.5/6.5	2.2/5.6	0.006
CD45RA	63/11.9	71/11.1	0.026
CD29	60.5/13.5	47/15.2	0.05
4.45/4.29 (a)	0.73/0.41	1.18/1.07	0.012

Tabela 1: fenótipos de T no sangue periférico, expressos em %, observados em 40 doentes (76 amostras) tratados com SIM versus 17 doentes tratados com Neoral (27 amostras), durante o primeiro mês pós-transplantação; análise por teste U Mann-Whitney, com correcção para múltiplas comparações. (a): quociente CD4CD45RA / CD4CD29 no sangue periférico.

Aspirado	SIM, mediana/DP	Neoral, medi./DP	Mann-Whitney
CD8DR	2/3.3	1/3.2	0.026
CD4CD45RA	16/9.6	26/13.2	0.01
CD3CD25	9.5/7.8	4.5/6	0.013
CD3DR	6/7.2	2/4.1	<0.001
CD45RA	51/13.5	69/13	0.002
4.45/4.29 (a)	0.7/0.66	1.28/2.5	0.05

Tabela 2: fenótipos de T nas biópsias aspirativas, expressos em %, observados in 40 doentes (76 amostras) tratados com SIM versus 17 doentes tratados com Neoral (27 amostras), durante o primeiro mês pós-transplantação; análise por teste U Mann-Whitney, com correcção para múltiplas compações. (a): quociente CD4CD45RA / CD4CD29.

O quociente de CD3CD25, presente na biópsia aspirativa sobre o observado no sangue periférico, não foi significativamente diferente, tendo subido de 0.7 ± 0.54 , nos transplantados tratados com SIM™ até 0.8 ± 0.65 , nos que receberam Neoral™, $P=0.36$.

As correlações entre as ciclosporinemias e os fenótipos de T foram determinadas nos dois grupos de doentes. Apenas CD3CD25 mostrou uma correlação negativa com CsA, nos tratados com Neoral™, $r=-0.44$, $P=0.023$. Várias correlações significativas foram observadas entre alguns fenótipos de T, mas não houve mudanças significativas entre os doentes tratados com as duas formulações de CsA (dados não apresentados).

Num estudo prévio, tínhamos documentado uma diferença significativa entre os doentes com rejeição aguda e os doentes estáveis, para a soma dos subtipos de T, expressos nas punções aspirativas, DR, CD8, CD8DR, CD3DR, CD8CD57, assim como para os quocientes aspirado sobre o sangue periférico de CD3CD25 e CD3DR, multiplicados por coeficientes, achados empiricamente e subtraída pela expressão de CD45RA na biópsia aspirativa, também multiplicado por coeficiente empírico. (Todos os subtipos aumentam a sua expressão nos aspirados de rejeição aguda, com a exceção de CD4CD45RA, que diminui significativamente, durante a rejeição aguda). Repetimos estes cálculos para os doentes tratados com SIM™ e obtivemos o total de 418 ± 219 pontos (de 89 a 1675 pontos). Para o grupo que recebeu Neoral™, o total desceu para 324 ± 150 pontos (de 96 a 694).

Estes dois totais são significativamente diferentes, $P=0.016$.

Discussão

Neoral™ trouxe uma menor variabilidade da farmacocinética interpaciente, uma maior relação área debaixo da curva/dose, acompanhada de pico mais elevado no sangue, apesar dos níveis de ciclosporinemia pré-dose serem similares aos obtidos com SIM™ (Barone e col., 1996).

Os primeiros dados sobre esta nova formulação de CsA apontam para um potencial nefrotóxico equivalente ao conhecido com a prévia apresentação de CsA (Barone e col., 1996).

O nosso estudo documenta, pela primeira vez, que Neoral™, comparado com SIM™, provoca várias alterações nos fenótipos de linfócitos T, quer os que estão em circulação, quer aqueles que infiltram os aloenxertos renais, pelo menos, durante o primeiro mês pós-transplante em doentes estáveis. CD3DR e CD3CD25 estavam significativamente menos expressos no sangue periférico e nos aspirados e CD8DR, nos aspirados. Esta observação pode ter importância relevante já que estes subtipos de T têm sido implicados no processo de rejeição aguda (Reed e col., 1989; Reinke e col., 1994; Totterman e col., 1989) e, de acordo com a nossa experiência, CD3DR e CD8DR, presentes nas amostras obtidas por biópsia aspirativa, constituem os marcadores mais fiáveis de rejeição aguda (Oliveira e col., 1995). Embora o quociente biópsia aspirativa sobre sangue periférico para CD3CD25 tenha subido, nos receptores tratados com Neoral™, nós supomos que este achado deverá ser explicado pela maior descida deste subtipo de T à periferia, porque CD3CD25, presente nos aspirados, também diminuiu nos doentes medicados com Neoral™, de 9.5 ± 6.0 para 4.5 ± 6.0 , respectivamente.

Provavelmente isto poderá reflectir a conhecida capacidade de CsA, sob ambas as formulações, acumular no tecido renal, onde pode atingir uma concentração $\cong 4$ vezes a concentração sanguínea (Batiuk e col., 1996), atenuando deste modo a melhor biodisponibilidade própria de Neoral™. Realmente, com Neoral™ (assim como com SIM™), a expressão de CD3CD25 era inferior nos aspirados do que no sangue periférico, $4.5 \pm 6.65\%$ versus $6.25 \pm 8.5\%$. De qualquer modo, a diminuição da expressão de CD3CD25 deverá constituir a contrapartida à menor exposição de linfócitos T a interleucina-2. Recentemente, o grupo de Batiuk (Batiuk e col., 1996) demonstrou no rato uma relação significativa inversa entre a ciclosporinemia e a actividade da calcineurina e, por outro lado, uma correlação significativa positiva, in vivo, entre a actividade da calcineurina e a indução de interferão- γ . A interleucina-2 também depende de activação da via cálcio-calcineurina.

Também foi observado por estes autores uma correlação positiva significativa entre a ciclosporinemia e a inibição da expressão dos antigénios classe I e II do sistema major de histocompatibilidade (Batiuk e col., 1996). Dado que com os níveis de CsA no sangue, habitualmente atingidos na clínica do pós-transplante, apenas se

consegue uma inibição parcial da actividade da calcineurina, nós especulamos que da maior exposição a CsA conseguida com Neoral™, deverá resultar uma maior inibição da calcineurina, que presumivelmente se reflecte nos nossos resultados do estudo citofluorométrico.

Também observámos uma maior expressão, de forma significativa, de CD4CD45RA, conjuntamente com uma significativa elevação do quociente CD4CD45RA sobre CD4CD29, quer no sangue periférico, quer nos aspirados, acompanhado por uma significativa diminuição da expressão de CD29 no sangue periférico, que poderá ser mais um indicador dum maior efeito imunossupressor de Neoral™.

Realmente, as células T “memória”, podem ser activadas por um leque mais alargado de células apresentadoras de antigéneo, têm menor necessidade de factores de co-estimulação que as células T “virgens”, ao mesmo tempo que exprimem, na sua membrana, maior quantidade e diversidade de moléculas acessórias e de adesão (Croft e col., 1994). Em regra, quer T “virgens”, quer T “memória” são eficientemente estimuladas por células dendríticas e linfócitos B, no seu papel de células apresentadoras de antigéneo; ao contrário de T “virgens”, T “memória” podem responder a linfócitos B em repouso e a macrófagos que não tenham sido previamente estimulados e mesmo a estimulação isolada do receptor de T (Croft e col., 1994).

Estas propriedades de T “memória” poderão ser muito importantes em situações de apresentação directa de antigéneo, que deverão ocorrer particularmente na fase mais precoce pós transplantação (van Twuyver e col., 1996), intervalo de tempo que interessou o nosso estudo.

Pensamos que a significativa diminuição do total da expressão dos fenótipos de T, supostos serem mais influentes nos processos de rejeição aguda, nos doentes tratados com Neoral™, comparado com o encontrado nos pacientes medicados com SIM™, reflecte um estado global de activação linfocitária menor com Neoral™ do que com SIM™, que nós especulamos poderá ter uma contrapartida numa menor incidência de rejeição aguda.

Em ambos os grupos de pacientes tratados com as duas formulações de CsA, não encontramos correlações significativas entre os níveis pré-dose de CsA e os diferentes subtipos de T estudados, com a importante excepção de CD3CD25, que

apresentou uma pequena, mas significativa, correlação inversa com a ciclosporinemia, nos transplantados que receberam Neoral™. Interessantemente, este dado não foi reproduzido nos pacientes que foram tratados com SIM™.

Nós especulamos que se tivéssemos medido as áreas debaixo da curva para CsA, algumas correlações significativas poderiam ter sido encontradas. Embora não tivéssemos realizado estudos farmacocinéticos, sugerimos que os nossos resultados poderão ser explicados por maior efeito sobre a modulação dos subtipos de linfócitos T pela área debaixo da curva ou ainda pela concentração máxima de CsA, já que os níveis de CsA pré-dose não foram alterados com a introdução de Neoral™.

Outras características que potencialmente poderiam ter influenciado os resultados do nosso estudo, tal como a idade, sexo, primeiro/segundo transplante, painel de anticorpos linfocitotóxicos, incompatibilidades HLA-B,DR e episódios infecciosos, não foram diferentes ao compararmos os pacientes nos dois grupos. Até ao momento presente, ainda não temos um número considerado suficiente para comparar, de forma estatisticamente significativa, as taxas de rejeição aguda nos dois grupos, especialmente porque a incidência de rejeição aguda já era baixa com SIM™, (cerca de 20%), de modo que um grande número de receptores seria necessário para revelar uma diferença significativa.

Contudo, esperamos que as alterações nos fenótipos de T, documentadas no nosso estudo, quer na periferia, quer especialmente nas populações de T infiltrantes nos aloenxertos renais, mostrando um menor grau de expressão dos marcadores de activação linfocitária, deverão ser seguidos por uma maior eficácia clínica, com menor incidência de rejeição aguda e, eventualmente, por uma menor gravidade dos episódios de rejeição, nos pacientes medicados com Neoral™, com os efeitos benéficos esperados na sobrevida dos aloenxertos renais.

V - A análise de citocinas presentes nos sobrenadantes de culturas de biópsias aspirativas permite a previsão e o diagnóstico de rejeição aguda no transplante renal.

Introdução

Os linfócitos T CD4⁺ desempenham um papel fundamental no desencadear de crise de rejeição aguda na transplantação (Nickerson e col., 1994). Estas células têm sido subclassificadas de acordo com o padrão de produção de citocinas: Th0, que sintetizam IL-2, IL-4, IFN- γ e linfotóxina, Th1, que produzem IL-2, IFN- γ e linfotóxina e Th2 que, por sua vez, produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10.

Th0 constitui o precursor comum para Th1 e Th2 (Kamogawa e col., 1993; Fitch e col., 1993). O ambiente de citocinas na altura da estimulação antigénica desempenha função primordial no desenvolvimento dos subtipos Th1 e Th2, já que aparentemente não existe uma predestinação para qualquer subtipo (Fitch e col., 1993). Assim, para o desenvolvimento de Th1, IL-12 e IFN- γ são necessários enquanto que a maturação para Th2 requer a presença de IL-4 (Hsieh e col., 1993).

Vários grupos têm apresentado resultados que estabelecem uma ligação entre o subtipo Th1 e o desenvolvimento de crise de rejeição aguda, enquanto que o subtipo Th2 parece estar associado com a tolerância do aloenxerto (O'Connell e col., 1993; Takeuchi e col., 1992; Dallman e col., 1991; Sayegh e col., 1995; Hancock e col., 1993; Burgeon e col., 1992; Binder e col., 1995; Kusaka e col., 1995).

Contudo, estes conceitos não reúnem unanimidade, já que outros grupos de investigação não têm reproduzido aqueles resultados (Vossen e col., 1995; Fanges e col., 1995; Lee e col., 1994), levantando a hipótese que o paradigma Th1/Th2 não consegue explicar plenamente os mecanismos subjacentes aos fenómenos de tolerância (ainda que com imunossupressão adjuvante) e de rejeição aguda na transplantação.

A avaliação das citocinas nos transplantados renais, quer no sangue periférico, quer na urina, tem produzido resultados variáveis, não consistentes. Alguns autores sugerem o seu interesse no diagnóstico da rejeição aguda (Kumano e col., 1996; Simpson e col., 1989), enquanto que outros autores apresentam resultados menos

encorajadores (Kita e col., 1996; Johnson e col., 1990), apesar da continuada melhoria da qualidade dos meios disponíveis para a quantificação destes factores de crescimento.

A biópsia aspirativa com agulha fina (BAAF) é um meio de diagnóstico seguro e fiável na monitorização imunológica dos transplantados renais (Hayry, 1989; Bogman, 1995; Helderman e col., 1988).

Previamente demonstrámos que culturas de biópsias aspirativas exibem diferentes capacidades de proliferação celular consoante fossem obtidas em doentes com função renal estável ou em doentes em curso de rejeição aguda do aloenxerto. Pusemos como hipótese de trabalho que a estas respostas proliferativas diferentes deveriam corresponder padrões distintos de síntese de citocinas, que, eventualmente, poderiam contribuir positivamente para o diagnóstico das diferentes situações patológicas no pós-transplante e identificar a evolução para a tolerância ao aloenxerto.

Doentes e métodos

Doentes

Cinquenta e seis receptores de transplantes de rim de cadáver, trinta e cinco, do sexo masculino e vinte e um, do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 16-52 anos, foram admitidos a este estudo. Todos receberam tratamento substitutivo renal antes da transplantação: 53, em hemodiálise regular e 3, em diálise peritoneal contínua ambulatoria.

As doenças renais originais estavam distribuídas conforme exposto na tabela 1.

glomerulonefrite	19
crónica/desconhecida	
nefrite hereditária/tubulointersticial	17
nefropatia IgA	5
doença renal poliquística do adulto	5
nefropatia diabética	5
glo. rapidamente progressiva	2
lupus eritematoso sistémico	1
glo. mesangiocapilar	1
púrpura de Henoch-Schonlein	1

tabela 1

Todos eram receptores de primeiro transplante renal, com excepção de três casos de segundo aloenxerto. Os dadores e os receptores foram tipados por testes de microlinfotoxicidade, com recurso a aloantisoros convenientemente estandardizados.

Imunossupressão: 53 receptores foram tratados com terapêutica tripla, desde o início, constituída por ciclosporina A, azatioprina e prednisolona. Os três receptores de segundo transplante receberam terapêutica quádrupla, que incluiu além dos três fármacos referidos acima, soro anti-timocítico de coelho ou de cavalo durante a primeira semana pós-cirurgia. A dose de CsA, p.o., foi dividida em duas tomas com ajustamentos ditados por níveis no sangue total, medidos pré-dose por método TDx™ da Abbott. As crises de rejeição aguda foram tratadas com 3-4 pulsos i.v. de 500mg de metilprednisolona e por soro anti-timocítico ou anticorpo monoclonal anti-CD3 (OKT3™), nos casos de resistência a metilprednisolona ou, ainda, quando as biópsias clássicas foram classificadas com grau IIb ou maior, segundo os critérios histológicos de Banff.

Os doentes transplantados foram subdivididos em quatro subgrupos:

grupo A, 21 doentes sem crises de rejeição aguda durante o primeiro ano

grupo B, 22 doentes com crises de rejeição aguda

grupo C, 10 doentes com rejeição crónica

grupo D, 3 doentes com infecção por citomegalovírus

Os episódios de rejeição aguda foram confirmados por biópsia renal clássica em todos os casos, excepto num, em que o diagnóstico foi feito apenas com o concurso da biópsia aspirativa. Além disso, os diagnósticos de rejeição foram ainda infirmados por uma resposta positiva ao tratamento anti-rejeição instituído, com a ressalva de seis doentes, que acabaram por perder o aloenxerto na sequência de crises irreversíveis de rejeição aguda.

Por sua vez, os diagnósticos de rejeição crónica foram feitos em transplantados com deterioração consistente e progressiva da função dos enxertos renais, após exclusão de outras causas que explicassem a diminuição da função renal e confirmados pelos achados na biópsia clássica, realizada em 6 dos doentes.

O diagnóstico de infecção por citomegalovírus foi feito quando os sintomas e sinais clássicos de viremia se acompanhavam por teste positivo para antigéneo do vírus, detectado em leucócitos, por técnica de imunofluorescência.

Métodos

As BAAF foram feitas de acordo com os métodos descritos por P. Hayry (Hayry, 1989) aos 7 e 30 dias pós-transplantação, nos receptores estáveis e sempre que havia suspeita de crise imunológica aguda, durante períodos de estabilidade do processo de rejeição crónica e no primeiro dia do internamento hospitalar por infecção de CMV. As BAAF foram realizadas duas horas decorridas sobre a toma matinal das drogas imunossupressoras. As amostras aspiradas foram imediatamente introduzidas em seis ml de meio de cultura RPMI com heparina lítio a 125Un/ml. Feita a lise dos eritrócitos, as suspensões celulares foram ajustadas na sua concentração para 5×10^4 células/200 μ l. As culturas foram feitas em meio RPMI, com antibióticos (penicilina e gentamicina), l-glutamina e 10U/ml de IL-2 recombinante. O meio macromolecular consistiu em soro autólogo a 10%, derivado de sangue obtido imediatamente antes da dose matinal dos imunossupressores. A cultura foi feita durante 48 horas a 37°C, em atmosfera humidificada com 5% de CO₂. No fim da incubação, os sobrenadantes foram recolhidos e guardados a -70°C.

Os sobrenadantes foram avaliados para IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ , por métodos ELISA, com kits comercializados por Endogen™, Cambridge, Massachusetts, EUA, de acordo com as instruções fornecidas pelo laboratório produtor.

Análise de dados

Os resultados foram analisados por teste t de Student não emparelhado (creatinemias e ciclosporinemias), Friedman ANOVA para amostras emparelhadas e Kruskal-Wallis ANOVA para amostras independentes, usando o programa Statistica™ da Statsoft.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina e consentimento informado foi obtido de cada doente.

Resultados

Primeiro, avaliámos a produção de IL-2 em 21 culturas de BAAF obtidas ao dia 7 pós-transplante e em 18 culturas de BAAF, feitas aos 30 dias, no grupo A. As médias e desvios padrões respectivos foram 15 ± 175 pg/ml e 13.5 ± 176 pg/ml.

Os desvios padrões elevados são explicados por três receptores no dia 7 e por dois, no dia 30 (um receptor do dia 7), pós-transplantação; os valores de IL-2 medidos foram, respectivamente, 252, 322, 1600 e 330, 1455 pg/ml. Estes quatro receptores gozavam de boa função dos aloenxertos, nos dois períodos em que as amostras foram obtidas, e as ciclosporinemias estavam dentro da janela terapêutica empregue na unidade de transplantação (creatininas/CsA: 1.0/250, 3.1/206, 2.0/106, 1.7/220, 1.8/261, mg/dl/ η g/ml, respectivamente). Estes receptores têm permanecido livres de qualquer episódio de rejeição aguda, durante pelo menos um ano pós-transplantação, embora um deles tenha sofrido alguns episódios de deterioração de função do aloenxerto, reversíveis de forma espontânea, assim como várias infecções urinárias.

No grupo B fizemos 16 culturas de BAAF no dia 7 e 22, no início das crises imunológicas agudas. Estes episódios ocorreram dentro dos primeiros 60 dias pós-transplantação com exceção de um caso: um transplantado, com diabetes mellitus, que sofreu a primeira e única rejeição aguda, 510 dias pós-transplante, cerca de 90 dias após a interrupção de corticoterapia. As BAAF do dia 7, neste grupo B, foram realizadas 10 ± 9 dias antes do início da rejeição aguda. O valor de IL-2 medido nos sobrenadantes das culturas de BAAF do dia 7, foi 438 ± 387 pg/ml; o valor observado nas culturas de BAAF, no início da rejeição aguda, foi 871 ± 387 pg/ml. Seis, dos 22 receptores sofreram crises irreversíveis de rejeição aguda e a IL-2 medida foi 1140 ± 318 pg/ml; nos sobrenadantes dos restantes dezasseis, com crises reversíveis, medimos 441 ± 214 pg/ml de IL-2.

Dez testes foram realizados nos doentes do grupo C, um por cada receptor. As BAAF foram feitas 615 ± 185 dias pós-transplantação. Oito receptores acabaram por perder o aloenxerto durante os doze meses seguintes à BAAF. A IL-2 medida foi 2.5 ± 92 pg/ml. Dois, produziram quantidades maiores de IL-2, 370 e 215 pg/ml e, muito interessante, ambos retiveram os seus aloenxertos com creatinemias oscilando à volta de 3.0 mg/dl. Infelizmente, não tínhamos feito BAAF aos 7 dias, nestes dois casos.

Os três receptores do grupo D sofreram infecção por citomegalovírus, durante os primeiros dois meses pós-transplantação. IL-2 medida foi 844, 485 e 1446 pg/ml; os três recuperaram completamente após tratamento com ganciclovir™, sem outras complicações.

Os quatro grupos foram estudados para a produção de IL-10.

No grupo A, sobrenadantes de culturas de BAAF do dia 7, IL-10 observada foi 22 ± 32 pg/ml e nos sobrenadantes das culturas de BAAF do dia 30, medimos 5 ± 29 pg/ml. No grupo B, os sobrenadantes do dia 7, continham 2 ± 10 pg/ml, enquanto que culturas de BAAF do início da rejeição aguda, produziram 2 ± 12 pg/ml. Nos seis casos de rejeição aguda irreversível, a IL-10 medida foi 1 ± 10.9 pg/ml. No grupo C, a produção de IL-10 foi 32 ± 37 pg/ml. Nos três doentes com infecção por citomegalovírus, a síntese de IL-10 foi 112, 115 e 160 pg/ml.

Seguidamente analisámos os resultados observados nos grupos A e B e excluímos os grupos C e D.

O valor de IL-2 ≥ 250 pg/ml foi escolhido empiricamente, como discriminante para rejeição aguda. A sensibilidade foi 22/22, 100%, a especificidade 34/34+5, 87.2%. O valor preditor positivo foi 22/22+5, 81.5% e o valor preditor negativo 34/34, 100%. Tendo em consideração as amostras do dia 7 pós-transplantação dos grupos A e B e aplicando o mesmo valor discriminatório de IL-2, o valor preditor positivo para rejeição subsequente foi 15/15+3, 83.3% e o valor preditor negativo 18/18+1, 94.7%.

Também testámos as correlações existentes entre IL-2 e as ciclosporinemias correspondentes. No grupo A, as correlações nos dias 7 e 30 pós-transplantação foram -0.06 e 0.37, respectivamente. No grupo B, as correlações encontradas para os dias 7 e 30 foram respectivamente 0.42, $p=0.028$ (fig. 1) e 0.19.

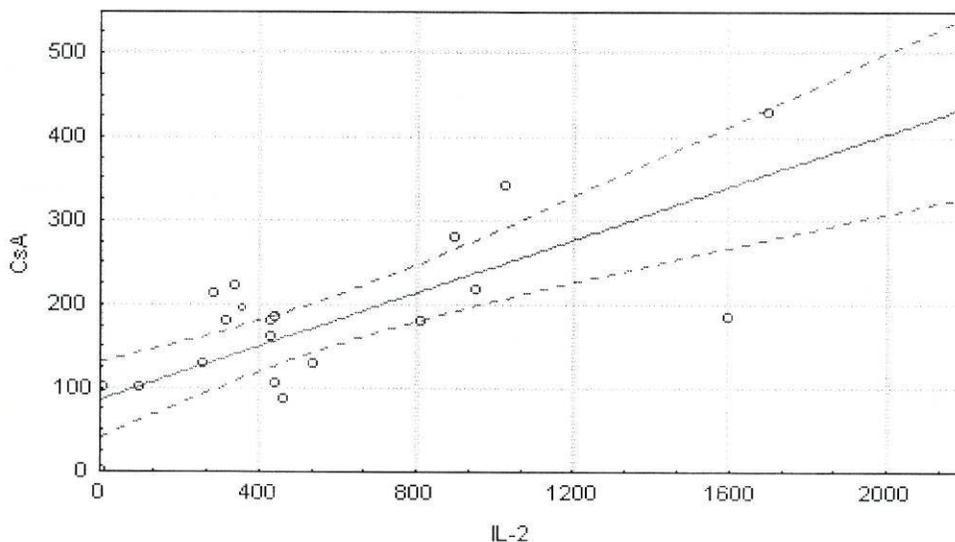


fig. 1

As correlações entre as ciclosporinemias e IL-10, no grupo A e B, foram 0.04, -0.31, 0.10 e -0.04, na mesma ordem seguida para IL-2. No grupo C, as correlações entre IL-2, IL-10 versus CsA foram -0.1 e -0.22. Também as correlações entre as creatinemias versus IL-2, IL-10, nos grupos A, B, e C, não foram estatisticamente significativas. No grupo B, encontramos uma correlação positiva significativa entre IL-2 observada no dia 7 e no início da crise de rejeição aguda, 0.53, $p=0.031$ (fig. 2).

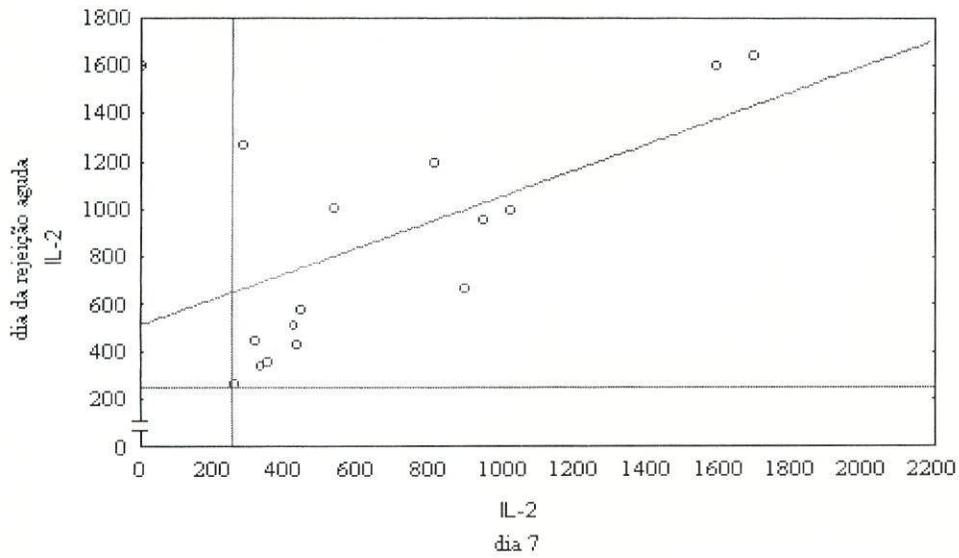


fig. 2

Na tabela 1 apresentámos as creatinemias e as ciclosporinemias, na tabela 2 os resultados da análise estatística por ANOVA.

	creatinina, mg/dl	CsA, ηg/ml
7d, grupo A	2.9 ± 3.3	210 ± 220
30 d, grupo A	1.7 ± 3.2	220 ± 56
7d, grupo B	4.2 ± 3.1	182 ± 85
grupo B	4.3 ± 2.5	169 ± 49
grupo C	4.2 ± 1.2	180 ± 99
grupo D	1.7; 1.8; 3.2	255; 279; 215

tabela 1

	dia 7 A vs dia 7 B	dia 30 A vs dia 30 B	B ₁ vs B ₂	B vs C	dia 7 A vs dia 30 A
IL-2	<0.0001	0.0016	0.032	0.0001	0.31
IL-10	0.012	0.37	0.73	0.005	0.034
CsA	0.53	0.16	0.065	0.26	0.49

tabela 2 : teste t de Student na análise de CsA, Friedman ANOVA para comparação de dia 7 versus dia 30 no grupo A e Kruskal-Wallis para as restantes análises. A: sem rejeição; B₁: rejeição aguda reversível; B₂: rejeição irreversível; C: rejeição crónica.

IL-4 estava ausente de todos os sobrenadantes dos grupos A e B. Deste modo, optámos por não tentar medir esta citocina nos grupos C e D.

Um número muito reduzido de amostras continha IFN- γ : dois receptores no grupo A, sendo que um deles apresentou IFN- γ nos dois períodos pós-transplantação; cinco sobrenadantes de culturas de BAAF, do grupo B, continham pequenas quantidades de IFN- γ (3, 13, 22, 45, 55 pg/ml).

Este pequeno número de amostras positivas para IFN- γ impediu qualquer tratamento estatístico válido.

Discussão

Várias conclusões podem ser inferidas dos nossos resultados. Primeiro, as culturas de BAAF têm a capacidade de sintetizar citocinas, contrariamente aos achados de Yard (Yard e col., 1994), que mostraram que culturas de células infiltrantes nos aloenxertos eram incapazes de produzir qualquer citocina.

As culturas, por nós realizadas, foram suplementadas apenas com 10U/ml de IL-2 recombinante e esta quantidade é inferior à metade da dose habitualmente empregue na propagação de linfócitos T activados, das biópsias de transplantes

(Duquesnoy e col., 1991). Não podemos ter a certeza sobre as influências eventuais carreadas pelo uso de soro autólogo como meio macromolecular das culturas, dado que não quantificámos qualquer citocina no soro, exceptuando um caso, com rejeição aguda, onde não havia IL-2 em quantidade detectável.

A nossa decisão de recorrer a soro autólogo foi baseada numa observação feita num receptor com rejeição aguda, em que a proliferação celular da cultura da BAAF correspondente foi significativamente superior com meio autólogo do que com soro AB (4800 contagens por minuto versus 2400 cpm). Além disso, ao usarmos soro autólogo estaríamos a aproximarmo-nos das condições *in vivo*, ao mesmo tempo que não eliminávamos as consequências da presença de CsA. Contudo, como pode ser visto com a análise das correlações entre IL-2 e ciclosporinemia, os valores de CsA no sangue total não produziram influência significativa sobre a síntese de IL-2 nos doentes estáveis e, de forma inesperada, encontramos uma correlação positiva no grupo com rejeição aguda. Diferentemente das condições de trabalho de Yard e col., o nosso sistema é uma cocultura, sendo as células parenquimatosas renais em conjunto com mononucleares do receptor, as principais células envolvidas; especulamos que esta dissemelhança poderá explicar plenamente os nossos resultados.

Realmente poderíamos considerar que o nosso estudo constitui uma variante das reacções mistas leucocitárias, mas nas culturas de BAAF o aloantigénio do dador é constituído por células renais ou, mais provavelmente, por células apresentadoras de antígeno, quer do dador, quer do receptor, nas suas funções de apresentação directa e indirecta de aloantigénio, respectivamente. Cremos ser razoável pensar que monócitos-macrófagos activados, presentes em grande número nas amostras obtidas em transplantados com rejeição aguda, desempenham esse papel. Em alternativa, os procedimentos para o isolamento de linfócitos infiltrantes nos aloenxertos, obtidos por biópsia clássica, talvez interfiram com a capacidade celular de sintetizar citocinas.

Na verdade, o nosso método de cultura é muito simples, dado que o pequeno número de células presentes nas amostras das punções biópsias desencoraja outros procedimentos que, fatalmente, iriam reduzir ainda mais o seu número.

Algumas dúvidas poderiam ser levantadas pela eventual contaminação das amostras com sangue periférico. Contudo, tivemos sempre o cuidado de observar na microscopia de luz as amostras, depois de uma coloração por um método

Romanowski modificado e apenas as amostras que não exibiram contaminação por sangue de forma significativa, de acordo com a classificação proposta por P. Hayry (Hayry, 1989), foram submetidas a cultura. Além disso, o estudo paralelo por citometria de fluxo das punções aspirativas e dos sangues periféricos correspondentes (cap. IV), assegura-nos sobre a ausência de contaminação significativa por sangue periférico, dado que os fenótipos de linfócitos T estudados exibem várias diferenças significativas ao compararmos as células T, presentes nas duas amostras.

A análise de IL-2 e IL-10 mostrou um padrão distinto entre os receptores estáveis e aqueles com rejeição aguda. O grupo A (sem rejeição) mostrou um padrão Th0/Th2, com poucas exceções (3/21), observadas ao dia 7 e menos ainda ao dia 30 pós-transplantação. Este grupo, pelo menos um ano decorrido sobre a cirurgia, tem permanecido livre de crise imunológicas, incluindo os três grandes produtores de IL-2. Suspeitamos que estes três receptores são o exemplo dos casos já conhecidos de ativação celular intra-enxerto sem qualquer contrapartida clínica, um fenômeno mal compreendido. Um destes três receptores sofreu vários episódios de disfunção renal, espontaneamente reversíveis assim como algumas infecções urinárias. Os níveis de ciclosporinemia destes três casos estavam dentro dos níveis pretendidos.

O grupo B exibiu um padrão Th1. Os valores de IL-2 estiveram compreendidos entre 370 e 1640 pg/ml. Consideramos muito interessante que os episódios de rejeição aguda irreversível foram acompanhados por valores significativamente maiores de IL-2 que nas crises de rejeição aguda reversível. A quase completa inibição da síntese de IL-10, nos receptores com rejeição aguda, comparados com os valores de IL-10, observados nos receptores estáveis, põe em evidência o importante papel desempenhado por IL-10 na transplantação renal no homem e, ao mesmo tempo, contradiz as sugestões feitas por outros autores (Su e col., 1994) sobre o papel predominante desta citocina nas rejeições severas.

Dito isto, não queremos excluir, ab initio, um eventual desempenho de IL-10 como citocina predominante nas rejeições agudas “humorais” puras, dado que apenas estudamos um caso incluído nesta categoria. Este doente, um jovem de 17 anos, do sexo masculino, perdeu o aloenxerto, na sequência de uma crise de rejeição aguda do grau III da classificação de Banff, tendo a biópsia clássica mostrado trombose arterial disseminada com infiltração intersticial, ligeira a moderada, por mononucleares. Os

valores de IL-2/IL-10, no início da crise imunológica, foram 1018/41.2 pg/ml. Realmente, este valor de IL-10 é o segundo maior medido nos doentes do grupo B; o valor mais alto foi obtido numa doente com rejeição aguda, grau IIb de Banff, mas esta doente foi tratada com sucesso, com um curso de soro anti-timocítico. Neste caso, também a IL-2 medida foi 993 pg/ml, enquanto que IL-10 subiu até 89 pg/ml. Supomos que a IL-10 é sintetizada especialmente pelos monócitos-macrófagos presentes nas coculturas. Realmente, há um aumento significativo de células CD14⁺ nas BAAF obtidas nos casos de rejeição aguda resistente a corticoterapia (cap. VI).

As punções aspirativas realizadas no dia 7 no grupo B, 10 ± 9 dias antes do início clínico da rejeição aguda, em cultura, sintetizaram uma quantidade significativamente maior de IL-2 que as culturas de BAAF do dia 7, do grupo A. Este importante achado sugere que a activação imunológica que levará ao estabelecimento clínico de rejeição, já está em curso no dia 7. A correlação entre a IL-2 produzida no dia 7 e a registada no início da crise foi 0.59, $p=0.014$ (fig. 2).

Os valores de ciclosporinemia não podem ser responsabilizados por estes resultados, dado que não observámos diferenças significativas, ao compararmos os valores de CsA no sangue total medidos no dia 7 entre os grupos A e B (tabela 1). Apenas um, dos dezasseis doentes, não se comportou dentro deste padrão; os outros 15, exibiram valores de IL-2 compreendidos entre 270 e 1700 pg/ml. O doente desviante apenas produziu uma pequena quantidade de IL-10 sem IL-2 e constitui o primeiro receptor, do ponto de vista cronológico, a entrar no estudo. Assim, não podemos excluir que um problema de preservação não tenha afectado os sobrenadantes então recolhidos. Destes resultados, resulta que a síntese de IL-2 nas culturas das BAAF, obtidas ao dia 7 pós-transplantação podem constituir um sinal premonitório de crise de rejeição aguda no futuro próximo e, ao mesmo tempo, assumir um indicador de insucesso de CsA, em diminuir a síntese de IL-2. Isto, por sua vez, sugeriria quer um aumento da dose de CsA, especialmente se os seus níveis estivessem dentro da janela terapêutica, ou então, adicionar uma nova droga imunossupressora.

Seis doentes do grupo B apresentaram uma produção de IL-2 nas culturas, superior a 800 pg/ml, no dia 7 pós-cirurgia. Cinco destes receptores necessitaram de tratamento com soros linfocíticos. Dos 9 casos restantes, que produziram menos de

800 pg/ml, apenas um caso sofreu, mais tarde, uma crise resistente a esteróides (IL-2 = 540 pg/ml; IL-10 = 0 pg/ml).

Os receptores com rejeição crónica mostraram um padrão tipo Th2. Isto está de acordo com um relato recente sobre a expressão de mRNA de citocinas intra- enxerto (Ode-Hakim e col., 1996), em que os autores não observaram aumento da regulação de mRNA de IL-2, mas encontraram um aumento de mRNA para IL-10, em biópsias clássicas de transplantes renais.

Estamos confiantes sobre o diagnóstico de rejeição crónica nos quatro casos sem biópsia renal clássica. Todos perderam a função dos aloenxertos e as suas doenças renais originais eram refluxo vesico-ureteral (2 casos), nefropatia de IgA e glomerulonefrite crónica. Outros poderiam alegar que IL-10 foi produzida por monócitos-macrófagos, mas ainda assim, seria de esperar que linfócitos T, expostos a IL-10 na ausência de IL-2 seriam desviados para um fenótipo Th2.

Os valores similares de IL-10, medidos nos doentes estáveis e com rejeição crónica, realça a complexidade extrema própria desta citocina. IL-10 pode ser produzida por linfócitos T e B, por células apresentadoras de antigéneo (Bromberg, 1995) e está dotada com efeitos imunoestimulantes e imunodepressores sobre a cascata imune. IL-10 diminui a expressão de B7 (Ding e col., 1993) e da classe II de MHC nos macrófagos (de Waal Malefyt e col., 1991), bloqueia a síntese de IL-12 por macrófagos (D'Andrea e col., 1993) e inibe a proliferação celular dependente de estimulação por macrófagos e diminui a libertação de IFN- γ (Macatonia e col., 1993). Ainda, IL-10 pode inibir a produção de TNF α e a expressão de ICAM-1 pelas células apresentadoras de antigéneo (Tripp e col., 1993). Por outro lado, IL-10 é produzida durante as crises de rejeição aguda no transplante hepático (Bishop e col., 1993), no transplante de ilhéus pancreáticos (Lee e col., 1994) e está envolvida na doença de enxerto versus hospedeiro (Allen e col., 1993). Mais ainda, após estimulação por antigéneo repetida, há uma síntese predominante de IL-10 (Croft e col., 1995). IL-10 estimula a proliferação e a expressão de MHC nos linfócitos B (Go e col., 1990) e promove a expressão de Fc γ RI nos monócitos e, conseqüentemente, aumenta a citototoxicidade celular dependente de anticorpos (te Welde e col., 1992), fenómenos causalmente relacionados com o processo de rejeição crónica (Koskinen e col., 1996).

Não temos uma explicação para a síntese significativamente maior de IL-10 ao dia 7, comparada com a medida no dia 30 nos doentes do grupo A, mas isto poderá constituir um sinal precoce para o desvio para Th2, ou alternativamente, os monócitos-macrófagos poderão ser as células responsáveis pela síntese de IL-10 e ao dia 30 pós- transplante não encontramos, por hábito, um número significativo destes mononucleares.

Três doentes com infecção por citomegalovírus mostraram altos valores de IL-2, tal como seria esperado dentro de uma reacção antiviral (Carter e col., 1996), curiosamente com valores claramente superiores ao valor discriminante para rejeição aguda. No entanto, pensamos que será muito importante ter em conta os valores elevados de IL-10 concomitantes que, especulamos, poderá ter desempenhado função relevante na prevenção de crise imunológica.

Não encontramos correlações significativas entre ciclosporinemia e IL-2 ou IL-10, com excepção de uma inesperada correlação positiva, $r=0.42$, entre CsA versus IL-2, ao dia 7, no grupo B. Isto poderá ser um sinal indirecto de escape aos efeitos de CsA sobre os genes promotores da síntese de IL-2, anunciando um episódio de rejeição aguda iminente. Por outro lado, poderá ser outra manifestação da conhecida pobre correlação entre os níveis de CsA pré-dose e os acontecimentos clínicos. Realmente, CsA pode estimular a produção de $IFN\gamma$ por linfócitos das culturas linfocitárias mistas de uma proporção significativa de doentes com doença renal terminal (Briggs e col., 1996), com a consequente estimulação da síntese de IL-2. Nós especulamos que estes doentes talvez sejam mais susceptíveis a sofrer uma crise de rejeição aguda constituindo uma fracção significativa, ainda não identificada, dos nossos doentes do grupo B.

As culturas das BAAF não sintetizaram IL-4. IL-4 tem sido indicada como marcador seguro de desvio de T para fenótipo Th2 e a razão IL-4 sobre $IFN\gamma$ tem sido indicada como o índice mais seguro de maturação dos fenótipos Th1 e Th2 (Chen e col., 1995). Contudo, num modelo animal, a neutralização de IL-4, através da administração do receptor solúvel de IL-4, levou ao prolongamento da sobrevida do aloenxerto e não, como estava antecipado, ao acelerar da crise imunológica (Fanslow e col., 1991). CsA e FK506 possuem a capacidade de inibir a síntese de IL-4, especialmente FK506, que é um fortíssimo inibidor (Wang e col., 1992). Cremos que

isto poderá ser um indicador que IL-4 talvez não desempenhe um papel dominante na transplantação, no homem.

IFN γ estava ausente da maior parte dos sobrenadantes das culturas de BAAF; apenas, dois dos vinte e dois doentes do grupo A e 5, dos 22, do grupo B, produziram pequenas quantidades de IFN γ . Também o grupo de Kirk (Kirk e col., 1992) documentaram que a análise da síntese de IFN γ , por linfócitos infiltrantes no aloenxerto, recuperados de rins com rejeição aguda, não era útil para o diagnóstico das crises imunológicas, dado que apenas uma minoria de casos com rejeição reversível e metade dos receptores com crise de rejeição irreversível produziam IFN γ . Recolhemos os sobrenadantes ao fim de 48 horas de incubação e não sabemos se tivéssemos medido IFN γ mais tarde, na cultura, não teríamos diferentes resultados.

Na realidade, Danzer avaliou a síntese de IFN γ nas culturas mistas linfocitárias e observou os valores mais elevados ao dia 6 de cultura (Danzer e col., 1994). Em alternativa, os nossos resultados poderão ser a consequência duma reentrada rápida de IFN γ nas células, explicando as diferenças entre os resultados por métodos de quantificação de mRNA e de proteína.

Em resumo, as culturas de BAAF de doentes estáveis exibiram um padrão de produção de citocinas tipo Th0/Th2, tipo Th1, durante as crises agudas de rejeição, Th2, durante a rejeição crónica e Th0, no início de infecção por citomegalovírus não seguida de crise imunológica. Mais importante: IL-2 produzida por culturas de BAAF do dia 7 pós-transplantação fiavelmente previu episódio de rejeição iminente assim como poderia sugerir a ocorrência de crise irreversível de rejeição. Este teste poderá constituir um meio muito útil de avaliação imunológica e, ao mesmo tempo, assumir papel adjuvante na escolha da estratégia de imunossupressão, no transplante renal.

VI- Monócitos-Macrófagos e citocinas/quemocinas em culturas de biópsias aspirativas: síntese aumentada de IL-1ra nos doentes com transplante renal livres de rejeição.

Introdução

Monócitos-macrófagos constituem uma população celular heterogénea e muito complexa. Estas células desempenham um papel predominante em várias doenças, nomeadamente na glomerulonefrite crescêntica (Atkins e col., 1976; Nikolic-Paterson e col., 1994), assim como na transplantação renal (Colvin, 1996). Podem comportar-se como células fagocíticas envolvidas em limpeza dos componentes de células necróticas, na necrose tubular aguda pós-transplantação (Solez e col., 1993,a), mas podem ter efeitos deletérios durante o período pós-reperfusão, ao produzirem radicais livres de oxigénio, contribuindo para a peroxidação de lipídeos (Rabl e col., 1993), um dos mecanismos de lesão celular, especialmente das membranas.

No transplante renal os monócitos-macrófagos estão presentes em número aumentado durante os episódios de rejeição aguda e crónica (Colvin, 1996). Embora haja evidência que eles estão especialmente empenhados nas rejeições vasculares, com forte ou predominante componente humoral (Colvin, 1996; Kooijmans-Coutinho e col., 1996), a sua presença também é notada nas rejeições celulares (Colvin, 1996; Dooper e col., 1992). Realmente, os monócitos-macrófagos são células apresentadoras de antígeno profissionais, podem participar na co-estimulação da activação dos linfócitos T, através da produção de IL-1 e IL-12 (Atkins e col., 1976; Hsieh e col., 1993) e, ao mesmo tempo, promover a maturação de T para Th1 CD4⁺, apontados como células fundamentais nos fenómenos de rejeição (Nickerson e col., 1994; Fitch e col., 1993). Além disso, monócitos-macrófagos podem sintetizar quemocinas (Wenzel e Abboud, 1995), como IL-8, MCP-1 e MIP-1 α que, por sua vez, são responsáveis por uma maior infiltração no aloenxerto de mononucleares, com conseqüente maior lesão do órgão transplantado. Por outro lado, monócitos-macrófagos podem libertar IL-1ra (Atkins, 1976), IL-10 (Ziegler-Heitbrock, 1996), TGF- β (Sharma e col., 1996) e lipoxinas (Brady e col., 1996), substâncias com capacidade anti-inflamatória. Mais, podem sintetizar IL-6 que, além das conhecidas propriedades pro-inflamatórias, pode

inibir a libertação de IL-1 β por monócitos previamente activados por lipopolisacárido (Tilg e col., 1994) e induzir a diminuição da expressão do gene de IL-1 β nas células glomerulares, na nefrite nefrotóxica (Tam e col., 1996).

Monócitos-macrófagos são frequentemente observados nas biópsias aspirativas com agulha fina, em transplante renais, especialmente, nas situações de necrose tubular aguda e durante as crises de rejeição (Hayry, 1989), mas também em doentes com função estável do aloenxerto. O nosso objectivo de estudo consistiu na quantificação de monócitos-macrófagos nas biópsias aspirativas dos receptores de transplante e avaliar as citocinas IL-1ra e IL-6, conjuntamente com as quemocinas IL-8, MCP-1 e MIP-1 α que nós postulámos, poderiam apontar para implicações diferentes, decorrentes da presença dos monócitos-macrófagos infiltrantes nos aloenxertos renais. Também estudámos M-CSF que estimula a sobrevivência, proliferação e diferenciação destas células.

Doentes e métodos

Doentes

Cinquenta e seis adultos receptores de transplante de rim de cadáver, 34, do sexo masculino e 22, do sexo feminino, foram admitidos no nosso estudo de quantificação de monócitos-macrófagos nas punções aspirativas. Todos estavam em tratamento substitutivo renal antes da transplantação, 53, em programa regular de hemodiálise e 3, em diálise peritoneal contínua ambulatoria.

As doenças renais originais estão apresentadas na tabela 1.

Glo.crónica/desconhecida	20
nefrite hereditária/tubulointersticial	17
nefropatia IgA	5
doença renal policística do adulto	5
nefropatia diabética	5
glo.rapidamente progressiva	2
lupus eritematoso sistémico	1
glo. mesangiocapilar	1

tabela 1: distribuição das doenças renais originais

O doente com lupus estava em remissão desde há mais de seis meses sem qualquer tratamento immunossupressor. Todos eram receptores de primeiro transplante renal, com excepção de três segundos transplantes. Os receptores e os dadores foram tipados por testes de microlinfotoxicidade, com aloantisoros convenientemente estandardizados.

Imunossupressão: 53 receptores receberam tratamento clássico triplo, ciclosporina A, azatioprina e prednisolona e os três segundos transplantes foram tratados com imunossupressão quádrupla, que incluiu soro anti-timocítico de cavalo ou de coelho, durante os primeiros sete dias pós-transplantação. A dose oral diária de ciclosporina A foi dividida em duas tomas, com ajustamentos, de acordo com os níveis de ciclosporina A no sangue total, medidos por método TDx™ da Abbott. A dose de prednisolona foi sendo progressivamente diminuída, de forma que pelo fim do primeiro mês pós-transplante os receptores estavam medicados com 20 mg, p.o., por dia. Os episódios de rejeição aguda foram tratados com 3-4 administrações i.v. de 500 mg de metilprednisolona e por soros policlonais ou monoclonais anti-timócitos, durante 7 a 10 dias nos casos de rejeições resistentes a esteróides ou quando as biópsias clássicas foram classificadas com grau IIb ou maior, segundo os critérios de Banff (Solez e col., 1993).

Os doentes foram divididos em quatro grupos:

A- 41 receptores livres de rejeição aguda durante o primeiro ano pós transplantação

B- 6 doentes com rejeições agudas sensíveis a pulsos de corticoterapia

C- 9 doentes com rejeições agudas resistentes a corticoterapia/irreversíveis

D- 5 doentes com rejeição crónica (1 de B e 4 de C)

Treze receptores do grupo A, quinze, dos grupos B+C e cinco doentes do grupo D foram incluídos no estudo de citocinas/quemocinas. Um receptor de A, um, de B+C e um, de D eram segundos transplantes.

As crises de rejeição aguda foram confirmadas por biópsia renal clássica em todos os casos, excepto num receptor com rejeição aguda reversível, com pulsos de corticoterapia, em que o diagnóstico foi baseado somente nos achados da biópsia aspirativa. Todas as crises de rejeição ocorreram durante as primeiras seis semanas pós- transplantação, entre os dias 13º e 42º.

Rejeição crónica foi diagnosticada em casos de deterioração lenta e progressiva da função do aloenxerto, após exclusão de outras causas de disfunção renal e confirmada por biópsia renal clássica, em todos os casos.

Métodos

As biópsias aspirativas com agulha fina foram feitas de acordo com os métodos previamente descritos por P. Hayry (Hayry e von Willebrand, 1981), aos dias 7, 14 e 30 pós-transplantação e sempre que uma crise de rejeição era suspeitada e ainda, durante períodos estáveis, nos receptores com rejeição crónica. As punções aspirativas foram obtidas cerca de 2 horas decorridas sobre a toma matinal das drogas imunossupressoras. As amostras obtidas foram imediatamente introduzidas em 6ml de meio RPMI com lítio de heparina a 125 Un/ml. Uma pequena parte da amostra foi submetida a breve citocentrifugação e depois guardada a -20°C, até estudo posterior.

A coloração de monócitos-macrófagos foi feita com método fosfatase alcalina-anti fosfatase alcalina, recorrendo a anticorpo monoclonal anti-CD14, uma generosa oferta do Dr. David Hughes, do Transplant Cytology Laboratory do hospital John Radcliffe de Oxford, Reino Unido. O anticorpo, 3C10, foi previamente demonstrado ser altamente sensível e específico na identificação de monócitos-macrófagos (van Voorhis e col., 1983).

Os quatro mililitros restantes da amostra aspirada, depois do processo de lise eritrocitária, foi ajustada para uma concentração celular de 5×10^4 células/200 μ l. De seguida, a suspensão celular foi incubada em meio de cultura RPMI, suplementado com Hepes, penicilina, gentamicina e l-glutamina, com 10 U/ml de IL-2 recombinante. O meio macromolecular, usado a 10%, consistiu em soro autólogo, derivado de sangue obtido imediatamente antes da toma matinal das drogas imunossupressoras. A incubação foi feita a 37°C em meio humidificado com 5% de CO₂, durante 48 horas. Os sobrenadantes eram então recolhidos e guardados a -70°C até serem testados. Os sobrenadantes foram analisados para IL-1ra, IL-6, IL-8, M-CSF, MCP-1 e MIP-1 α , por métodos ELISA, com kits de Quantikine™, da R&D, MN, EUA e de acordo com as instruções do laboratório produtor.

Análise de dados

Os resultados são apresentados como medianas e desvios padrões na análise de CD14, ciclosporinemias e creatinemias, médias e desvios padrões, para citocinas e quemocinas, teste t de Student, para as comparações de creatinemias, ciclosporinemias e CD14. Kruskal-Wallis ANOVA e correlações de Pearson foram feitas para análise de citocinas e quemocinas. O programa Statistica™ da Statsoft foi escolhido.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina do Porto e consentimento informado foi obtido junto dos doentes.

Resultados

Todos os receptores, excepto um, apresentavam um painel de anticorpos linfocitotóxicos $\leq 10\%$. Ao compararmos as incompatibilidades HLA-A,B,DR de cada grupo, não observámos diferenças significativas. As taxas de sucesso das punções aspirativas aos dias 7, 14, 30, início de rejeição aguda e rejeição crónica foram 90.6, 90.6, 97.6, 100 e 100%, respectivamente. Apenas tivemos uma complicação após as biópsias aspirativas: um caso de hematúria macroscópica, de 6 horas de duração, que resolveu espontaneamente e sem desconforto importante num doente com rejeição crónica.

Em consequência de problemas técnicos durante o processo de coloração das citopreparações, 20 doentes do grupo A 7 dias, e 30 doentes do grupo A 14 dias, foram estudados. Todas as outras citopreparações foram convenientemente coradas.

Como os receptores com rejeição crónica foram aparecendo num tempo posterior, não tivemos oportunidade de os incluir no estudo de CD14.

Tal como anticipámos, observámos diferenças significativas para CD14⁺, ao compararmos receptores estáveis com os que sofreram necrose tubular aguda pós-transplantação e em consequência, estes dois subgrupos serão tratados separadamente.

Na tabela 2 estão apresentadas as creatinemias e as ciclosporinemias dos grupos A, B e C, durante o primeiro mês pós-transplante (as creatinemias dos receptores com necrose tubular aguda não estão mostradas na tabela 2, dado que todos estavam a receber tratamento substitutivo renal, por hemodiálise).

grupos	n°	creatinina, mg/dl	CsA, ηg/ml
A: dia 7, estável	14	2.3±3.2 (a,b,c)	171± 89 (h)
A: dia 7, NTA	6	HD	149± 68
A: dia 14, estável	17	2.5± 3.0 (d,e)	204± 67
A: dia 14, NTA	13	HD	199± 69
A: dia 30, estável	40	1.85± 1.6 (a, f, g)	241± 97 (h,i,j)
B	6	4.1± 2.2 (b,d,f)	187± 52 (i)
C	9	5.5± 3.2 (c,e,g)	154± 45 (j)

tabela 2: creatinemias e ciclosporinemias.

A: sem rejeição; B: rejeição aguda sensível a corticóides; C: rejeição aguda resistente a corticóides; NTA: necrose tubular aguda; HD: hemodiálise; a,b,c,d,e,f,g,h,i,j: teste t de Student, amostras independentes, $p < 0.05$.

Na tabela 3 apresentamos o número absoluto de CD14⁺ / amostra e a razão número de células renais sobre número de CD14⁺.

grupos	CD14 ⁺ , n°	cél. Renais/CD14 ⁺
A: dia 7, estável	126± 172	2.3 ±1.6
A: dia 7, NTA (a)	295± 447	2.5± 5.7
A: dia 14, estável	118± 101	2.75± 3.0
A: dia 14, NTA(a)	183± 149	2.8± 3.1 (b)
A: dia 30	66± 75	4.3± 4.4 (c)
B	128± 100	1± 5.5
C	322± 209	0.6± 1.0 (b,c)

tabela 3: número absoluto de CD14⁺ e razão cél. renais/CD14⁺. A: sem rejeição; B: rejeição aguda sensível a corticóides; C: rejeição aguda resistente a corticóides; (a): necrose tubular aguda; (b,c): teste t de Student, amostras independentes, $p < 0.05$.

Em relação ao número de monócitos-macrófagos, encontramos diferenças significativas, ao compararmos os resultados, do dia 7, em doentes estáveis, com dia 7, em doentes com necrose tubular aguda, $p=0.048$, dia 7 estável versus dia 30, $p=0.01$, dia 14 estável versus grupo C, $p=0.004$ e dia 30 versus grupo C, $p<0.0001$ e dia 30 versus B, $p=0.005$. Pelo contrário, não encontramos diferenças significativas para o número absoluto de monócitos-macrófagos, ao compararmos dia 7 com necrose tubular aguda ou dia 14 com necrose tubular aguda versus grupos B ou C, com exceção da comparação entre dia 7, com necrose tubular aguda, versus grupo B, $p=0.047$.

Ao analisarmos a razão células parenquimatosas renais sobre $CD14^+$, não encontramos diferenças significativas entre dia 7 NTA, dia 14 NTA e dia 30 versus rejeição aguda sensível a corticóides. Doutro modo, os pares dia 14 NTA versus C e dia 30 versus C exibiram diferenças significativas, $p=0.017$ e 0.005 , respectivamente. O par dia 7 NTA versus C quase atingiu a significância, $p=0.06$.

As correlações entre as creatinemias e o número de $CD14^+$ mostraram ser negativas nos grupos sem rejeição aguda e positivas nos grupos com rejeição aguda, mas em todos os casos não atingiram significância.

Para o estudo de citocinas e quemocinas, escolhemos, ao acaso, 13 receptores do grupo A, tendo restringido a avaliação às culturas de biópsias aspirativas feitas no dia 7 pós-cirurgia, de modo a podermos compará-las às culturas de biópsias aspirativas do dia 7, no grupo C, já que, como seria de esperar, as alturas do início das crises de rejeição espalharam-se por algumas semanas, tornando impossível o estudo dos receptores com e sem rejeição na mesma altura pós-cirurgia.

Dois doentes do grupo A estavam a receber tratamento hemodialítico na altura da punção aspirativa, estando as creatinemias dos restantes 11 distribuídas entre 1.3 e 7.7 mg/dl. As sessões de hemodiálise foram feitas pelo menos 24 horas antes das punções aspirativas. Quinze receptores de B e C e cinco, de D foram também estudados. Os receptores dos grupos B e C serão considerados conjuntamente, dado que não encontramos diferenças entre eles para os factores de crescimento estudados, com exceção de M-CSF que, por isso, será apresentado isoladamente. Ainda dos 9 receptores do grupo C, sete, tinham feito exame por biópsia aspirativa ao dia 7 pós cirurgia, 10 ± 10.5 dias antes, do início clínico dos episódios de rejeição aguda

corticorresistente. Dois, destes sete receptores, estavam a receber tratamento de suporte com hemodiálise; os restantes cinco apresentaram creatinemias do dia 7 compreendidas entre 1.5 e 6.4 mg/dl. Mais uma vez, um intervalo de tempo não inferior a 24 horas decorreu entre a sessão de hemodiálise e a punção aspirativa. Os cinco receptores do grupo D, com rejeição crónica foram estudados 555 ± 165 dias decorridos sobre a data de transplantação, e a mediana/desvio padrão das respectivas creatinemias eram 3.4 ± 1.5 mg/dl.

Não encontramos diferenças significativas entre as ciclosporinemias dos diferentes grupos. Na tabela 4, apresentamos os resultados com excepção dos referentes a M-CSF, mostrados na tabela 5.

	A, dia 7 (pg/ml) (a)	C, dia 7 (pg/ml) (a)	B+C (pg/ml)	D (pg/ml)
IL-1ra	313± 80.2 (b,c)	25± 16.0 (b)	120± 36.2 (c)	126± 33.6
IL-6	1164± 440 (d)	177± 65.8 (d)	1060± 397	729± 243
IL-8	951± 183	653± 236	934± 191	545± 274
MCP-1	1762± 472	710± 299	2503± 872	2311± 814
MIP-1α	427± 208	85.7± 55.9	254± 140 (e)	1144± 370 (e)

tabela 4: Antagonista do receptor de interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8, proteína-1 quemoattractiva do monócito, proteína-1 alfa inflamatória do macrófago, medidos em sobrenadantes de 48 horas de culturas de biópsias aspirativas. A: sem rejeição; B: rejeição aguda corticosensível; C: rejeição aguda corticorresistente; D: rejeição crónica; (a): dia 7 pós cirurgia, 10 ± 10.5 dias antes da crise de rejeição aguda. Análise por Kruskal-Wallis ANOVA; (b): $p=0.012$; (c): $p=0.018$; (d): $p=0.020$; (e): $p=0.045$.

	A, dia 7	C, dia 7	B+C	D	B	C
	(a)					
M-CSF	433±	197± 58.6	219± 44.1	60± 31.3	102±44.4	291±
(pg/ml)	145.8				(b)	56 (b)

tabela 5: factor colónia-estimulante de macrófago em sobrenadantes recolhidos às 48 horas de incubação de culturas de biópsias aspirativas. A: sem rejeição; B: rejeição aguda corticosensível; C: rejeição aguda corticorresistente; D: rejeição crónica; (a): dia 7 pós transplantação, 10±10.5 dias precedendo a crise de rejeição. Kruskal-Wallis ANOVA, (b): p=0.014.

No grupo A, encontrámos correlações significativas entre IL-6 versus IL-1ra, p=0.031 (fig. 1), entre M-CSF versus IL-1ra, p=0.01, MCP-1 versus IL-8, p=0.014 e entre MCP-1 versus IL-6, p=0.002. No grupo C, dia 7, observámos correlações significativas entre IL-8 versus MCP-1, MIP-1α e IL-6, p<0.0001, p=0.001 e p=0.001, respectivamente.

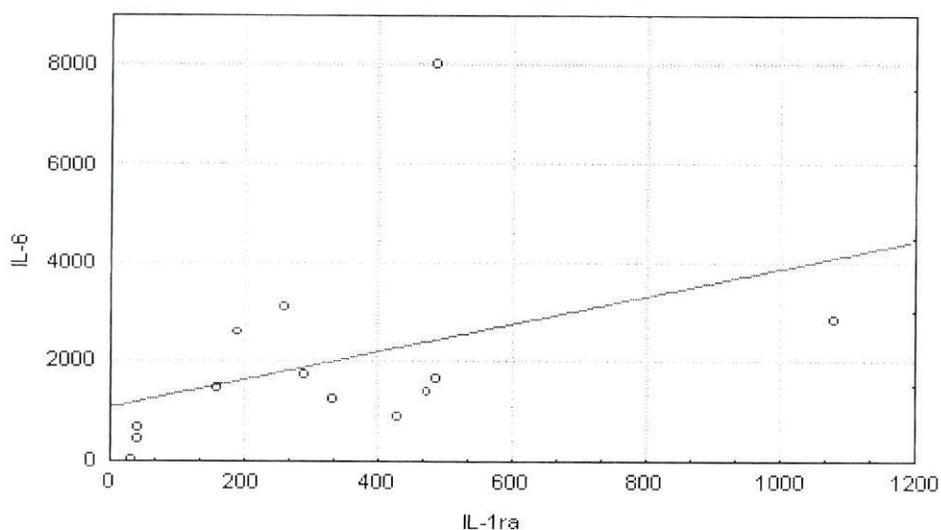


fig.1: correlação entre IL-6 e IL-1ra nos doentes estáveis, dia 7 pós transplante; valores expressos em pg/ml..

Nas fig 2a a 2d apresentamos imagens de punções aspirativas marcadas com o anticorpo 3C10.

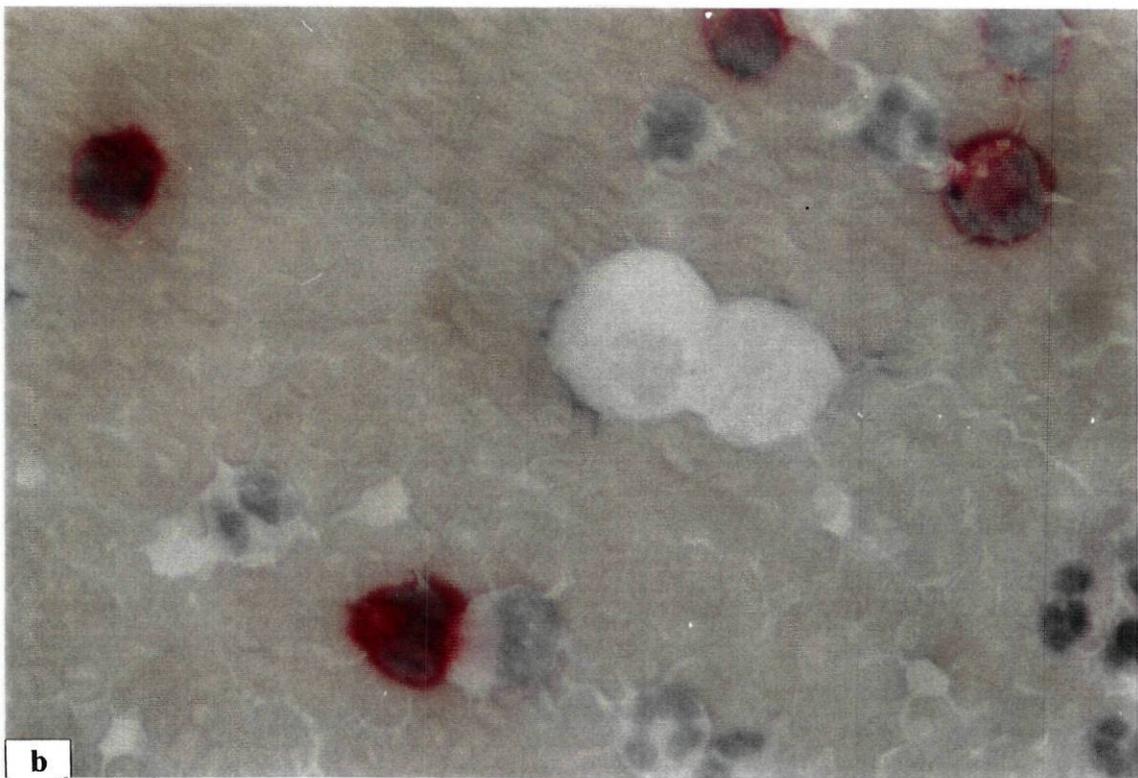
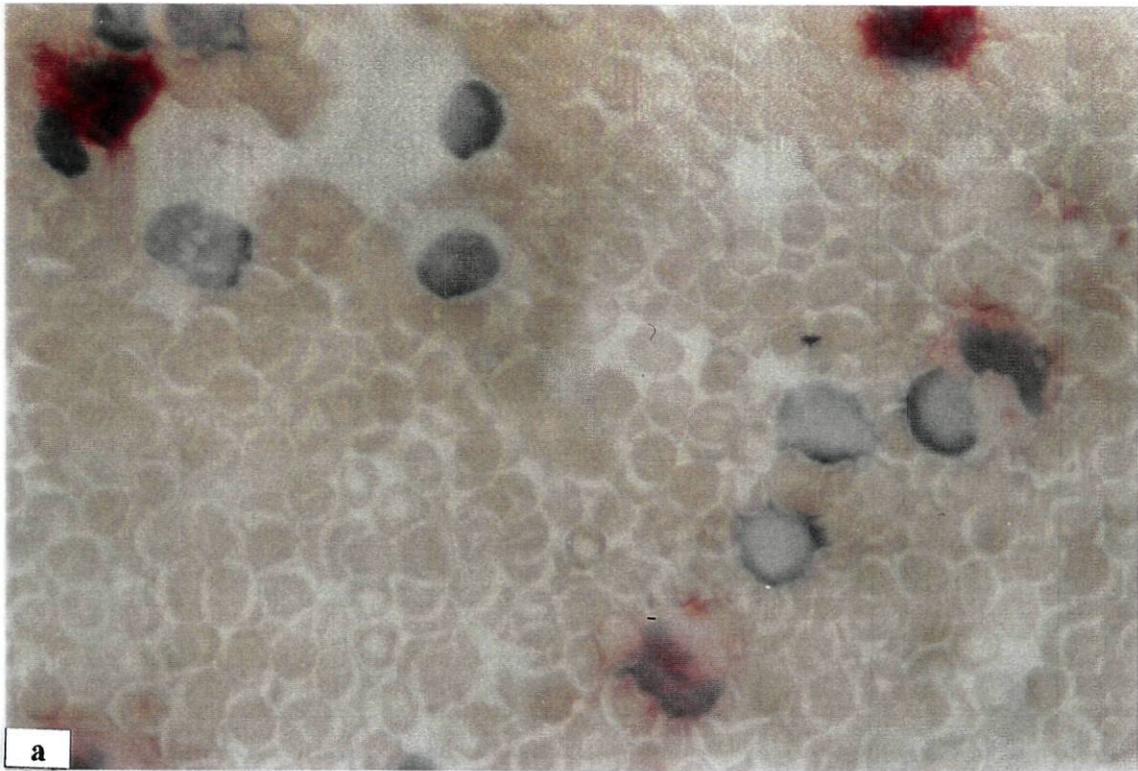


Fig 2a - 2b

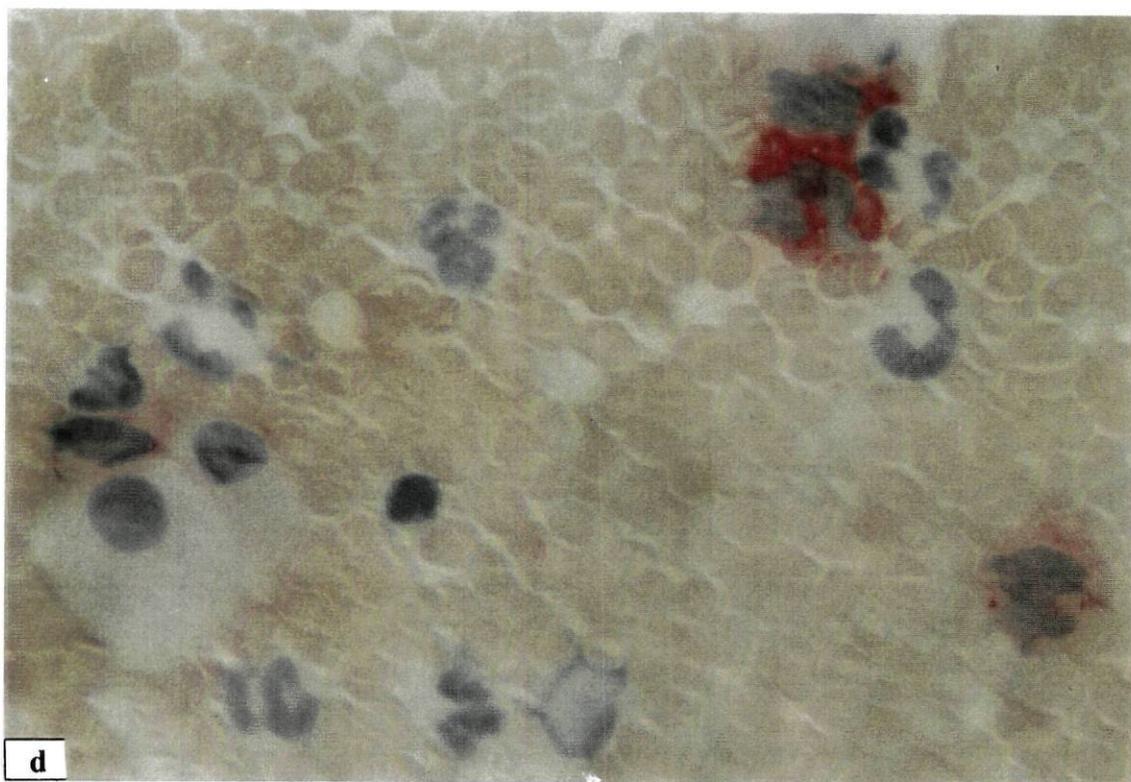
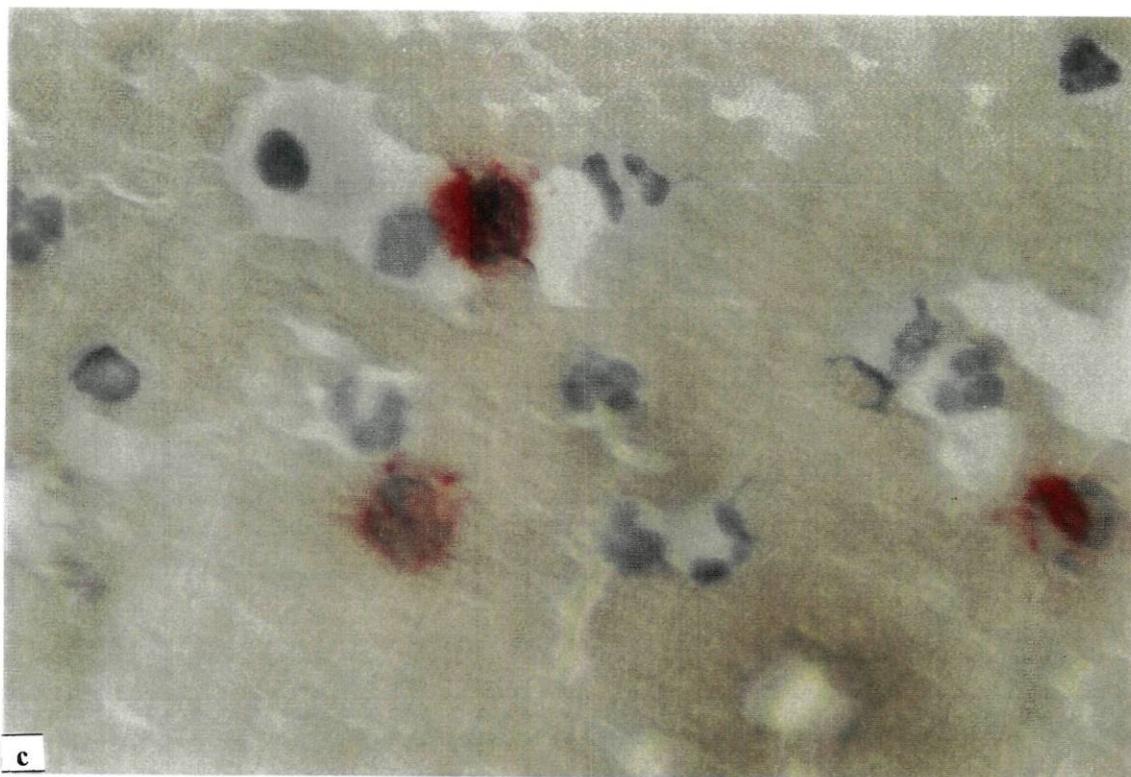


Fig 2c - 2d

Discussão

Duas conclusões principais podem ser retiradas do nosso estudo. Primeiro, monócitos-macrófagos estão presentes, em grande número, nas biópsias aspirativas de transplantados renais, livres de crises de rejeição aguda, durante as duas primeiras duas semanas pós-cirurgia, e mais ainda, se os receptores sofrem de necrose tubular aguda do aloenxerto; ainda, monócitos-macrófagos parecem jogar um papel relevante nas rejeições agudas corticorresistentes, mas desempenham uma acção menos relevante nas rejeições agudas corticosensíveis. Segundo, IL-1ra poderá desempenhar uma função muito relevante na diminuição da resposta aloimune, dado que observámos que culturas de biópsias aspirativas de receptores sem rejeição produziram quantidades significativamente maiores de IL-1ra que as culturas de biópsias aspirativas de receptores com rejeição aguda ou que iriam sofrer, cerca de dez dias mais tarde, uma dessas crises.

Outros autores já tinham relatado a presença de células CD14⁺ nas biópsias clássicas de transplantados renais (Dooper e col., 1994; Raftery e col., 1989; Volpes e col., 1991). Outros já tinham também observado mais frequentemente CD14⁺ nos transplantados com rejeição aguda de tipo vascular que na rejeição aguda tubulointerstitial (Kooijmans-Coutinho e col., 1996).

Preferimos estudar a razão células parenquimatosas renais sobre CD14⁺, numa forma algo similar ao modo como a classificação de Banff trata a infiltração linfocitária nos túbulos renais. Esta razão mostrou diferenças significativas quando comparámos receptores com rejeição aguda corticorresistente versus receptores sem rejeição estudados, aos dias 14, com necrose tubular aguda e 30. Estas diferenças assumem maior significado, se tivermos em consideração que coincidem, de forma aproximada, com os tempos de rejeição aguda, que ocorreram entre a 2^a semana e a 6^a semana pós- transplante. A diferença entre rejeição corticorresistente e dia 7, com necrose tubular, quase atingiu a significância, $p=0.06$. Outro quadro correspondeu às rejeições agudas corticosensíveis, que não mostraram diferenças significativas com os doentes estáveis, com ou sem necrose tubular aguda. Estes nossos achados estão de acordo com outros autores que apontam para uma maior importância de monócitos-

macrófagos na rejeição aguda corticorresistente do que na rejeição aguda celular tubulointersticial (Kooijmans-Coutinho e col., 1996).

Nas situações complicadas pós transplantação por necrose tubular aguda, também observámos um largo número de CD14⁺, mas, muito provavelmente, estes monócitos-macrófagos deverão desempenhar tarefas diferentes daquelas que lhes estão cometidas nas situações de rejeições aguda e crónica. Por isso estudámos algumas citocinas e quemocinas que poderiam marcar estes dois tipos de comportamentos dos monócitos-macrófagos.

Enquanto que IL-1ra (Atkins, 1995), produzida pelos monócitos-macrófagos, deverá diminuir a resposta aloimune, M-CSF (Le Meur e col., 1996), IL-8 (Schmouder e col., 1992), MCP-1 (Wenzel e abboud, 1995) e MIP-1 α (Wenzel e abboud, 1995) são supostos estimular a resposta imune e, novamente, todos estes factores de crescimento são produzidos por monócitos-macrófagos. IL-6 é uma citocina bastante complexa, pode ter efeitos antagónicos, quer pró-inflamatórios quer anti-inflamatórios (Tilg e col., 1994; Kimball e col., 1996). A nossa decisão de medir estes factores de crescimento, nos sobrenadantes das biópsias aspirativas, foi baseada nos resultados encontrados com o estudo de IL-2 e IL-10 nestes sobrenadantes que se revelou um muito útil teste para diagnosticar rejeição aguda e, inclusive, mostrou valor preditor para rejeição futura, dentro do primeiro mês pós-transplantação (Oliveira e col., 1996).

Os nossos resultados põem em evidência a importância de IL-1ra que foi produzida em quantidade, significativamente maior, pelas culturas de biópsias aspirativas de receptores livres de rejeição aguda, comparada com os doentes com rejeição aguda ou com aqueles que iriam sofrer, alguns dias mais tarde, uma crise imunológica. IL-1ra parece constituir-se numa muito importante citocina, dado que tem a propriedade de contrariar as potentes acções pró-inflamatórias de IL-1. Da plétora de acções atribuídas a IL-1, algumas deverão ser muito relevantes para a iniciação da resposta aloimune, nomeadamente a activação das células endoteliais (Dinarello e Wolff, 1993), a co-estimulação da activação dos linfócitos T (Williams e col., 1985), a promoção da síntese de várias citocinas e quemocinas, assim como, induzir uma maior expressão de moléculas de adesão inter-celular (Atkins, 1995). Além disso, as células parenquimatosas renais, quando expostas a IL-1, produzem

TNF- α , IL-6 (Atkins, 1995), IL-8 (Abbott e col., 1991) e aumentam a sua expressão de ICAM-1 e VCAM-1 (Seventer e col., 1991).

Está documentada a síntese de IL-1 durante os episódios de rejeição aguda do transplante renal (Colvin, 1996; Mannon e col., 1993). É pois importante saber que IL-1ra tem a capacidade de antagonizar todos os efeitos de IL-1, descritos acima (Atkins, 1995). Não medimos IL-1, dado que esta citocina pode ser produzida por uma grande variedade de células, incluindo células tubulares renais, células mesangiais, linfócitos T e B, além de monócitos-macrófagos, e todos estes tipos celulares estão presentes nas amostras das punções aspirativas. Assim, tornar-se-ia muito difícil imputar a produção de IL-1, individualmente, a uma desta variedade de células. Outro tanto não ocorre com IL-1ra que apenas pode ser produzida por monócitos-macrófagos, neutrófilos e fibroblastos. Nas culturas das biópsias aspirativas, os fibroblastos estão praticamente ausentes e os neutrófilos são células em processo de necrose; assim, as células responsáveis pela síntese de IL-1ra só poderão ser os monócitos-macrófagos.

Não temos dados que nos permitam identificar a origem do estímulo para a produção de IL-1ra, nem esse era o nosso objectivo. IL-1ra está em estudo como adjuvante terapêutico no tratamento de doentes com glomerulonefrite rapidamente progressiva (Atkins, 1995) e especulamos que IL-1ra pode encontrar, no futuro, um lugar idêntico, no transplante renal.

Não foi encontrada uma diferença significativa, ao compararmos receptores com rejeição crónica versus receptores estáveis, no que respeita a IL-1ra, provavelmente porque o pequeno número de casos com rejeição crónica assim o impediu. De facto, a média e o desvio da média dos casos com rejeição crónica eram muito similares aos encontrados nos receptores com rejeição aguda, 126 ± 33.6 e 120 ± 36.2 pg/ml, respectivamente.

IL-6 apresentou um comportamento errático. Enquanto que os níveis nos sobrenadantes das culturas pareceram similares nos grupos de receptores estáveis, com rejeição aguda e com rejeição crónica, foi muito interessante verificar que os doentes que iriam sofrer uma crise de rejeição aguda produziam, no dia 7 pós-transplantação, uma quantidade de IL-6 significativamente menor que aqueles que

iriam permanecer livres de qualquer crise imunológica, estudados na mesma altura pós-cirurgia. Mais ainda, observámos uma correlação positiva significativa entre IL-6 e IL-1ra no grupo dos doentes estáveis, $p=0.031$.

IL-6 pode ter efeitos antagónicos. Enquanto que as suas propriedades pró-inflamatórias são bem conhecidas e provavelmente poderão explicar os valores altos medidos nos sobrenadantes das culturas correspondentes aos receptores com rejeição aguda e os valores intermediários observados nos que sofriam de rejeição crónica, IL-6 pode também desempenhar um papel anti-inflamatório.

IL-6 pode induzir a síntese de IL-1ra, assim como a libertação de receptores de TNF solúveis pelos macrófagos (Tilg e col., 1994). Especulamos que, nos doentes estáveis sem crises imunológicas, IL-6 possa ser também libertada por linfócitos Th0/Th2, que de acordo com dados por nós reunidos, são predominantes e parecem estar associados a aceitação do aloenxerto (Oliveira e col., 1996).

Com excepção da diferença significativa encontrada, ao compararmos a síntese de M-CSF entre os receptores com rejeição aguda corticosensível e aqueles com rejeição aguda corticorresistente, os outros grupos não mostraram diferenças. M-CSF estava elevado num grupo de doentes com insuficiência renal, com clearance de creatinina 20 ± 15 ml/min, embora não tivesse exibido correlação com a função renal (Le Meur e col., 1992). Isto talvez possa explicar a ausência de diferenças com os outros grupos, particularmente porque os nossos doentes estáveis, ao dia 7 pós-transplante tinham creatinemia 2.3 ± 3.2 mg/dl.

Ficámos surpreendidos pela ausência de diferenças significativas para MCP-1 e MIP-1 α , entre os diferentes grupos de receptores, com excepção duma síntese significativamente superior de MIP-1 α nos receptores com rejeição crónica, quando comparados com aqueles, com rejeição aguda. Pensamos que este nível mais elevado de MIP-1 α poderá estar relacionado com as propriedades de quimiotaxia para linfócitos B (Schall e col., 1993), que deverão estar comprometidos na resposta humoral, comum aos processos de rejeição crónica.

A expressão de MCP-1 está aumentada em modelos de insuficiência renal aguda isquémica (Safirstein e col., 1991). Talvez que os valores mais altos, mas não de forma significativa, de MCP-1 nos receptores com rejeição aguda comparados com os que estavam clinicamente estáveis, possam traduzir a lesão pós-isquémica ainda

presente, aos 7 dias, nos receptores estáveis, de modo a ocultar a significância da elevação ocorrida durante a rejeição aguda.

A análise de IL-8 não trouxe informação de valor. Outros autores relataram que a síntese de IL-8 pelas células tubulares proximais e distais está elevada nas biópsias clássicas de doentes com rejeição aguda do transplante renal (Schmouder e col., 1992). Por outro lado, estudos de IL-8 circulante mostraram-se decepcionantes para o diagnóstico de rejeição aguda (Kutukculer e col., 1995). Como IL-8 pode ser produzida por células renais tubulares e por células mesangiais (Wenzel e Abboud, 1995), especulamos que os altos valores de IL-8 medidos nos receptores estáveis, ao dia 7 pós-transplantação, poderão estar relacionados com fenómenos de recuperação pós-trauma cirúrgico.

Em resumo, o nosso estudo mostrou um aumento de células CD14⁺ nos transplantados renais com necrose tubular aguda ou com rejeição aguda corticorresistente, assim como, uma razão significativamente superior de CD14⁺ sobre células parenquimatosas renais, nos casos de rejeição aguda corticorresistente. Mais importante, nós mostrámos que a síntese de IL-1ra está significativamente aumentada ao dia 7 pós-transplante, nos receptores que vão permanecer livres de rejeição aguda que naqueles que vão desenvolver uma crise imunológica, 10 ± 10 dias decorridos desde o dia 7, ou que nos receptores com crise de rejeição aguda estabelecida.

IL-1ra parece marcar dois efeitos opostos, decorrentes da presença intra-enxerto de monócitos-macrófagos sobre a resposta aloimune. IL-1ra poderá ser um adjuvante muito útil no tratamento do transplante renal, como parece ser o caso com algumas doenças renais auto-ímmunes.

IL-6 parece poder desempenhar papéis opostos, quer como citocina pró-inflamatória, quer como citocina anti-inflamatória. Realmente, nos doentes estáveis, IL-6 poderá ser produzida por linfócitos Th0/Th2 infiltrantes no aloenxerto renal e então induzir a libertação de IL-1ra, por monócitos-macrófagos.

VII- Culturas de biópsias aspirativas de transplantados renais livres de rejeição produzem um factor solúvel supressor específico da resposta anti-dador.

Introdução

O transplante renal acabou por conseguir uma posição bem estabelecida no arsenal terapêutico da insuficiência renal terminal, praticamente em todo o mundo, especialmente, porque os resultados da sobrevida dos doentes transplantados, assim como dos aloenxertos atingiram um patamar muito elevado (Ponticelli e col., 1996; Williams 1995). Contudo, o uso durante toda a vida pós-transplante das drogas imunossupressoras, como a ciclosporina A e os corticosteróides, acarreta, não poucas vezes, efeitos laterais de grande importância, responsáveis por muito da morbidade e mortalidade próprias destes doentes (Bennet e Pulliam, 1983; Kahan e col., 1986; de Lange e col., 1975; Wilkinson e col., 1989).

Uma compreensão mais profunda sobre a tolerância adquirida ao aloenxerto poderia permitir um melhor ajustamento do tratamento imunossupressor.

Estudos anteriores, realizados em transplantados renais, sob tratamento com azatioprina e prednisolona sugeriram que a maioria desses doentes adquiriram hiporresposta para as células do dador, aferida pelo teste de linfólise mediada por células, ao fim do primeiro ano pós-transplantação. No entanto, esta diminuição da resposta não estava presente se avaliada pelo teste de cultura mista linfocitária (CML) (Goulmy e col., 1981; Goulmy e col., 1985).

Outros autores relataram a presença de hiporresposta a dador vivo com uma incompatibilidade HLA, avaliada pelo teste de linfólise mediada por células, em transplantados com aloenxertos funcionantes há longo tempo (Wramner e col., 1987).

Num grupo de receptores condicionados por irradiação total linfóide, alguns adquiriram tolerância ao aloenxerto, documentada pela retirada com sucesso das drogas imunossupressoras (Strober e col., 1989).

Em modelo animal de transplante hepático, onde os aloenxertos de fígado são aceites sem o uso concomitante de drogas imunossupressoras, os soros desses animais possuem marcadas capacidades imunossupressoras in vivo (Goto e col., 1996).

Uma observação similar foi relatada noutra modelo animal de transplantação renal (Takeuchi e col., 1995).

Emara e Sanfillipo descreveram, num receptor de transplante renal, a indução de uma linha de linfócitos T, isolada do sangue periférico após estimulação *in vitro*, por uma linha de linfócitos T, autóloga e alorreactiva, crescida de material de biópsia do aloenxerto (Emara e Sanfillipo, 1989), embora esta linha não tivesse restrição, pelo complexo major de histocompatibilidade.

No rato, Hutchinson mostrou que linfócitos CD4⁺ indutores de T supressores estão presentes no baço, ao quinto dia pós-transplantação, após um transplante alogeneico (Hutchinson, 1986). Por outro lado, um factor não totalmente caracterizado, indutor de T supressores pode substituir o papel de CD4⁺ indutor de T supressores (Frankel e col., 1989). Este factor solúvel requer, no entanto, a presença de células estimuladoras alogeneicas.

As células tubulares constituem a maior parte do cortex renal. Estas células podem ser induzidas a exprimirem produtos da classe II do complexo major de histocompatibilidade, durante as crises de rejeição aguda (Wuthrich e col., 1989), exprimir as moléculas acessórias ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1) (Bishop e Hall, 1989) e VCAM-1 (molécula de adesão da célula vascular 1) (Wuthrich e col., 1993). Também podem ser estimuladas a produzirem várias citocinas, tal como, TNF α (Jevnikar e col., 1991), IL-8 (Schmouder e col., 1992) e TGF- β (Thompson e col., 1989), entre outras.

Singer mostrou num artigo muito interessante, que um clone de linfócitos T, preincubado com células tubulares renais e antigéneo, deixam de proliferar, em resposta a célula apresentadora de antigéneo do baço com o antigéneo expresso na superfície (Singer e col., 1993). Estes autores especularam que a inactivação funcional de T CD4⁺ poderia ser mediada pela libertação de citocinas pelas células epiteliais tubulares, particularmente TGF- β .

A biópsia aspirativa com agulha fina constitui um meio de diagnóstico útil e fiável na monitorização imunológica dos receptores de transplante renal (Hayry, 1989). As amostras aspiradas apresentam células paenquimatosas renais e um número variável de linfócitos e monócitos-macrófagos, dependendo da situação clínica.

Pusemos como hipótese que culturas de biópsias aspirativas poderiam produzir factor(es) solúvel(is) que poderia(m) estimular a resposta anti-dador, avaliada por CML, se o receptor fosse desenvolver uma crise imunológica ou, alternativamente, diminuir a resposta anti-dador, naqueles receptores que iriam permanecer livres de episódios de rejeição aguda.

Doentes e métodos

Doentes

Quarenta e seis adultos receptores de primeiro transplante de rim de cadáver, 31, do sexo masculino e 15, do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 16 e os 52 anos, foram admitidos ao estudo. Todos estavam a receber tratamento substitutivo renal antes da transplantação, 44, em programe regular de hemodiálise e dois, em diálise peritoneal contínua ambulatória.

As doenças renais originais estão apresentadas na tabela 1.

doença	número
glomerulonefrite crónica	17
nefrite hereditária	4
nefrite tubulointersticial	7
nefrite IgA	4
doença policística do adulto	5
nefropatia diabética	4
glomerulonefrite rap. Progressiva	2
lupus sistémico eritematoso	1
glomerulonefrite mesangiocapilar	1
Henoch-Schönlein	1

tabela 1: distribuição das doenças renais originais

Os receptores e os dadores foram tipados por testes de microlinfotoxicidade, com aloantisoros convenientemente estandardizados.

Imunossupressão: todos os receptores foram tratados com terapêutica tripla, desde o início da transplantação, que incluiu ciclosporina A, azatioprina e prednisolona. A dose de CsA, dividida em duas tomas, foi sofrendo ajustamentos, ditados pelos níveis de CsA no sangue total, pré-dose, por método TDx™ monoclonal da Abbott.

As crises de rejeição aguda foram tratadas por pulsos de metilprednisolona, 500 mg i.v., durante três a quatro dias, ou por soros anti-timocíticos policlonais ou monoclonais, durante 7 a 10 dias, nos casos em que a rejeição aguda tinha provado ser corticorresistente ou, ainda, quando a biópsia renal clássica tinha sido classificada com grau IIb ou maior, de acordo com a classificação de Banff (Solez e col., 1993). Todos os episódios de rejeição aguda foram confirmados por exame histológico da biópsia renal clássica.

Os doentes foram subdivididos em dois grupos. Grupo A, 21 doentes livres de rejeição, durante, pelo menos, o primeiro ano pós-transplantação e o grupo B, 25 doentes que sofreram 28 episódios de rejeição aguda, durante as primeiras seis semanas pós-cirurgia.

Métodos

As biópsias aspirativas foram realizadas segundos os procedimentos descritos previamente por P. Hayry (Hayry, 1989), aos dias 7 e 30 pós-transplante, no grupo A e no dia 7 e primeiro dia de diagnóstico de rejeição aguda, no grupo B, sempre antes da realização da biópsia clássica. Em cada procedimento houve o cuidado em evitar a contaminação da amostra aspirada por quantidade de sangue periférico significativa e isto foi confirmado por observação da amostra à microscopia de luz, após coloração por método Romanowski modificado. Feita a lise dos eritrócitos, a suspensão celular da amostra foi ajustada para uma concentração final de 5×10^4 cél. / 200µl. As culturas foram realizadas em meio de cultura RPMI, suplementado com penicilina, gentamicina e l-glutamina, assim como soro autólogo (derivado de sangue colhido no próprio dia da punção aspirativa, mas imediatamente antes da toma matinal das drogas

imunossupressoras) a 10% e, ainda, IL-2 recombinante a 10U/ml. A incubação foi feita a 37° C, em ambiente humidificado com CO₂ a 5%, durante 48 horas. No fim deste período, 100µl de sobrenadante de cada poço foi colhido e guardado a -70°C até estudo. Estes sobrenadantes foram analisados para o seu conteúdo em interleucina (IL)-4, IL-4sRα, IL-12, IL-13, IFN-γ, GM-CSF, TGF-β1 e TGF-β2, por meio de método ELISA, com kits fornecidos por Endogen™, Cambridge, Massachusetts, EUA e Quantikine™, R&D, Minnesota, EUA, de acordo com as instruções dos laboratórios produtores.

A resposta anti-dador foi estudada por culturas mistas linfocitárias, feitas entre os 6 e os 12 meses pós-transplantação, numa altura em que os receptores gozavam de função do aloenxerto estável, há pelo menos quatro semanas. O sangue dos receptores (R) foi colhido de manhã, antes da toma das drogas imunossupressoras. As células mononucleares foram obtidas, após centrifugação, com gradientes de Ficoll-Hypaque. Após a centrifugação, o concentrado de células obtido foi ajustado para 1×10^6 cél./ml e a viabilidade celular, avaliada por exclusão do azul tripano, foi sempre superior a 95%.

Os mesmos métodos foram usados para a obtenção de células mononucleares de testemunhos (T), constituídos por três controlos normais não aparentados com o dador, para cada CML. As células do dador (D) tinham sido obtidas na altura da colheita dos órgãos, derivadas do baço ou de gânglios linfáticos e tinham permanecido congeladas em azoto líquido, até à altura das CML.

As culturas foram feitas em placas de cultura com 96 poços de fundo redondo, em triplicados e com soro AB, como meio macromolecular. As células do receptor foram incubadas a 1×10^5 cél. / poço, com um número igual de células do dador, num volume de 100µl, previamente irradiadas por raios γ a 1600 rads ou com células dos três testemunhos, para cada cultura. Os poços receberam ainda um suplemento, a 50% de volume, de meio de cultura ou de sobrenadantes das culturas de biópsias aspirativas. As células foram incubadas, durante seis dias, a 37°C em meio humidificado com 5% de CO₂ e 18 horas antes do fim da incubação, as células receberam timidina radioactiva a 20µCi por poço. As células foram então recolhidas por um recuperador de células da Skatron™. A incorporação de timidina foi avaliada num contador beta da Beckman™ e expressa em contagens por minuto (cpm).

Os resultados foram calculados como resposta relativa (rr) para cada combinação de CML, por meio da fórmula estandardizada, onde $rr = [(cpm \text{ da combinação em teste} - cpm \text{ do controlo autólogo}) / (cpm \text{ da resposta de referência} - cpm \text{ do controlo autólogo})] \times 100$.

As células de D e de R, assim como de cada combinação D/R, que não tinham recebido timidina radioactiva, foram também recolhidas, ao fim de 6 dias de incubação e estudadas por citometria de fluxo.

O nosso interesse focalizou-se nos fenótipos de linfócitos T. Para os caracterizar foram usados anticorpos monoclonais, para reconhecimento de antigéneo de diferenciação (CD3, molécula associada ao receptor do linfócito T), marcador inicial de activação (CD25, cadeia α do receptor de IL-2), marcador tardio de activação (DR, antigéneo classe II HLA). Também foram estudados os subtipos de CD4 que exprimem CD45RA (virgem ou indutor de supressor) e CD29 (integrina β - cadeia β de VLA-4, memória ou indutor de indutor). As amostras permaneceram à temperatura ambiente até à preparação, feita dentro de duas horas após a colheita. Em resumo, 10 minutos de incubação de 100 μ l da amostra com 10 μ l dos seguintes anticorpos monoclonais da Becton Dickinson (BD) e Coulter (C): produto da linha Leucogate™ standard Simulset™ (BD-S), controlos isotópicos FITC/PE/PERCP (BD) e FITC/PE (C), produto da linha FITC/CD45RA-PE standard Cytostat™ (C-CS), CD4-FITC/CD29-E (C-CS), CD3-FITC/HLADR-PERCP (BD) e CD3-FITC/CD25-PE (BD), todos conjugados directamente e usados de forma estandardizada para citometria de fluxo. As células tinham sido preservadas por reagentes Coulter Q-Prep™, numa estação de trabalho Coulter Multi-Q-Prep®. As amostras foram refrigeradas a 5°C, até aquisição num citómetro de fluxo Becton Dickinson, recorrendo a “software” Lysys II™ com análise por BD PcLysys™, versão 1.1. Todas as amostras tinham sido lavadas em PBS, imediatamente antes da aquisição.

Análise de dados

A análise estatística foi feita com o programa Statistica™ da Stasoft. As ciclosporinemias e as creatinemias foram comparadas por teste t de Student para amostras independentes. Os dados obtidos com o estudo por citometria de fluxo foram analisados por testes não paramétricos Wilcoxon e Mann-Whitney, para amostras emparelhadas e independentes, respectivamente, e Friedman ANOVA e Kruskal-Wallis ANOVA, para os factores de crescimento e culturas mistas linfocitárias nas amostras emparelhadas e independentes, respectivamente.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina do Porto e consentimento informado foi obtido em cada caso.

Resultados

Todos os receptores apresentavam um painel de anticorpos linfocitotóxicos < a 10%. Não registámos diferenças significativas, ao analisarmos as compatibilidades HLA-A,B,DR entre os dois grupos A e B. Na tabela 2, estão apresentadas as creatinemias e as ciclosporinemias. Não havia diferenças significativas para as ciclosporinemias, enquanto as creatinemias mostraram diferenças significativas.

	Grupo A		Grupo B			
	dia 7	dia 30	dia de CML(a)	dia 7	dia de rejeição	dia de CML(a)
Creatinina	2.69±	1.89± 0.9	1.51±	4.09± 2.9	4.39± 2.4	1.81
(mg/dl)	1.1		0.35			±0.46
CsA	194±	218± 79	191± 69.5	169± 81.5	174 ±76.5	198± 88.5
(ng/ml)	86.5					

tabela 2: creatinemias e níveis de Csa pré-dose no sangue total. (a) dia de CML, realizada entre 6 a 12 meses pós-transplantação; grupo A: receptores livres de rejeição; grupo B: receptores que tiveram crises de rejeição aguda.

Os episódios de rejeição aguda foram diagnosticados nas primeiras seis semanas pós-cirurgia (20 ± 10.5 dias) e todos os receptores foram tratados com sucesso, quer por corticóides (21 casos), quer por soros anti-timocíticos (7 casos). Um dos dois casos que não responderam à terapêutica anti-rejeição, foi estudado por CML, numa altura em que o seu aloenxerto já tinha sido removido. Entre os 6 e 12 meses pós-transplantação, os receptores do grupo A mostraram uma hiporresposta ao dador, $rr = 0.46 \pm 0.5$, enquanto que, na mesma altura, os receptores do grupo B não mostraram uma diminuição de resposta ao dador, $rr = 2.2 \pm 3.31$, $p = 0.021$. As respostas absolutas nos pares R/D e R/T (média dos três testes R/T de cada CML) nos grupos A e B estão mostrados na fig. 1.

Uma diferença significativa foi encontrada ao compararmos R/D versus R/T no grupo A, para os valores absolutos de cpm, $p = 0.0002$, assim como para o grupo B, $p = 0.041$.

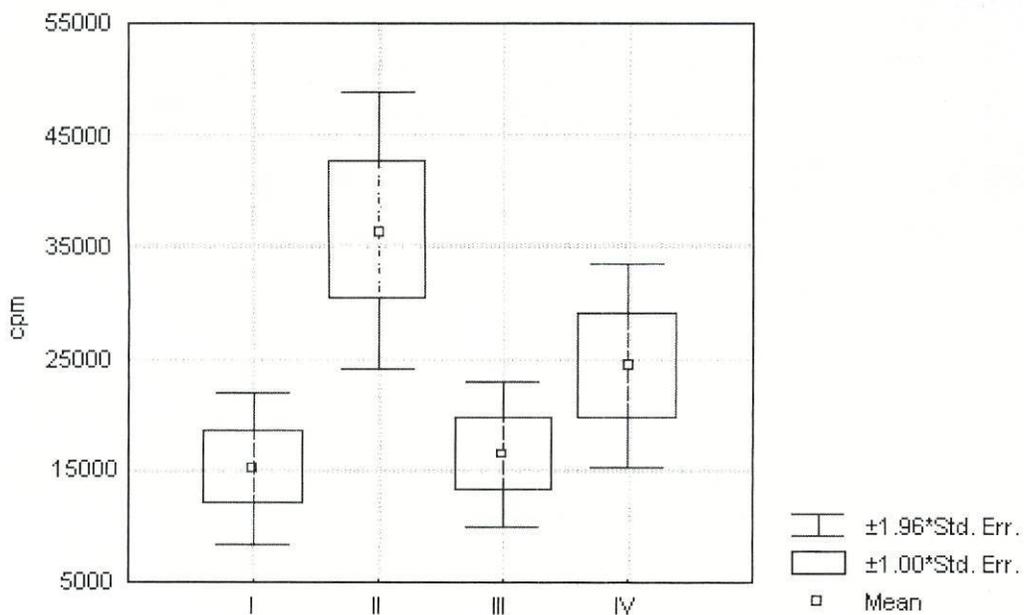


fig. 1: respostas absolutas medidas nas culturas linfocitárias mistas feitas com meio de cultura apenas. I: dador/receptor, grupo A; II: testemunho/receptor, grupo A; III: dador/receptor, grupo B; IV: testemunho/receptor, grupo B.

Na fig. 2 e na tabela 3, mostramos os efeitos provocados pelos sobrenadantes das culturas das biópsias aspirativas nas culturas linfocitárias mistas, combinações R/D e R/T, que evidenciam a presença de um factor solúvel supressor e específico para o dador, apenas nos sobrenadantes das culturas das biópsias aspirativas, feitas aos 7 dias pós-transplantação, no grupo A.

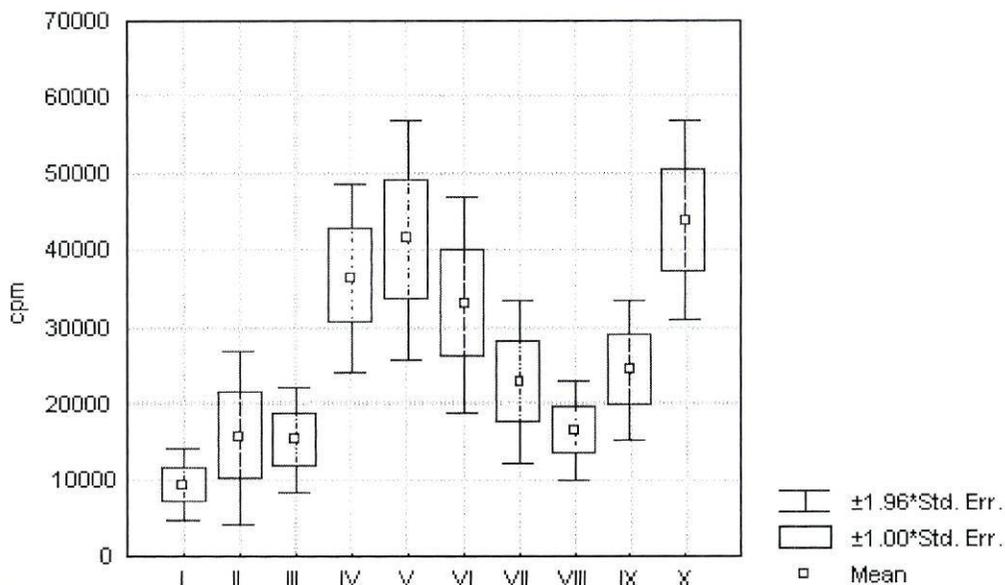


fig. 2: culturas linfocitárias mistas, combinações dador-receptor (I, II, III, VI, VII, VIII), e receptor-testemunho (IV, V, IX e X). Grupo A: livres de rejeição; grupo B: receptores que sofreram rejeição aguda. I: A, com sobrenadante da cultura da biópsia aspirativa do dia 7; II: B, com sobrenadante do dia 30; III: A, com meio de cultura, apenas; IV: A, com meio de cultura, apenas; V: A, com sobrenadante do dia 7; VI: B, com sobrenadante do dia da rejeição aguda; VII: B, com sobrenadante do dia 7; VIII: B, com meio de cultura apenas; IX: B, com meio de cultura, apenas; X: B, com sobrenadante do dia da rejeição aguda.

	R/D (a)		R/T(b)		
	dia 7	dia 30	dia de rejeição	dia 7	dia de rejeição
grupo A	0.63± 0.45	1.89± 1.45	ND (c)	1.44± 0.77	ND (c)
grupo B	1.62± 1.03	NF (d)	2.27± 0.92	NF	1.43± 0.8

tabela 3: resposta relativa (rr) da cultura linfocitária mista, no grupo A (receptores livres de rejeição) e no grupo B (receptores que sofreram rejeição aguda), suplementadas com sobrenadantes das culturas das biópsias aspirativas feitas, aos dias 7 e 30 e no início da rejeição, comparadas com culturas linfocitárias mistas feitas apenas com meio de cultura; (a): receptor/dador; (b): receptor/testemunho; (c): não disponível; (d): não feito.

No grupo A, encontramos uma diferença significativa, ao compararmos os efeitos dos sobrenadantes das punções aspirativas do dia 7 com as do dia 30 pós transplantação, $p = 0.0008$. No grupo B, não foi encontrada diferença, ao compararmos os efeitos dos sobrenadantes do dia 7 versus os causados pelos sobrenadantes das punções, feitas no início da rejeição, $p = 0.13$.

Ao compararmos os efeitos dos sobrenadantes das punções do dia 7, no grupo A versus o grupo B, $p = 0.017$ e entre dia 7, no grupo A, com dia de rejeição, no grupo B, $p < 0.0001$. Ainda, no grupo A, havia uma diferença significativa entre os efeitos causados pelo sobrenadante da punção do dia 7, entre os pares R/D e R/T, $p = 0.011$. Pelo contrário, não havia diferença significativa, ao compararmos os efeitos do sobrenadante da cultura da punção aspirativa do início da rejeição sobre os pares R/D versus R/T, $p = 0.27$.

O estudo citofluométrico das células dos dadores não revelou diferenças significativas, ao compararmos D dos dois grupos de receptores (dados não exibidos). Na tabela 4, mostramos a análise por citometria de fluxo dos linfócitos T circulantes dos dois grupos de receptores, antes da cultura mista linfocitária.

	CD3	DR	CD3DR	CD3CD 25	CD4CD45R A	CD45 RA	CD4CD 29	CD29
grupo A	85± 10.2	4.2 ± 1.7	2.15± 0.5	19.8± 12.2	24.8± 5.2	70.5± 7.6	24.7± 7.8	55.1± 13.8
grupo B	82± 9.6	4.8 ± 2.1	2.46± 0.7	9.25± 4.2	32.8± 9.2	68± 8.2	24.6± 4.8	47.2± 12.4
ANOVA	0.90	0.63	0.34	0.06	0.52	0.52	0.44	0.25

tabela 4: análise por citometria de fluxo dos linfócitos T circulantes, expressos em %, na altura das culturas mistas linfocitárias, feitas entre 6 e 12 meses pós-transplantação; grupo A: livres de rejeição; grupo B: receptores que sofreram episódio de rejeição. Kruskal-Wallis ANOVA comparando A versus B para cada fenótipo linfocitário.

Dado que intra-grupo havia várias diferenças entre os fenótipos de T, isto tornaria sem significado uma análise que tivesse em conta as variações absolutas dos fenótipos, no fim das culturas linfocitárias mistas. Para tornear este problema, optámos por calcular o quociente das percentagens de expressão dos vários fenótipos analisados no fim das culturas linfocitárias mistas sobre os resultados verificados nos T circulantes. Esta análise está apresentada na tabela 5, que evidencia a ausência de diferenças significativas para os quocientes de cada fenótipo, quer no grupo A quer no grupo B ou, ainda, ao compararmos A versus B.

	Grupo A		Grupo B	
	dia 7	dia 30	dia 7	dia de rejeição
CD3	0.91 ± 0.05	0.90 ± 0.06	0.89 ± 0.08	0.89 ± 0.08
DR	5.05 ± 2.86	4.3 ± 2.7	4.09 ± 2.26	4.94 ± 2.1
CD3DR	6.4 ± 3.1	4.9 ± 2.9	9.54 ± 6.4	5.5 ± 2.4
CD3CD25	7.67 ± 6.34	1.1 ± 0.2	1.86 ± 0.48	1.85 ± 0.57
CD4CD45RA	1.76 ± 0.5	1.84 ± 0.61	1.31 ± 0.08	1.17 ± 0.16
CD45RA	0.87 ± 0.07	0.9 ± 0.05	1.02 ± 0.06	0.9 ± 0.07
CD4CD29	2.85 ± 1.57	3.6 ± 2.9	0.89 ± 0.08	0.97 ± 0.11
CD29	1.5 ± 0.6	1.9 ± 0.87	0.89 ± 0.1	0.96 ± 0.13

tabela 5: análise citofluorométrica de linfócitos T, no fim das culturas linfocitárias mistas suplementadas com os sobrenadantes das culturas das biópsias aspirativas, dos dias 7 e 30, no grupo A (sem rejeição) e do dia 7 e início da rejeição, no grupo B (receptores que sofreram episódio de rejeição). Resultados, expressos como quocientes, entre os fenótipos observados no fim das culturas linfocitárias sobre os fenótipos de T circulantes. (Culturas linfocitárias mistas realizadas entre os 6 e 12 meses pós-transplantação).

Dos doentes do grupo A, seleccionámos, ao acaso, 13 receptores e do grupo B, 15 receptores, para o estudo dos factores de crescimento. Ainda, do grupo B, tínhamos sete amostras de punção aspirativa, feitas ao dia sete pós-transplantação (média de dez dias antes da crise de rejeição aguda). Os resultados observados na medição de IL-4sR α , IL-12, IL.13, GM-CSF, TGF- β 1 presentes nos sobrenadantes das culturas das punções aspirativas do dia 7, em ambos os grupos, assim como, os respeitantes às biópsias aspirativas, feitas no início da rejeição, estão apresentados na tabela 6.

Não encontrámos qualquer diferença significativa ao compararmos os dois grupos para cada factor de crescimento.

	IL-4sR α	IL-12	IL-13	TGF- β 1	GM-CSF
grupo A, dia7	8.4 \pm 4.5	73 \pm 26.5	5.0 \pm 5.0	798 \pm 150	16.4 \pm 6.6
grupo B, dia7	16.3 \pm 9.4	15.2 \pm 9.5	10.0 \pm 10.0	1121 \pm 229	10.0 \pm 10.0
grupo B, dia de rejeição	9.9 \pm 6.5	9.6 \pm 6.4	6.6 \pm 6.6	1206 \pm 198	8.8 \pm 6.6

tabela 6: IL-4sR α , IL-12, IL-13, TGF- β 1, e GM-CSF medidos em sobrenadantes de culturas de punções aspirativas, feitas nos dias 7, nos grupos A (sem rejeição) e B (receptores que sofreram rejeição aguda) e no início da crise de rejeição, no grupo B, expressos em pg/ml.

IL-4 e TGF- β 2 estavam ausentes dos sobrenadantes testados. IFN- γ estava presente em pequenas quantidades num sobrenadante do grupo A e em cinco do grupo B. Este pequeno número de amostras positivas para IFN- γ impediu qualquer análise estatística com significado.

Discussão

Os nossos resultados mostram que as culturas das punções aspirativas produzem um factor solúvel que tem a capacidade de inibir especificamente a resposta anti-dador, avaliada por cultura linfocitária mista, feita entre 6 a 12 meses pós-transplantação.

Esta inibição só era vista com sobrenadantes de culturas de biópsias aspirativas, feitas ao dia 7 pós-transplante, e em receptores que tinham permanecido livres de crise de rejeição aguda, durante pelo menos o primeiro ano pós-transplante renal. Pelo contrário, nos receptores que iriam desenvolver uma crise imunológica, alguns dias decorridos desde a punção aspirativa, feita ao dia 7 (média 10 dias), os sobrenadantes correspondentes continham um factor que estimulava a resposta anti-dador, não específico. O mesmo fenómeno de estimulação da resposta anti-dador foi

reproduzido pelos sobrenadantes das biópsias aspirativas, feitas no início clínico da rejeição aguda. (Nós especulamos que talvez seja a IL-2 o factor responsável).

Apesar de não termos feito a tipagem HLA para todos os testemunhos usados nas culturas linfocitárias mistas, as diferenças significativas observadas entre os pares R/D versus R/T, em ambos os grupos A e B, assegura-nos que D e T eram diferentes no que respeita a HLA.

A diferença verificada entre os efeitos dos sobrenadantes das biópsias, feitas ao dia 7 versus as do dia 30 pós-transplante, no grupo A, pode ter várias explicações.

Há duas diferenças fundamentais quando se compara uma biópsia aspirativa do dia 7 com uma, do dia 30, num receptor de aloenxerto renal estável e com boa função. Linfócitos diminuem apreciavelmente de número, entre o dia 7 e dia 30. Monócitos-macrófagos também são menos, de tal modo que, ao dia 30, uma amostra aspirada do aloenxerto contém essencialmente células parenquimatosas renais. Assim, somos levados a pensar que, sejam os linfócitos ou os monócitos-macrófagos, as células responsáveis pela síntese do factor supressor. O número de ambos diminuído ao dia 30 faria com que o putativo factor fosse libertado em quantidade demasiado pequena, para ser possível a observação do seu efeito. Realmente, outros autores relataram que um factor solúvel, produzido por uma linha de T supressores, era absorvido por linfócitos, perdendo o seu efeito com diluições crescentes (Emara e Sanfilippo, 1989), tornando-se ineficaz a concentração de 1/20; talvez os nossos achados reflectam o mesmo fenómeno, apesar do factor, que esses autores descreveram, não ser restrito por HLA.

É muito interessante que num modelo animal de transplantação de fígado, um factor imunossupressor fosse observado no soro do animal transplantado, ao dia 7 pós-cirurgia, mas já não estivesse presente ao dia 30 (Goto e col., 1996). Também num modelo de transplante renal no rato, o soro do animal de experiência possuía actividade supressora da resposta ao dador, com diminuição da actividade, ao dia 14 pós-cirurgia (Takeuchi e col., 1995). Embora as culturas das biópsias aspirativas tivessem sido feitas com soro autólogo, como meio macromolecular a 10% de concentração, nós não pensamos que este facto pudesse ter influenciado os nossos resultados. Se um factor supressor semelhante estivesse presente no soro autólogo, a sua concentração na cultura linfocitária mista seria da ordem de 1/20 e, ainda, teria

sido necessário que este factor não tivesse sido previamente absorvido pelas células em cultura durante 48 horas.

Não podemos ter a certeza qual o tipo de célula responsável pela libertação do factor imunossupressor, mas investigações feitas por outros favoreceriam a imputação de linfócitos T (Emara e Sanfilippo, 1989; Hutchinson, 1986; Frankel e col., 1989). Dito isto, não somos de opinião que monócitos-macrófagos possam ser excluídos ab initio. A ciclosporina A tem efeitos profundos nos monócitos-macrófagos (Whisler e col., 1985; Benson e Ziegler, 1989; Palay e col., 1986). Embora os dados reunidos sugiram que CsA não tenha a propriedade de inibir a apresentação de antigéneo por macrófagos (Benson e Ziegler, 1989), outros trabalhos apontaram para a capacidade de CsA inibir essa apresentação (Palay e col., 1986). CsA tem a capacidade de inibir a indução de linfócitos T citotóxicos, um processo de diferenciação dependente dos macrófagos (Benson e Ziegler, 1989). Além disso, CsA reduz a capacidade dos macrófagos em promover as culturas linfocitárias mistas, ao mesmo tempo que provoca a diminuição da expressão de HLA-DR por macrófagos (Whisler e col., 1985). Dado que CsA perturba de forma directa a camada dupla lipídica da membrana macrofágica (Whisler e col., 1985), isto poderia interferir com a capacidade dos monócitos-macrófagos em fornecer sinais coestimulatórios, levando assim os linfócitos T a um estado de anergia, efeito mediado por um factor supressor que poderá estar presente nos sobrenadantes estudados.

É de realçar que os níveis de CsA não diferiam de forma significativa entre os dois grupos de receptores analisados; contudo os receptores poderiam ser diferentes, no que respeita à sensibilidade aos efeitos imunossupressores de CsA.

Alternativamente poderíamos especular que as células parenquimatosas renais poderiam ser responsáveis pela inactivação funcional das células T, tal como o grupo de Singer descreveu (Singer e col., 1993), assim como outros autores (Hagerty e Allen, 1992). Nesta eventualidade, as células renais necessitariam de um número crítico de linfócitos ou monócitos-macrófagos, de modo a produzirem ou induzirem a síntese de uma quantidade relevante do factor supressor, condições que as amostras das punções aspirativas do dia 30 pós-transplante provavelmente não preencheriam.

Avaliámos os sobrenadantes das culturas das biópsias aspirativas para o seu conteúdo em IL-4, IL-4sR α , IL-12, IL-13, IFN- γ , GM-CSF, TGF- β 1 e TGF- β 2.

Contudo, não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos, A e B, para qualquer factor de crescimento.

TGF- β 1 tem sido descrito como capaz de inibir a respostas aloimunes (Kekow e col., 1991; Wahl e col., 1993). A sua concentração na circulação periférica está aumentada, assim como na urina dos transplantados renais (Coupes e col., 1994). Por outro lado, TGF- β 1 aumenta a expressão de CD14⁺CD16⁺, um marcador de tipo pró-inflamatório dos monócitos-macrófagos (Ziegler-Heitbrock, 1996), e mostra actividade sinérgica com IL-2, na promoção da sobrevida e expansão de células efectoras (Zhang e col., 1995).

Outros autores relataram um prolongamento da sobrevida de transplante renal por TGF- β 2 (Thompson e col., 1996), sendo este o principal motivo da avaliação deste factor. Contudo, os sobrenadantes das culturas das biópsias aspirativas não continham TGF- β 2 em quantidade mensurável.

Avaliámos IL-4, que tem sido associada a aceitação e tolerância a aloenxerto (Strom e col., 1996), IL-4sR α , que pode ser libertada por monócitos-macrófagos em resposta a estímulos que promovam a activação de T com síntese de IL-4 (Renz e col., 1991) e, ainda, IL-13, que está dotada com propriedades imunossupressoras, incluindo a estimulação da síntese de IL-1ra (Muzio e col., 1994). No entanto, a análise destas citocinas não se mostrou útil. CsA e, especialmente, FK506 inibem fortemente a produção de IL-4 (Wang e col., 1993), o que nos leva a pensar que este dado sugere que IL-4 talvez não desempenhe um papel relevante na modulação da resposta aloimune, na transplantação renal, no homem.

IL-12 e IFN- γ são conhecidos pela sua capacidade em activar os linfócitos T, levando à maturação de Th1 (Nickerson e col., 1994), associado à rejeição de aloenxerto. Contudo, a análise de mRNA de IL-12, nas biópsias aspirativas, em receptores de transplante renal, não permitiu a distinção entre receptores estáveis e aqueles com processos de rejeição aguda (Zuo e col., 1995). A síntese de IL-12 foi superior, se bem que de forma não significativa, pelas culturas da punção aspirativa realizada aos 7 dias. Interessantemente, IL-12 estimula a produção de IL-10 (Finkelman, 1995), o que está de acordo com a avaliação desta última citocina descrita no cap. V. IFN- γ estava ausente da maior parte das amostras estudadas. Especulamos que os resultados talvez pudessem ter sido diferentes, se os sobrenadantes tivessem

sido recolhidos com mais tempo de incubação, dado que Danzer e col. relataram que os valores de IFN- γ atingem o pico aos seis dias de cultura (Danzer e col., 1994).

Outros autores estudaram um modelo de transplante hepático no rato e puseram como hipótese que a tolerância ao aloenxerto possa estar, pelo menos, em parte, ligada à libertação do aloenxerto, de células dendríticas anergizantes de linfócitos T, sob a influência de GM-CSF (Fu e col., 1996). Realmente, os sobrenadantes das culturas das punções aspirativas, feitas ao dia 7 pós-cirurgia, no grupo A, continham uma quantidade de GM-CSF maior que os sobrenadantes das biópsias, feitas ao dia 7 ou no início de rejeição, no grupo B, mas a diferença não atingiu níveis de significância.

Interessante o relato de Emara e Sanfilippo sobre uma linha T supressora induzida por células autólogas infiltrantes no aloenxerto, com actividade não inibida por adição de IL-1 ou IL-2 (Emara e Sanfilippo, 1989).

O estudo citofluorométrico dos linfócitos T, no fim das CML, não revelou qualquer diferença significativa entre as culturas inibidas e aquelas estimuladas pela adição dos sobrenadantes, mesmo analisando marcadores de activação e os fenótipos CD4CD45RA e CD4CD29. Especulamos que isto talvez reflecta um estado de anergia dos linfócitos T das culturas inibidas. Realmente, a maior parte dos sinais na superfície de linfócitos T anérgicos, não diferem dos observados nos T estimulados (Schwartz, 1990). O linfócito T anérgico, quando é estimulado por uma baixa concentração de antigéneo, é deficiente, principalmente, na sua capacidade em proliferar, mas ainda assim, é capaz de produzir pequenas quantidades de citocinas (Schwartz, 1990). Outros autores relataram que células T, reactivas a antigéneo, não proliferam, nem sintetizam IL-2, mas expressam o receptor de IL-2 na sua superfície, após estimulação pelo toleragénico (Alard e col., 1993). Além disso, T dos receptores exibiram um aumento do tamanho celular e uma aquisição similar de CD25, após estimulação por células do dador ou de testemunhos, em contraste com a hiporresposta específica para a estimulação pelas células do dador (Dallman e col., 1991).

Não podemos ter a certeza se caso tivéssemos analisado a expressão de parte do receptor para IL-2 de alta afinidade, não teríamos encontrado uma diferença entre os dois grupos estudados, na linha do que Dallman e col. sugeriram.

A presença de hiporresposta significativa anti-dador, no grupo A, não foi observada nos receptores do grupo B. Embora consideremos que seja prematuro tirar conclusões firmes deste achado, sugerimos que a terapêutica imunossupressora administrada a estes receptores respondedores deverá, provavelmente, seguir um protocolo diferente, no longo curso, do que aquela a ministrar a receptores que exibem hiporresposta ao dador.

Em resumo, descrevemos a produção dum factor solúvel, supressor, específico para a cultura linfocitária mista dador/receptor pela cultura de biópsia aspirativa, feita ao dia 7 pós-transplantação, em receptores livres de rejeição aguda, durante o primeiro ano pós-cirurgia. Pelo contrário, nos receptores que iriam desenvolver uma crise de rejeição, 10 dias mais tarde, as culturas das biópsias aspirativas, feitas também ao dia 7 pós-transplantação, não produziram factor supressor, mas, sim, um factor estimulador, não específico, da resposta ao dador. O mesmo fenómeno de estimulação inespecífica foi observado com os sobrenadantes das culturas da punção aspirativa feita no início clínico da crise imunológica.

Embora não tenhamos sido capazes de identificar esse factor, nem a sua origem, e a pequena quantidade das amostras disponíveis impedisse outros testes, a segurança e desconforto menor consequente à realização da biópsia aspirativa poderão permitir o seu uso mais alargado, de modo a conseguirmos, no futuro, tal desiderato.

VIII- Conclusões e Discussão Geral

Conclusões

Os resultados das investigações forneceram, como mais relevantes, as seguintes conclusões:

- é possível estabelecer cultura celular a partir de células obtidas por punção aspirativa de transplantes renais (cap. II);

- a capacidade de proliferação das células das amostras da biópsia aspirativa diferencia receptores de transplante renal estáveis dos que sofrem de rejeição aguda (cap. II);

- há diferenças significativas entre vários fenótipos de linfócitos T, ao compararmos as populações no sangue periférico versus aquelas, presentes intra-enxerto, quer nos receptores estáveis, quer nos que sofrem rejeição aguda (cap.III);

- não é significativa a diferença entre as populações de linfócitos T, ao compararmos receptores estáveis com receptores com rejeição aguda, no que respeita ao sangue periférico (cap.III);

- a mesma análise comparativa, respeitante às amostras da punção aspirativa, revelou várias diferenças significativas em vários fenótipos de T (cap.III);

- conseguimos obter bons valores de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de rejeição aguda, com análise conjunta de alguns fenótipos presentes nos aspirados e ainda dos quocientes entre fenótipos nos aspirados sobre o sangue periférico (cap.III);

- o estudo citofluorométrico de receptores com rejeição crónica mostrou que os subtipos de linfócitos T, presentes no sangue periférico, não são diferentes dos receptores com rejeição aguda (cap.III);

- observámos várias diferenças nos fenótipos de T, ao compararmos as subpopulações no sangue periférico dos receptores estáveis versus aquelas encontradas nos receptores com rejeição crónica (cap.III);

- não registámos diferenças significativas na análise comparativa de linfócitos T intra-enxerto nos receptores com rejeição aguda versus aqueles com rejeição crónica (cap. III);

- observámos várias diferenças no estudo por citometria de fluxo das subpopulações de T, presentes nas punções aspirativas, ao comprarmos receptores estáveis com aqueles com processo de rejeição crónica (cap.III);

- a nova formulação de ciclosporina A, que tem diferentes propriedades farmacocinéticas, acompanha-se de alterações significativas em vários subtipos de T, estudados no sangue periférico e nas punções aspirativas de receptores estáveis, durante o primeiro mês pós-transplantação renal; estas alterações sugerem que a nova formulação de ciclosporina A está dotada de maior capacidade imunossupressora (cap. IV).

- as culturas de biópsia aspirativa têm a capacidade de sintetizar várias citocinas e quemocinas, sem serem estimuladas *in vitro* (caps.V, VI, VII);

- as culturas da biópsia aspirativa de receptores livres de rejeição mostram uma produção de citocinas, tipo Th0/Th2 (cap.V);

- os receptores que vão sofrer uma crise de rejeição aguda mostram uma produção de citocinas, tipo Th1, ao 7º dia pós-transplantação, vários dias antes do início clínico de rejeição aguda (cap. V);

- os receptores com rejeição aguda mostram uma produção de citocinas, tipo Th1 (cap.V);

-as crises de rejeição clinicamente mais graves associam-se a quantidade de IL-2 significativamente superior nos sobrenadantes das culturas da biópsia aspirativa, comparadas com as rejeições agudas corticossensíveis (cap. V);

- os receptores com rejeição crónica mostram uma produção de citocinas, tipo Th2 (cap.V).

- a avaliação da síntese de IL-2, nas culturas da biópsia aspirativa, é muito útil, no diagnóstico e, mesmo, na previsão de futuro episódio de rejeição aguda (cap.V);

- a presença de monócitos-macrófagos nas punções aspirativas não permite o destrinçar de receptores estáveis daqueles com rejeição aguda, devendo, assim, a classificação de P. Hayry ser objecto de modificação (cap. VI);

- monócitos-macrófagos estão presentes em número significativamente elevado nas crises de rejeição aguda vascular/resistentes a corticoterapia, se tivermos em conta a relação células parenquimatosas renais sobre monócitos-macrófagos (cap. VI);

- o estudo das quemocinas não permitiu a diferenciação entre receptores estáveis e receptores que vão sofrer uma crise imunológica, alguns dias depois da punção aspirativa feita aos 7 dias pós-transplantação (cap.VI);

- IL-6 pode associar-se a actividade pró-inflamatória e anti-inflamatória (cap.VI);

- IL-1ra está significativamente mais elevada nos receptores que vão permanecer livres de crises imunológicas; as células responsáveis pela síntese de IL-1ra são, muito provavelmente, os monócitos-macrófagos (cap.VI);

- MIP-1 α e M-CSF estão significativamente mais elevados nos sobrenadantes das culturas das biópsias aspirativas de receptores com rejeição crónica, comparados com aqueles com rejeição aguda (cap.VI);

- os receptores que permanecem livres de rejeição não exibem hiporresposta inespecífica, comparados com aqueles que desenvolveram crises de rejeição aguda (cap.VII);

- os receptores que permaneceram livres de rejeição aguda, durante o primeiro ano pós-transplantação, desenvolvem uma hiporresposta selectiva para o dador, estudada entre 6 e 12 meses pós-cirurgia, o que não acontece com receptores que sofreram episódio de rejeição aguda (cap.VII);

- sobrenadantes das culturas da biópsia aspirativa de doentes livres de rejeição aguda produzem um factor solúvel, supressor e específico da resposta anti-dador, estudada por cultura linfocitária mista (cap.VII);

- pelo contrário, sobrenadantes provenientes de receptores com rejeição aguda podem estimular, de forma inespecífica, a resposta anti-dador (cap.VII);

- a análise de factores de crescimento, apontados como potenciais inibidores da resposta imune nestes sobrenadantes das culturas, excluiu-os como responsáveis da inibição da resposta anti-dador, com excepção de IL-10 e IL-1ra (caps.V, VI, VII);

- o estudo citofluorométrico de linfócitos T, recolhidos no fim das culturas linfocitárias mistas, comparando culturas que foram estimuladas pelos sobrenadantes com aquelas que foram inibidas, não mostrou diferenças significativas para os marcadores de activação clássicos, o que permite classificar os linfócitos T das culturas inibidas como anérgicos (cap.VII).

Discussão geral

Apesar da transplantação renal poder ser considerada uma história bem sucedida, proporcionando uma melhor sobrevida que outras terapêuticas substitutivas renais (Schwab e Paul, 1996), além duma melhor qualidade de vida (Kutner e col., 1986) e com custos financeiros inferiores que as outras formas de tratamento dos doentes renais crónicos, ainda bastante pouco se sabe sobre os mecanismos imunológicos subjacentes à aceitação e rejeição do órgão transplantado.

Tal como em muitos casos de doenças autoimunes, em que a informação obtida do sangue periférico não assume importância determinante na orientação terapêutica, no transplante renal, ainda não foi possível descortinar uma forma de avaliação consistente e fiável da interacção aloenxerto-receptor, recorrendo à escassa informação originária do sangue periférico (Strom e Carpenter, 1983; Schuurman e col., 1989; Thompson e col., 1985).

A biópsia renal clássica continua a ser o exame padrão para o estudo do transplante renal. Apesar das melhorias introduzidas, como o controlo ecográfico e a pistola automática, a morbilidade não é desprezível (Wilczek, 1990), impedindo, por razões éticas e bom senso, o seu uso repetido para fins investigacionais. A fiabilidade diagnóstica é bastante boa, atingindo 89% num estudo recente (Cohen e col., 1991). No entanto, a biópsia clássica tem mostrado que pode haver infiltração do aloenxerto renal por mononucleares apesar do receptor gozar duma estabilidade funcionante do rim transplantado (Rush e col., 1995; Gaber e col., 1996).

Em modelos animais, outros autores já tinham observado a presença de linfócitos T citotóxicos precursores, mesmo com actividade citotóxica, em rins transplantados com boa função (Heelan e col., 1996). O mesmo fenómeno foi descrito na transplantação humana cardíaca (van Emmerik e col., 1996) e no transplante hepático (Dousset e col., 1993).

Há ainda vários pontos escuros na compreensão da cascata imunológica na transplantação de órgãos. Os locais de estudo dependerão conforme se teoriza o início da resposta anti-dador.

Se considerarmos que a apresentação de antígeno é sempre indirecta, então apenas os órgãos linfóides periféricos ou centrais poderiam fornecer, muito

provavelmente, informação relevante. No entanto, há evidência que tal não acontece e a apresentação de antigéneo, nos transplantes, em geral, e no rim, em particular, pode assumir as duas formas, directa e indirecta (Hadley e col., 1992; Rubin-Kelley e Jevnikar, 1991; Ong e Fine, 1994). Além disso, alguns estudos recentes têm sugerido que durante a fase inicial pós-transplantação a apresentação directa assume o papel mais relevante (van Twuyver e col., 1996), que é mais resistente à acção de ciclosporina A.

O nosso estudo, que abrangeu quase sempre o primeiro mês pós-transplantação, com excepção dos receptores com rejeição crónica, parte deste reconhecimento. Este pressuposto constitui o núcleo da base científica que nos moveu. Na verdade, a apresentação directa engendra outra possível consequência. As células apresentadoras de antigéneo, no modo indirecto, serão necessariamente linfócitos B, linfócitos T activados, monócitos-macrófagos e células dendríticas, todas do receptor. No caso da apresentação directa, o leque possível de células empenhadas nessa função poderá alargar-se, com implicações importantíssimas. Particularmente, as células do órgão transplantado poderiam assumir também esse papel, nomeadamente as células endoteliais e as células tubulares renais. Há evidência que assim pode acontecer (Rubin-Kelley e Jevnikar, 1991; Ong e Fine, 1994; Faull e Russ, 1990; Kirby e col., 1993; Hagerty e Allen, 1992).

Num interessante estudo feito pelo grupo de Kirby, estes autores estimularam as células tubulares renais humanas por IFN- γ e TNF- α e observaram um aumento da expressão de moléculas de adesão, LFA-3 e ICAM-1, com aumento da capacidade das células tubulares em ligar a células mononucleares alogénicas (Kirby e col., 1993). Mais interessante, coculturas destas células tubulares irradiadas com mononucleares alogénicos promovem uma proliferação linfocitária, se IL-2 for adicionada a 25 U/ml. Em estudos animais, esta capacidade das células tubulares renais também foi encontrada (Hagerty e Allen, 1992). Realmente, muitas das funções fisiológicas da célula tubular renal apresentam semelhanças com as tarefas das células apresentadoras de antigéneo. Uma das funções das células tubulares consiste na reabsorção e catabolização das proteínas filtradas (Wuthrich e col., 1990). Este processamento pode ser inibido por agentes como a cloroquina e o cloreto de amónia, que também são capazes de inibir o processamento e a apresentação de antigéneo pelas células

apresentadoras de antigéneo (Hagerty e Allen, 1992). Além disso, as células tubulares renais proximais são um dos poucos exemplos de células epiteliais conhecidas, que exprimem a classe II do sistema major de histocompatibilidade, importante na apresentação de antigéneo; as outras células são o epitélio intestinal (Bland, 1988) e o timo (Unanue e Allen, 1986). Por outro lado, as células tubulares renais poderão também desempenhar um papel perfeitamente oposto.

Singer (Singer e col, 1993) incubou células tubulares, estimuladas por IFN- γ , com antigéneo em cocultura com clone de linfócitos, reactivo ao antigéneo, durante 12 horas. No fim da incubação, recolheu os linfócitos e deixou-os em repouso, durante dois dias, em meio de cultura, seguido de reestimulação com esplenócitos e antigéneo. No fim desta segunda incubação, não houve proliferação dos linfócitos, que permaneceram viáveis, dado que respondiam a IL-2 exógena. Este elegante trabalho documenta ainda que a anergia induzida no clone linfocitário não podia ser explicado por ausência de B7 nas células renais, já que os esplenócitos foram incapazes de promover a resposta linfocitária. Embora seja conhecida a deficiência das células tubulares renais em B7, que pertencendo ao complexo B7-CD28, tem sido apontada como uma das moléculas do 2º sinal de activação linfocitária mais importante (Wilson e col., 1995; Pearson e col., 1994), as células tubulares são capazes de exprimirem, na sua superfície, várias moléculas que participam na activação linfocitária, de que destacamos a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e CD40 (Stout e Suttles, 1996).

Por outro lado, as células renais têm a capacidade de produzir uma enorme variedade de factores de crescimento celular (Rubin-Kelley e Jevnikar, 1991; Ong e Fine, 1994) com todo o cortejo de influências sobre a dinâmica das células imunocompetentes. Voltaremos mais adiante a este assunto.

Assim, uma quantidade importante de dados têm afastado o clássico conceito em que as células parenquimatosas renais eram classificadas como vítimas mais ou menos passivas da resposta aloimune. Da conjugação destes dois pressupostos, a importância da apresentação directa de antigéneo e o papel activo, eventualmente assumido pelas células do aloenxerto, resultaria inevitavelmente que um estudo da dinâmica das células infiltrantes nos aloenxertos renais teria a potencialidade de trazer informação interessante sobre a cascata de activação da resposta aloimune.

A resposta ao aloenxerto é efectuada pelas células imunocompetentes. Esta afirmação contém, no entanto, uma conotação mais lata do que, por vezes, é inferido. É clássico pensar em linfócitos, T e/ou B, mas também aqui seria necessário alargar o conceito. De facto, células imunocompetentes, no que respeita ao transplante renal, serão, pelo menos, os neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos, pelo menos. No nosso trabalho, fomos obrigados a deixar de lado os neutrófilos, por razões técnicas (são células muito difíceis de cultivar apropriadamente). Temos de reconhecer que o seu papel tem sido negligenciado (Lloyd e Oppenheim, 1992). Alguns estudos têm mostrado que a infiltração do aloenxerto renal por polimorfonucleares, especialmente se intraglomerulares ou peritubulares, constitui um anúncio de crise imunológica iminente (Gaber e col., 1992).

Os eosinófilos têm sido apontados como potenciais indicadores de maior gravidade da crise de rejeição aguda (Hongwei e col., 1994). Como estas células estão presentes em número escasso, mesmo durante a rejeição, torna-se muito difícil proceder ao seu estudo isolado.

Deste modo, o nosso estudo teve que centrar-se na avaliação de linfócitos e monócitos-macrófagos. Dentro dos linfócitos, excluimos a investigação sobre linfócitos B, células que estão associadas a mecanismos humorais imunes, que parecem só ser importantes num número limitado de rejeições. Mesmo nas crises de rejeição acelerada, onde anticorpos poderão jogar um papel importante, deverá haver uma forte componente desempenhada por células T, tendo em conta alguns bons resultados conseguidos com a administração de anticorpo monoclonal anti-timócitos (Abramowicz e col., 1992). Definimos assim o alcance do nosso estudo, restringindo-o à avaliação de linfócitos T e monócitos-macrófagos infiltrantes no aloenxerto renal.

Elegemos como método de obtenção destes mononucleares a biópsia aspirativa com agulha fina. Não nos demoraremos sobre as virtudes deste exame, que já apontámos no capítulo I.

Quando iniciámos este trabalho não tínhamos a certeza de que seria possível proceder a culturas de biópsia aspirativa, dado que na literatura não havia relatos sobre esta experiência. Assim, considerámos como primeiro achado importante termos documentado que tal é possível, o que poderá abrir uma nova via para estudo na

transplantação renal. Há que reconhecer que outros autores iniciaram investigações algo similares às nossas no transplante cardíaco e pulmonar, recorrendo a amostras obtidas por biópsia endomiocárdica e lavados broncoalveolares (Weber e col., 1989; Kaufman e col., 1989; Zeevi e col., 1985; Fung e col., 1985). As nossas observações são, no entanto, mais consistentes que nos outros tipos de transplantes.

Os resultados que apresentámos no capítulo II mostraram que a capacidade de proliferação das células da biópsia aspirativa diferem significativamente entre doentes transplantados livres de rejeição e aqueles, com rejeição aguda. Em parte, este achado relevante poderia ser teoricamente esperado, mas algumas dúvidas se levantavam antes do nosso trabalho. Pensávamos que a distinção entre estas duas situações clínicas pudesse ser mais difícil por duas razões principais:

1- nos primeiros dias pós-transplantação poderia ser observada uma proliferação celular importante motivada por regeneração tubular, pós-lesão de isquemia-reperusão do aloenxerto, proliferação que poderia envolver quer as células tubulares, quer os monócitos-macrófagos (Wenzel e Abboud, 1995).

2- nalgumas crises de rejeição, a detecção clínica poderia coincidir com o início da fase de síntese de citocinas/quemocinas e outros mediadores de agressão celular, tendo já sido ultrapassado o período de divisão celular.

Curiosamente, a hipótese do ponto 1 foi parcialmente confirmada nos receptores estáveis, estudados aos 14 dias pós-transplante, onde observámos uma proliferação superior, atingindo quase uma diferença significativa, ao compararmos o subgrupo com creatinemia superior a 2.0mg/dl versus o outro subgrupo, com creatinemia inferior ou igual a 2.0mg/dl, mas, inesperadamente, este comportamento não foi reproduzido nos outros tempos de estudo pós-transplante.

Alguns dos falsos negativos observados deverão ter como uma das causas principais o ponto 2, embora na maior parte dos casos, supomos que os falsos negativos derivem de acaso do sítio de aspiração.

Creemos, contudo, que a hipótese, no ponto 2, poderá explicar a ausência de diferença significativa, ao compararmos receptores com rejeição aguda corticossensível versus rejeição corticorresistente ou irreversível. Nestes últimos, especulamos que as células imunocompetentes poderão estar numa fase de citotoxicidade, após terem passado por um ciclo de divisão celular.

Tendo em conta que as categorias celulares presentes numa cultura de punção aspirativa abrangem essencialmente as células parenquimatosas renais, os neutrófilos, os linfócitos e os monócitos-macrófagos, algumas interrogações poderão ser levantadas sobre qual ou quais os tipos celulares responsáveis pelas respostas proliferativas observadas. As células renais podem proliferar e fá-lo-ão nas situações de pós-necrose tubular aguda e rejeição aguda. Não existem dados relevantes sobre a cinética destas células, mas o que se sabe apontaria para um tempo de duplicação mais prolongado que o das células mononucleares imunocompetentes. Realmente, só muito ocasionalmente, observámos figuras mitóticas interessando as células renais nas nossas culturas. De qualquer modo, na hipótese destas células serem principais responsáveis pelos valores de proliferação medidos, então seria de esperar uma diferença significativa entre as culturas de biópsia aspirativa, feita aos 7 dias pós-transplantação, nos doentes em recuperação de necrose tubular aguda. Não observámos este tipo de comportamento (cap.II). Como comentário lateral, queremos realçar que o meio de cultura usado não está indicado para o crescimento de células epiteliais ou endoteliais.

Os neutrófilos são células em processo de morte celular nas nossas culturas e portanto também não poderão ser implicados nos nossos resultados.

Os monócitos-macrófagos estão presentes em quantidades significativas, mas variáveis nas punções aspirativas (cap.VI). Ao contrário do que inicialmente se pensava, monócitos-macrófagos são capazes de proliferar de forma muito importante (Gaber e col., 1992) e, mesmo nalgumas crises de rejeição aguda, parecem constituir o tipo celular com maior proliferação. Com a quantificação destas células, após coloração por método fosfatase alcalina-anti-fosfatase alcalina, documentámos que, em número absoluto, estão presentes em menor quantidade nas rejeições agudas corticossensíveis que aos 7 dias, nos doentes sem rejeição aguda, mas com disfunção do aloenxerto causada, por necrose tubular aguda (cap.VI). Esta observação está em contradição com a hipótese destas células serem responsáveis importantes pelas proliferações observadas. O mesmo se pode inferir pela quantidade, significativamente superior, de monócitos-macrófagos nas rejeições agudas corticorresistentes/irreversíveis, comparadas com as rejeições corticossensíveis, apesar

das proliferações não diferirem de forma significativa, ao compararmos estes dois tipos de rejeição aguda.

Deste modo, podemos concluir com segurança que as respostas proliferativas observadas dependeram fundamentalmente da diferente cinética linfocitária nas várias situações.

Outro ponto que nos mereceu alguma reflexão, antes do trabalho, foi a escolha do meio macromolecular para a cultura da biópsia aspirativa. Das três escolhas possíveis, soro vitelino fetal, soro AB e soro autólogo, optámos por este último.

As razões fundamentais que levaram à exclusão do soro vitelino fetal foram duas:

- primeiro, à data, muito pouco ou, melhor, quase nada se sabia sobre a encefalopatia espongiforme. Assim, por razões de segurança e para evitar alterações não controladas sobre as culturas, foi abandonado;

- segundo, o soro vitelino fetal contém quantidades apreciáveis de TGF- β que possui imunoreactividade cruzada com TGF- β humano. Como estava dentro dos nossos planos medir TGF- β nas culturas da punção aspirativa, foi abandonado.

Considerámos o uso de soro AB. No entanto, pensámos que era importante tentar reproduzir o mais aproximadamente possível as condições *in vivo* e, para isso, era necessário usar o soro autólogo, de modo que o efeito das drogas imunossupressoras administradas não fosse descartado. Interessantemente, não observámos qualquer correlação significativa entre os níveis de ciclosporinemia e as proliferações celulares (cap.II).

A dose de IL-2 usada nas culturas foi também objecto de reflexão. Primeiro, verificámos que os resultados das proliferações não eram significativamente diferentes nas culturas que receberam 10U/ml de rIL-2 versus aquelas que receberam 20U/ml (dados não apresentados).

È sabido que doses muito reduzidas de IL-2 promovem proliferação linfocitária insuficiente, o que não acontece com doses elevadas que, inclusive, podem induzir a proliferação de células linfóides não T, como as células assassinas activadas por linfocinas (Grimm e col., 1983). Vários autores usam doses de rIL-2, compreendidas entre 30 e 50U/ml, para culturas de células infiltrantes nos aloenxertos cardíacos, hepáticos, pulmonares e intestinais (Duquesnoy e col., 1991). cremos que

as doses utilizadas no nosso trabalho satisfazem os dois requisitos que tínhamos imposto: por um lado, testar a resposta das células em cultura à IL-2 administrada e, ao mesmo tempo, não interferir com o doseamento posterior de IL-2 nos sobrenadantes das culturas.

De facto, verificámos uma diferença significativa nas respostas à IL-2, entre os receptores livres de rejeição aguda e aqueles com rejeição (cap.II). Também no grupo de receptores com rejeição aguda, a resposta à IL-2 era superior, nos casos de rejeição corticorresistente/irreversível versus a rejeição corticosensível (cap.II). Supomos que este dado reflecte uma menor eficácia da ciclosporina A em bloquear a via de activação linfocitária dependente de IL-2, nos doentes com rejeição mais grave. Pensamos que a diferença entre poços de cultura sem IL-2 versus poços com suplemento de IL-2, poderia ter atingido o nível de significância, caso tivéssemos usado uma maior dose de IL-2, já que as culturas dos receptores com rejeição aguda produziram quantidades muito superiores de IL-2 que os receptores livres de rejeição (cap.V). Deste modo é previsível que a dose usada fosse insuficiente para promover uma resposta proliferativa significativamente superior num ambiente já rico em IL-2.

Por outro lado, a quase ausência de resposta à IL-2 adicionada, nos doentes livres de rejeição, em que os quocientes das proliferações de poços com IL-2 adicionada sobre poços sem IL-2 adicionada oscilaram entre 1.14 e 1.37 (média), nos três períodos de avaliação pós-transplantação, é mais relevante depois de termos avaliado a produção de IL-2 por estas culturas, que quase sem excepções era muito pequena (cap.V). Daqui se pode inferir que as células T não possuíam receptores para IL-2 em número suficiente, como se demonstrou no cap.III ou, então, eram inibidas de responder a IL-2, nos casos em que o receptor de IL-2 estava expresso em quantidade relevante na superfície celular (anergia).

Pensamos ainda que é possível retirar mais dados deste teste de proliferação celular com curvas de dose-resposta para IL-2 adicionada, que concretizaremos no futuro.

O motivo que nos forçou a pôr de parte essa investigação tem a ver com a escassa quantidade de células obtidas por punção aspirativa, que dado a multitude de estudos que fizemos, nos impedia de usar toda a amostra em curvas de titulação para IL-2.

Uma das limitações das culturas da biópsia aspirativa, no diagnóstico pós-transplante renal, prende-se com o intervalo de tempo necessário para a conclusão do teste, cerca de 60 horas. Ao reduzirmos o tempo de incubação para 24 horas, 12 das quais com timidina radioactiva, não observámos diferenças entre os doentes livres de rejeição e aqueles com rejeição aguda. Assim, não reproduzimos os achados de Kirk (Kirk e col., 1992), que observou diferenças significativas na proliferação de linfócitos de biópsias clássicas de receptores com rejeição aguda, apenas com 24 horas de incubação. Pensamos que a explicação para estes achados diferentes poderá residir no número de células em cultura. Kirk e col. procederam à incubação de fragmentos de biópsia com 1 mm de comprimento, em poços de 2 ml de volume. Por outro lado, a avaliação da proliferação foi feita de forma muito diferente, por visualização à microscopia de fase inversa. Além disso, o número de casos sem rejeição aguda era muito pequeno, a maior parte com toxicidade por ciclosporina A que, obviamente, não poderá ser aceite como um bom grupo de controlo. Ainda, no grupo de receptores com rejeição, 17/55 não exibiram proliferação linfocitária, implicando uma sensibilidade no diagnóstico muito inferior à conseguida com o nosso método (cap.II). Curiosamente, Kirk também não encontrou uma influência de ciclosporina A na resposta proliferativa (Kirk e col., 1992).

Queremos realçar que os nossos resultados sugerem que durante a cultura processa-se apresentação de antigéneo, que provavelmente necessitará de um tempo mínimo de contacto intercelular, de forma a poder iniciar-se a resposta anti-dador. (Os resultados de Kirk e col. não põem de forma alguma este conceito em causa; pelo contrário, até podem reforçá-lo, na medida em que será razoável teorizar que este contacto será mais intenso e imediato em culturas a mais alta densidade celular).

Foi decepcionante a incapacidade de prever um episódio de rejeição a partir das proliferações observadas ao dia 7 pós-transplante, no grupo de receptores que iriam sofrer a crise imunológica alguns dias mais tarde, especialmente porque, tal como mostramos no cap. V, a síntese de IL-2, nestas culturas, tinha essa capacidade preditora. Interpretamos esta discrepância por uma sequência de activação linfocitária em vários degraus. Acreditamos que, inicialmente, há um breve período de síntese de IL-2, após um primeiro tempo de activação linfocitária que participará, conjuntamente, com outros factores de crescimento celular no segundo recrutamento

de linfócitos T, o que torna possível discriminar as duas situações, analisando a proliferação celular. É de realçar que observámos uma boa correlação entre a IL-2 sintetizada ao dia 7, no grupo que vai sofrer rejeição aguda e a síntese de IL-2, no início da rejeição.

Creemos que será útil testar duas metodologias diferentes na tentativa de fazer deste teste de proliferação um adjuvante mais rápido no diagnóstico. Uma forma será proceder a culturas com densidade celular mais elevada e outra, seria suplementá-las com mitogéneos, como a fitohemaglutinina ou a concanavalina A.

Apesar da amostra obtida por punção ser limitada, é perfeitamente suficiente para culturas a densidade 2 a 4 vezes superior e, mais ainda, já que o número de células obtidas por exame (duas punções) varia entre 0.3×10^6 células/ml e 1.0×10^6 , para um total de 6 mililitros.

Finalmente, consideramos extremamente interessante a analogia entre as respostas proliferativas da biópsia aspirativa sem suplemento de IL-2, nos transplantados renais com rejeição aguda e os resultados, relatados por H. Rabinowich e col., sobre proliferação de células dos lavados broncoalveolares, em transplantados pulmonares com rejeição, também em poços de incubação, sem IL-2 suplementar (Rabinowich e col., 1990).

Enquanto que no nosso caso as médias das proliferações foram 948 cpm, nos lavados broncoalveolares, foram 735 cpm. Curiosamente, a ordem de grandeza inverteu-se nos receptores estáveis, cerca de 350 cpm, no rim e 519 cpm, no pulmão. Deste modo, o gradiente entre estáveis e receptores com rejeição aguda foi maior no rim que no pulmão. Realçamos que os tratamentos imunossupressores eram similares, com excepção do período inicial que, no pulmão, incluía soro anti-timocítico, mas como os episódios de rejeição ocorreram, em média, vinte e um dias pós-transplante pulmonar, os dois grupos de receptores estavam a receber o mesmo esquema triplo imunossupressor, na maioria dos casos de rejeição aguda.

Embora este resultado seja um pouco inesperado, dado que o transplante pulmonar é considerado mais imunogénico, por outro lado, sugere certo paralelismo na activação linfocitária nos dois tipos de transplantes. Este trabalho (Rabinowich e col., 1990) teve ainda o mérito de nos confirmar a inutilidade de testes de proliferação

no sangue periférico, para a avaliação imunológica, e que confirmámos num pequeno número de casos que não relatamos.

O estudo citofluorométrico contribuiu de forma muito significativa para o cumprimento dos nossos objectivos. Tal como na avaliação da proliferação das culturas de punção aspirativa, também aqui não dispunhamos de experiência anterior que nos pudesse orientar. Apenas conhecíamos um estudo preliminar em biópsia aspirativa de transplantados renais, feito em 1989, com as implicações resultantes do número limitado de anticorpos monoclonais para marcação, então, disponível (Tashiro e col., 1989). Compreensivelmente, os resultados relatados eram preliminares, embora o trabalho sugerisse um potencial de estudo muito apreciável.

Excluimos do estudo por citometria de fluxo os linfócitos B, pelas razões apontadas acima. Também os monócitos-macrófagos não foram objecto de análise pelas dificuldades técnicas, causadas pela fluorescência espontânea que estas células apresentam. Contamos poder fazer este estudo num tempo futuro, pelas razões que facilmente se compreendem pela leitura dos capítulos VI e VII e que mais adiante voltaremos a comentar.

O estudo simultâneo do sangue periférico e das amostras das punções aspirativas impunha-se, não, porque pensássemos que o sangue periférico por si pudesse trazer informação relevante, mas, sim, por acreditarmos que os movimentos dos linfócitos T, directamente envolvidos na resposta ao órgão transplantado, pudesse gerar gradientes nalguns fenótipos de T, que contribuiriam para o diagnóstico. Esta hipótese confirmou-se plenamente (cap.III).

Algumas dúvidas poderiam ser levantadas pelo tempo ligeiramente diferente das colheitas das amostras do sangue periférico e das biópsias aspirativas, cerca de 2 horas, e ainda porque nesse intervalo, os doentes recebiam a dose matinal de prednisolona e ciclosporina A. No entanto, várias razões, umas, anteriores ao nosso estudo e outras, carregadas pelo nosso trabalho, afastaram essa hipótese. De facto, há alguns dados na literatura sobre a cinética de expressão dalgumas moléculas na superfície linfocitária.

DR, um marcador de activação tardio (Serón e col., 1989) está expresso nas células T estimuladas por fitohemaglutinina após um intervalo de 48 a 72 horas, com um máximo de expressão às 168 horas (Chadburn e col., 1992). Outro marcador, cuja

cinética é conhecida, é CD69, uma molécula expressa na fase precoce de activação de linfócitos (Testi e col., 1994). CD69 expressa-se, em casos de activação do complexo receptor do linfócito T-CD3, decorridas 2 a 3 horas, com um pico de expressão entre as 18 e 24 horas e uma semi-vida de 24 horas (Testi e col., 1994). Finalmente, ao compararmos as diferenças entre os fenótipos das punções aspirativas versus os presentes no sangue periférico, verificamos que mudam substancialmente de forma, consoante os receptores estão ou não livres de rejeição aguda. Deste modo, o intervalo de 2 horas entre as amostras do sangue periférico e a punção aspirativa não deverá ter influenciado os nossos resultados. Não era, no entanto, nosso propósito provar a diferença entre fenótipos de T no sangue periférico e na punção aspirativa, mas consideramos que os resultados que apresentamos mais uma vez o comprovam, conforme outros já tinham demonstrado (Kirk e col., 1992).

Dentro das diferenças observadas entre o sangue periférico e a punção aspirativa, queremos destacar as observadas em receptores estáveis para os fenótipos CD3CD69 e CD3CD71, ambos significativamente mais expressos na punção aspirativa, comparada com o sangue periférico (cap.III). Esta maior expressão não pode ser imputada a eventuais alterações na marcação ou leitura em amostras de origens bem diferentes, porque os outros marcadores estudados apresentaram comportamento oposto, quando as diferenças eram significativas (cap III). A expressão de CD69 no linfócito T parece depender principalmente de duas vias: uma, a activação do receptor do linfócito T, outra, a ligação do receptor de IL-2 por IL-2. Esta última não poderá ser a principal nestes casos, já que CD25 e CD69 têm diferenças opostas, ao compararmos o sangue periférico com a punção aspirativa (cap.III). Pensamos que esta diferença pode ser um sinal de mecanismos activos de aceitação do aloenxerto num ambiente pobre em IL-2 (cap.V). No entanto, só com a definição dos ligantes de CD69 poderá a interpretação deste achado ser mais completa. Tal como CD69, CD71, um marcador do receptor de transferrina, identifica células em divisão. Isto não é acompanhado de produção de IL-2 (cap.V) e, curiosamente, apesar de haver uma subida da expressão de CD71 nas amostras de receptores com rejeição aguda, a diferença não atinge o nível da significância.

É muito difícil especular sobre este dado, embora pensamos ser interessante referir que transferrina tem sido apontada como uma molécula essencial para a aceitação de transplantes medulares contra a barreira da histocompatibilidade e capaz de promover a aceitação de xenotransplante, num modelo homem-rato (Pierpaoli e col., 1996).

Recentemente, B.T. Heelan e col. relataram a subida de expressão de DR nos aloenxertos de ratos tolerantes, tratados com ciclosporina A (Heelan e col., 1996), o que, conjuntamente com o que foi observado no nosso trabalho, constitui mais uma abordagem para a teorização de mecanismos activos que promovem a aceitação do aloenxerto.

Na rejeição aguda observámos a elevação significativa de expressão de vários subtipos de T (cap.III) mas, tal como tínhamos antecipado, estas alterações estavam restritas às células infiltrantes no aloenxerto, não sendo visualizadas no sangue periférico.

Se analisarmos separadamente cada fenótipo, não conseguimos uma contribuição positiva para o diagnóstico pós transplante. Mesmo assim, pensamos ser de realçar alguns separadamente, especialmente CD3DR e CD8DR e CD3CD69. Também pensamos ser relevante a significativa descida do fenótipo CD4CD45RA, que identifica células virgens e células indutoras de supressores. CD54, marcador da molécula de adesão intercelular-1, também estava significativamente mais expresso nos receptores com rejeição aguda. CD8CD57 tinha também a sua expressão elevada, na rejeição e pensamos que vai rapidamente atingir maior nível de significância, com o aumentar de casos (CD8CD57 não fazia inicialmente parte da bateria de anticorpos monoclonais usados).

Muito curiosamente, o receptor de IL-2, apesar de estar mais elevado, não atingia a significância.

Já outros autores tinham documentado alterações similares na análise dos fenótipos de T, presentes nas biópsias clássicas de transplantados renais com rejeição aguda, nomeadamente, CD54, CD8, relação CD4CD45RA/CD4CD29 (Brockmeyer e col., 1993; Sayegh e Krensky, 1996; Ibrahim e col., 1995). Estudos anteriores de CD8CD57 em biópsia clássica relataram resultados opostos, um, sugerindo a sua associação a efeitos imunossupressores (Halwani e col., 1993), o outro, relatando a

sua elevação na rejeição aguda (Malinowski e col., 1993). Também como tínhamos antecipado, a análise conjunta das subpopulações presentes no sangue periférico e nas biópsias aspirativas comprovou um movimento de acumulação intra-enxerto dos fenótipos CD3CD25 e CD3DR. Embora parcialmente a análise de CD3CD25 esteja em contradição com o que observámos no estudo da produção de citocinas (cap.V), cremos que se tivéssemos analisado o brilho da expressão deste subtipo, teríamos encontrado resultados concordantes com a análise de IL-2 (Dallman e col., 1991).

O alto valor diagnóstico da combinação da expressão nos aspirados de DR, CD8DR, CD3DR e CD8CD57, conjuntamente com os quocientes entre aspirado e sangue periférico dos fenótipos CD3CD25 e CD3DR, subtraído à expressão de CD4CD45RA no aspirado, levanta legítimas expectativas sobre o enorme potencial diagnóstico no transplante renal da biópsia aspirativa, estudada por citometria de fluxo.

Será muito interessante verificar a evolução, no futuro, daqueles receptores que mostram maior activação destes fenótipos, quer os que se integram no grupo de falsos positivos, quer aqueles que, sendo verdadeiros positivos, se encontram nas margens superiores deste teste. Pensamos que, pelo menos, alguns destes casos poderão, mais tarde, evoluir para rejeição crónica, de acordo com um importante estudo feito por Rush (Rush e col., 1995) analisando biópsias clássicas. Estes autores relataram que uma inflamação quantitativamente similar está presente nos aloenxertos renais estáveis e com disfunção; contudo, mais tarde, estes últimos apresentaram, na segunda biópsia, maiores número de lesões de cronicidade que os primeiros.

Tendo em conta os resultados apresentados nos cap. II, III e V, não existiu concordância com o valor das análises das respostas proliferativas, estudo citofluorométrico e quantificação da síntese de IL-2, correspondentes às punções aspirativas feitas ao dia 7 pós-transplantação, no grupo de receptores que iria sofrer, alguns dias mais tarde, uma crise imunológica. Já comentámos esta discrepância parcialmente e embora outras razões possam ser aduzidas, pensamos que este comportamento fundamenta ainda melhor a nossa hipótese de trabalho, ou seja, a importância do estudo dinâmico das células. Apesar disso, talvez que com análise de outros marcadores, especialmente o anticorpo para a porção do receptor de IL-2 de

alta afinidade em conjugação com outros seja possível atingir melhores resultados. Queremos lembrar que DR e CD57 estavam mais elevados de forma quase significativa, aos 7 dias e a análise de CD57, infelizmente abrangeu um menor número de casos.

Os resultados que observámos nos receptores com rejeição crónica são muito interessantes. A biópsia aspirativa tem uma utilidade muito limitada nestes casos (Hayry, 1989) dado que as alterações da rejeição crónica afectam predominantemente os vasos sanguíneos de médio e grande calibre e as lesões encontradas nos túbulos renais não têm tradução possível num aspirado. No entanto, as biópsias clássicas destes casos mostram sempre um infiltrado mononuclear, mais ou menos extenso, predominantemente à volta dos vasos. Um pouco para nossa surpresa, não encontrámos diferenças significativas entre os vários fenótipos presentes nos dois tipos de amostras, entre os receptores com rejeição aguda e rejeição crónica. Assim, a um padrão de síntese de citocinas completamente díspar entre estes dois grupos de transplantados, não corresponderam alterações no estudo citofluorométrico.

Este nosso resultado vem reforçar as convicções dos que pensam que a rejeição crónica é um fenómeno aloimune (Colvin e col., 1995), contra aqueles que a teorizam como imunoindependente (Mackenzie e Brenner, 1996).

Num modelo de transplantação renal, as células infiltrantes nos aloenxertos com rejeição crónica são os linfócitos T, principalmente CD4, macrófagos e linfócitos “natural Killer” (Yilmaz e col., 1992). Documentámos uma infiltração por linfócitos CD8, essencialmente, com diferenças muito significativas para CD8DR. Além disso, o quociente aspirado sobre sangue periférico de CD3DR era significativamente superior na rejeição crónica, comparado com o dos receptores estáveis (cap. III). Curiosamente, o sangue periférico mostrou algumas diferenças que atingiram significância para CD2, CD3 e CD3CD8, ao compararmos com receptores estáveis (cap. III).

Não temos uma explicação segura para a igualdade de CD3CD25, nos receptores com rejeição aguda versus rejeição crónica, apesar da produção de IL-2 estar quase ausente das culturas da biópsia aspirativa dos casos com rejeição crónica (cap. V). No entanto, o receptor de IL-2 é partilhado por outras citocinas, entre as quais se incluem IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13 e IL-15 (Kondo e col., 1993; Noguchi e

col., 1993; Russell e col., 1993). Não avaliámos a síntese de IL-9 e IL-15, mas o estudo que fizemos de IL-4 e IL-13 não sugerem que estas citocinas possam ser responsabilizadas pela expressão de CD25 (cap.V, VII). Talvez IL-7, que também não foi medida, possa estar envolvida nesta dissociação entre a expressão de CD25 e síntese de IL-7. Esta citocina foi estudada ao nível de mRNA nas biópsias clássicas e não mostrou correlação com crise de rejeição (Xu e col., 1995). IL-7 promove a proliferação das células T e só é parcialmente bloqueada por ciclosporina A (Traversari e col., 1992).

As análises de correlações entre as várias subpopulações de linfócitos T não revelaram dados de interesse extraordinário, excepto a confirmação das fracas correlações, quando havia, entre os valores de ciclosporinemia e os fenótipos de T e, mais interessante, a muito estreita correlação entre CD8CD57 e CD57. Este resultado permite inferir que os linfócitos “natural killer” não parecem desempenhar funções de grande monta na fase clínica dos processos de rejeição aguda, conforme discutido no capítulo III.

O estudo por citometria de fluxo revelou ainda diferenças significativas, ao compararmos os receptores tratados com ciclosporina A versus Neoral™, em receptores estáveis, durante o primeiro mês pós-transplantação, quer estudando o sangue periférico, quer a amostra da punção aspirativa (cap. IV). Mais interessante foi a descida significativa do total de marcadores de activação, que identificámos como discriminante entre aloenxertos estáveis e com rejeição aguda. Considerámos que este resultado pode ser um reflector da melhor capacidade imunossupressora da nova formulação de ciclosporina A. Principalmente CD3CD25, CD3DR e a relação CD4CD45RA/CD4CD29 podem traduzir esta capacidade. IL-2 tem a capacidade de promover a passagem de CD4CD45RA a CD4CD29 (Roth, 1994) e aumentar a expressão de CD25. Por sua vez, a capacidade imunocompetente de CD4CD29 é diferente e mais vincada que no fenótipo CD4CD45RA (Croft e col., 1994).

O número de rejeições agudas nos receptores tratados com a nova formulação de ciclosporina é ainda demasiado pequeno para permitir uma análise estatística com significado.

Não fizemos estudos de farmacocinética nestes receptores, mas pensamos que os nossos resultados constituem outro indicador de que a capacidade imunossupressora de ciclosporina A depende mais da área debaixo da curva de concentração de ciclosporina A do que dos valores de ciclosporinemia pré-dose; ao mesmo tempo poderão ser outro sinal de melhor eficácia terapêutica de Neoral™, conforme outros já sugeriram (Barone e col., 1996).

Como estes receptores que receberam Neoral™ constituem, cronologicamente, os últimos a serem admitidos no nosso estudo, não temos análise da produção de citocinas pelas respectivas biópsias aspirativas em cultura.

A análise da síntese de factores de crescimento pelas culturas da biópsia aspirativa foi desdobrada em duas fases. Na primeira, avaliámos as citocinas essencialmente produzidas por linfócitos T (cap. V) e na segunda, as citocinas e quemocinas que podem ser produzidas por vários tipos celulares, incluindo aqueles que estão presentes nas amostras da biópsia aspirativa: as células parenquimatosas renais, os linfócitos T e os monócitos-macrófagos (cap. VI).

Tivemos algumas dúvidas sobre a possibilidade de realizar este estudo. Na realidade, Yard (Yard e col., 1994) tinha relatado que células infiltrantes nos aloenxertos, não estimuladas, eram incapazes de produzir qualquer citocina. Os nossos resultados mostram que as culturas da biópsia aspirativa têm essa capacidade. Antes, porém, de procedermos ao doseamento das citocinas, realizámos estudos qualitativos para IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ (Oliveira e col., 1995) que nos deram dados preliminares sobre essa produção. Já discutimos as diferenças de metodologias que certamente estão na base destas diferenças (cap. V).

Outra dificuldade foi a escolha do melhor intervalo de incubação para recolher os sobrenadantes das culturas, quando se pretende dosear factores de crescimento celular.

Nós só relatámos os doseamentos feitos nos sobrenadantes com 48 horas de cultura, mas, na realidade, analisámos a produção de IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ , às 24 e 96 horas de incubação

Este estudo assegurou-nos que a melhor altura para recolher os sobrenadantes eram as 48 horas de incubação, para IL-2 e IL-10. Curiosamente, num trabalho sobre produção de citocinas por culturas linfocitárias mistas, a melhor altura para o seu doseamento parecia ser entre o 3º e o 4º dias, para IL-2 e 6º dia, para IFN- γ (Danzer e col., 1994). Como não observámos produção significativa de IFN- γ , mesmo às 96 horas, não prosseguimos com as incubações até tempos mais dilatados, especialmente porque com a nossa metodologia de cultura, devotada ao crescimento de linfócitos, as células parenquimatosas renais apresentavam índices de sofrimento celular evidentes a partir desse tempo de cultura, salvo algumas excepções. Tivemos receios que isso pudesse influenciar os nossos resultados, numa forma perfeitamente afastada da situação *in vivo*, que foi sempre uma das nossas preocupações fundamentais.

Outra dificuldade com o doseamento de citocinas prende-se com o seu limitado raio de influência. De facto, a única maneira das citocinas poderem exercer os seus efeitos de forma coordenada, implica que a sua esfera de influência seja extremamente limitada e a sua disseminação sistémica evitada. Assim, as células produtoras de citocinas produzem-nas em muito pequena quantidade e nalguns casos, em direcção apenas às células que lhes vão responder (Poo e col., 1988). Realmente, as células produtoras de citocinas estão frequentemente localizadas imediatamente adjacentes às células respondedoras (Metcalf, 1991). Além disso, as células respondedoras destroem as citocinas a que respondem num processo de endocitose, mediado por um receptor (Nicola e col., 1988).

Muitas citocinas ligam-se a elementos da matriz extracelular que rodeia as células respondedoras, restringindo ainda mais, deste modo, a sua disseminação, ao mesmo tempo que permite uma maior biodisponibilidade para as células respondedoras (Gordon, 1991). Em consequência, na maior parte das situações, as quantidades mensuráveis das citocinas representam um excesso destes factores que não são utilizados pelas células respondedoras.

A quantificação foi feita por métodos ELISA, por duas razões. Primeiro, era uma metodologia que dominávamos e actualmente, existem no mercado diversos kits com boas aptidões para esse fim. Cada citocina foi sempre medida pelo mesmo kit. Segundo, excluimos a avaliação por PCR, por ser na maior parte dos casos um método

não quantitativo e, fundamentalmente, por avaliar a expressão da mensagem para a citocina e, não, a sua produção proteica. Pensamos que dados os fenómenos de regulação pós-transcricional, a avaliação da síntese proteica é preferível.

A conservação dos sobrenadantes foi feita a -70°C , que nos assegura uma boa preservação destes factores de crescimento.

A escolha da altura da realização das punções aspirativas foi também objecto de reflexão. A punção feita aos 7 dias pós-transplantação tinha como objectivo assegurar o estudo comparativo de aloenxertos imediatamente funcionantes que permaneceriam livres de crises imunológicas, aloenxertos imediatamente funcionantes que, mais tarde, viriam a sofrer uma crise imunológica, com um intervalo de tempo suficiente que permitisse isolar perfeitamente as duas situações e aloenxertos que sofriam de necrose tubular aguda pós-transplantação. Tínhamos ainda como objectivo avaliar situações de nefrotoxicidade por ciclosporina A, mas o reduzido número de ocorrências levou-nos a afastar esses sobrenadantes que, com o previsível aumento de casos, serão objecto de relato posterior.

Além disso, a punção aspirativa dos 7 dias marcaria uma fase de reconhecimento aloimune que, nalguns modelos, coincide com um pico de supressão da resposta ao dador que, mais tarde, já não se observa. As punções dos 14 e 30 dias tinham como objectivo completar o estudo da evolução do mecanismo de aloreconhecimento, mas como o resultado da análise aos 14 dias não contribuiu com informação relevante, por ser muito decalcável da dos 7 dias, foi eliminado.

Como atrás dissemos tivemos o cuidado de confirmar o diagnóstico de rejeições aguda e crónica pelo estudo histopatológico, o que foi conseguido com algumas excepções.

O primeiro conjunto de citocinas avaliado foi constituído por IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ . Estas citocinas são os melhores marcadores da subdivisão de linfócitos T indutores. Estas células têm sido divididas em três subtipos, Th0, Th1 e Th2, a que correspondem funções diferentes (Nickerson e col., 1994; Dallman, 1995). Th0 constitui o subtipo inicial, que não está prédefinido e que vai evoluir para Th1 ou Th2, conforme o ambiente das citocinas (Street e Mosmann, 1991; Hsieh e col., 1992). Th1 representa a célula T dirigida para imunoreactividade celular e, por sua vez, Th2 está

dirigida para a imunorreatividade humoral. Além disso, vários relatos de estudos em vários tipos de transplante de órgãos, quer em modelos animais, quer no homem, têm fortemente sugerido que Th1 se associa a rejeição aguda do aloenxerto e Th2 se associa a aceitação do aloenxerto (O'Connell e col., 1993; Takeuchi e col., 1992; Krieger e col., 1996). Há no entanto alguns estudos que não comprovam esta teoria (Vossen e col., 1995; Fanges e col., 1995).

Os nossos resultados constituem o primeiro relato de avaliação de síntese destas citocinas por culturas de biópsia aspirativa, no transplante renal e confirmam a teoria predominante de associação de Th1 com rejeição aguda, Th0/Th2 com aceitação do aloenxerto renal (cap.V). Mais relevante foi a análise da produção de citocinas, aos 7 dias, no grupo de receptores que viriam a desenvolver uma crise imunológica, ter revelado um padrão de citocinas Th1, ao contrário do que acontece, na mesma altura, aos receptores que vão permanecer livres de rejeição aguda (cap.V). Também interessante foi o padrão Th2 associado a rejeição crónica (cap.V).

O estudo da produção destes factores, aos 30 dias pós-transplante, nos receptores que permaneceram livres de rejeição aguda sugere que os eventuais mecanismos *in situ* de reconhecimento aloimune foram feitos mais cedo, de forma que as células infiltrantes estão quiescentes (cap.V), um pouco de acordo com os relatos de infiltração por mononucleares dos aloenxertos renais com boa função, observados em biópsias clássicas protocolares (Gaber e col., 1996).

Achamos relevante a discordância entre o estudo citofluorométrico e a análise destas citocinas, no grupo de receptores estáveis que não apresentavam diferenças significativas nos fenótipos de T infiltrantes, aos 7 dias versus 30 dias, apesar da diferença significativa observada na análise comparativa da síntese de IL-2 e IL-10 (cap.III, V).

Não nos vamos deter na discussão dos resultados observados para IL-4 e IFN- γ . Apenas queremos acrescentar que também outros grupos de trabalho têm encontrado enormes dificuldades na quantificação de IL-4, no homem (Danzer e col., 1994; Fournel e col., 1996). Não sabemos se estas dificuldades reflectem a pouca importância de IL-4 na transplantação renal humana, como sugere um pouco a

capacidade que ciclosporina A e tacrolimus têm de inibir fortemente a sua produção (Wang e col., 1993), ou se traduzem problemas de metodologia, que ainda não foram sequer equacionados. Como precaução, medimos nalguns casos IL-4sR α que, ligando-se a IL-4, poderia impedir a sua quantificação, mas os resultados obtidos não sustentaram esta hipótese (cap.VII).

A importância de IL-2 na transplantação está perfeitamente estabelecida, desde há vários anos (Gajewski e col., 1989) e mais fortemente, desde a introdução de ciclosporina A no arsenal terapêutico na transplantação. Um dos principais mecanismos de acção de CsA é a inibição da síntese de IL-2 (Borel, 1981). Este conhecimento promoveu o estudo da eficácia de anticorpos anti-IL-2 na transplantação renal, com alguns bons resultados (Soulillou e col., 1990). Não são apenas os linfócitos, as células que possuem receptores para IL-2. Para o nosso estudo é importante lembrar que monócitos-macrófagos também podem apresentar receptor de IL-2, na superfície (Baccarini e col., 1989; Ohashi e col., 1989). IL-2 promove a proliferação, diferenciação e a actividade citolítica dos monócitos-macrófagos (Baccarini e col., 1989; Malkovsky e col., 1987; Ralph e col., 1988). Como demonstrámos no capítulo VI, monócitos-macrófagos parecem desempenhar papel relevante nas rejeições agudas corticorresistentes/irreversíveis e por outro lado, IL-2 está significativamente mais elevada nesse tipo de rejeições agudas (cap.V).

A síntese de IL-2, ao dia 7, no grupo de doentes que iria rejeitar, permitiu uma óptima discriminação dos doentes estáveis, ao contrário das respostas proliferativas das culturas da biópsia aspirativa (cap.II) e do estudo citofluorométrico (cap.III). No entanto, queremos lembrar que, aos 7 dias, estes receptores mostravam um aumento da expressão de CD57 nas amostras da punção. CD57 identifica, se bem que não exclusivamente, linfócitos “natural killer” (Price e Jensen, 1991). Estes aparecem numa fase muito inicial do processo de rejeição aguda (Gibson e col., 1996) e para além de apresentarem o receptor de IL-2 na sua superfície, dependem de IL-2 para o seu crescimento, actividade citolítica e para sintetizarem, por sua vez, IFN- γ (Ortaldo e col., 1984; Trinchieri e col., 1984).

Finalmente, os resultados de IL-2 mostram, tal como tínhamos antecipado, que a resposta aloimune inicia-se bem cedo pós transplante, tal como um estudo de

transplantados renais por biópsia clássica, aos 7 dias pós-transplante, tinha sugerido (Raftery e col., 1989). No entanto, cremos que nenhum teste, até agora, tinha apresentado um valor preditor positivo tão importante, com um intervalo de tempo tão alargado, antes do início clínico da crise imunológica.

Ao contrário das respostas proliferativas, que não mostraram uma correlação com a gravidade da crise de rejeição aguda, o doseamento de IL-2 permitiu distinguir a intensidade das crises agudas de rejeição (cap.II, V).

Já comentámos acima esta discrepância; apenas queremos realçar o grande valor que a análise de IL-2 mostrou ter.

Os receptores com rejeição crónica não mostraram síntese relevante de IL-2 nas culturas da biópsia aspirativa (cap.V). No entanto, o estudo citofluorométrico não revelou diferenças significativas entre estes dois grupos de receptores (cap.III). Estes dados sugerem que apesar de linfócitos T estarem envolvidos no processo de rejeição crónica, deverão utilizar vias de activação independentes de IL-2. Assim, estes resultados reflectem indirectamente a incapacidade de ciclosporina A em parar este processo e a ausência de alternativas terapêuticas eficazes nesta situação (Tilney e col., 1991).

Uma nota de cautela se impõe. Os nossos resultados poderão não ser reproduzidos com diferentes esquemas terapêuticos; de qualquer modo, aquele que está em uso na unidade de Transplantação Renal do H. S. João é actualmente a combinação mais usada para o transplante de rim de cadáver.

Os resultados da análise de IL-10 necessitam de vários comentários.

IL-10 foi sintetizada em quantidades significativamente superiores, aos 7 dias, nos receptores livres de rejeição aguda, comparada com os receptores que iriam sofrer uma crise imunológica e versus o início da rejeição aguda. Por outro lado, um número muito limitado de receptores com rejeição aguda exibiram uma produção importante de IL-10, nas culturas da biópsia aspirativa. Para completar este quadro complexo, receptores com rejeição crónica mostraram uma síntese de IL-10 significativamente

superior aos receptores com rejeição aguda e aos receptores livres de rejeição, estudados aos 30 dias pós-transplantação (cap.V).

IL-10 é uma molécula muito complexa. IL-10 é produzida por linfócitos Th2 e a sua síntese, curiosamente, não é inibida por ciclosporina A (Moore e col., 1993). Além de outras células que não interessam o nosso estudo, IL-10 também pode ser produzida por monócitos-macrófagos (de Waal Malefyt e col., 1991). IL-10 participa no desvio de Th0 para Th2, quer directamente, quer por inibição da produção de IL-12 por monócitos-macrófagos (Macatonia e col., 1993; de Waal Malefyt e col., 1991; D'Andrea e col., 1993; Ding e col., 1993). A produção de citocinas por linfócitos "natural killer", activados por IL-2, é inibida por IL-10, mas com a participação obrigatória de macrófagos (Hsu e col., 1992). IL-10 também pode inibir a adesão de macrófagos, a expressão dos antigéneos da classe II do complexo major de histocompatibilidade, a síntese de factores de crescimento por macrófagos estimulados por IFN- γ (de Waal Malefyt e col., 1992), indicando que IL-10 possui actividade anti-inflamatória.

No transplante renal, como dissemos atrás e se pode também inferir dos nossos resultados (cap.V), Th2 está associado a aceitação do aloenxerto. Mesmo no sangue periférico de receptores renais tolerantes, isto é, sem qualquer tratamento imunossupressor, os linfócitos mostram um padrão Th2 (Chen e col., 1996). Interessantemente, IL-10 é incapaz de bloquear o início da resposta aloimune por células dendríticas, mas pode fazê-lo se a resposta for iniciada por monócitos-macrófagos (Macatonia e col., 1993). No entanto, IL-10 também pode ter efeitos imunoestimulantes. IL-10 pode aumentar a proliferação e a citotoxicidade de linfócitos CD8, quando IL-2 também está presente (Chen e Zlotnik, 1991) e tínhamos documentado a ligeira predominância de CD8 na rejeição aguda (cap.III).

Este comportamento poderá explicar os dois casos de rejeição aguda com produção simultânea de IL-2 e IL-10, curiosamente duas rejeições agudas graves (cap.V). Mais ainda, IL-10 promove um aumento da expressão de FcR γ I nos monócitos-macrófagos e a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (te Velde e col., 1992) que muito, provavelmente, desempenhará um papel no processo de rejeição

crónica. Além disso, outros autores (Ode-Hakim e col., 1996; Loong e col., 1996) também descreveram uma associação de Th2 com rejeição crónica.

Num estudo em biópsias clássicas de receptores com rejeição crónica, os autores analisaram a expressão de mRNA para várias citocinas e observaram que mRNA de IL-2 está quase ausente, enquanto que mRNA de IL-10 estava aumentado (Ode-Hakim e col., 1996), confirmando assim os nossos resultados.

Não podemos ter a certeza sobre qual o tipo celular mais responsável pela produção de IL-10 nas culturas da biópsia aspirativa, pois quer linfócitos, quer monócitos-macrófagos poderão ter assumido esse papel. A quantificação de monócitos-macrófagos, feita no capítulo VI, promove os monócitos-macrófagos como principais candidatos a esse papel. De facto, estas células estão presentes em número significativamente inferior nas punções aspirativas do dia 30, comparadas com as amostras obtidas, ao dia 7, pós-transplantação (cap.VI), seguindo portanto um percurso paralelo à síntese de IL-10 pelas culturas das biópsias aspirativas. Isto não invalida a nossa conclusão sobre o padrão de Th e a sua associação com rejeição ou não, tal como comentámos no capítulo V. Infelizmente não fizemos o estudo quantitativo da presença de monócitos-macrófagos nas punções aspirativas dos receptores com rejeição crónica, mas é conhecida a importância que é atribuída a estas células no processo de rejeição crónica (Utans e col., 1996).

Não ficou esclarecido no nosso trabalho quais os mecanismos responsáveis pela síntese de IL-10. O gene de IL-10 está localizado no cromossoma 1 e inclui várias sequências de controlo transcricional, nomeadamente os elementos de resposta de IL-6 e de glucocorticóides (Kim e col., 1992). No capítulo VI demonstrámos que culturas de biópsia aspirativa, feita ao dia 7 pós-transplantação, em receptores que vão permanecer livres de rejeição aguda, sintetizam uma quantidade de IL-6 significativamente superior à dos receptores que vão sofrer uma crise imunológica. O estímulo que promove a síntese de IL-6 e IL-10 poderá ser o mesmo. Como dissemos, ciclosporina A não inibe a produção de IL-10. Pensamos que talvez ciclosporina A e glucocorticóides, que fazem parte da terapêutica imunossupressora administrada, possam inibir directamente, nos receptores que vão permanecer livres de rejeição, a

produção de IL-2, neste caso, a ciclosporina A, ou indirectamente, via inibição de síntese de IL-1 por monócitos-macrófagos (ambos) (Whisler e col., 1985; Knudsen e col., 1987) e permitir assim a produção isolada de IL-10 que promoverá a maturação para Th2. Na realidade, ciclosporina A tem efeitos importantes sobre monócitos-macrófagos (Whisler e col., 1985), nomeadamente interfere com a apresentação de antigéneo por estas células. Ainda não foi identificado o(s) factor (es) que medeia(m) este efeito, mas IL-1 e prostaglandinas não participam neste papel (Palay e col., 1986). Nesse estudo, Palay demonstrou mesmo que macrófagos são mais sensíveis às acções de ciclosporina A que linfócitos T. Talvez IL-10 desempenhe esse papel inibidor da apresentação de antigéneo.

Como dissemos acima, estava no nosso plano avaliar a produção por culturas da biópsia aspirativa de factores de crescimento que dependem mais de monócitos-macrófagos e/ou que influenciam primordialmente estas células. De facto, monócitos-macrófagos são frequentemente vistos nas punções aspirativas de transplantados renais, inclusivamente a sua quantificação, depois de feito o diferencial com o sangue periférico, contribui para o índice corrigido total de incremento que permite a classificação da punção (cap.I). No entanto, nessa classificação já se chama a atenção para a presença isolada de monócitos-macrófagos, que sugere necrose tubular aguda em recuperação, ou ainda, para a presença simultânea de linfoblastos e macrófagos que aponta para rejeição aguda avançada e, por vezes, irreversível (cap.I). Infelizmente, a detecção de monócitos-macrófagos pode tornar-se difícil pela presença de células tubulares renais com sofrimento celular grave. Por isso, antes de procedermos ao estudo de citocinas/quemocinas mais dependentes de monócitos-macrófagos, fizemos a sua quantificação por coloração, com técnica fosfatase alcalina-anti-fosfatase alcalina. O anticorpo usado, 3C10, demonstrou alta especificidade para monócitos-macrófagos (Wesley e col., 1983). Este anticorpo monoclonal identifica 95% de monócitos e 98% de macrófagos alveolares, enquanto que <1% de granulócitos, 1% de linfócitos T, 1% de linfócitos B são marcados por 3C10. Células dendríticas são marcadas em 10% pelo anticorpo (Wesley e col., 1983).

Os nossos resultados, apresentados no capítulo VI, confirmam a presença significativa de monócitos-macrófagos na primeira semana pós-transplantação, quer o

aloenxerto goze de boa função, quer sofra um processo de necrose tubular aguda. Também confirmamos a importância destas células na rejeição aguda corticorresistente, enquanto que, na rejeição aguda corticosensível, o seu número não aumenta significativamente. Outros autores já tinham chegado a conclusão similar, ao estudar estas células nas biópsias clássicas de transplantados renais (Dooper e col., 1992). Compreensivelmente, a presença destas células em situações clínicas tão diferentes deverá acompanhar-se de dinâmicas independentes.

A dupla marcação destas células por CD14 e CD16 sugere comportamentos bem diferentes. Assim, $CD14^{++}CD16^{-}$ produzem IL-10, conjuntamente com IL-1, TNF e IL-6, enquanto que $CD14^{+}CD16^{+}$ não produzem IL-10, mas promovem um aumento da expressão dos antígenos da classe II do complexo major de histocompatibilidade, conjuntamente com as moléculas de adesão VLA-4 e ICAM-1 (Ziegler-Heitbrock, 1996), o que sugere que este subtipo é mais pro-inflamatório e possui maior capacidade de apresentação de antígeno que o primeiro. Outros autores tinham especulado que a preservação da expressão de CD14, induzida pela proteína C activada, poderia resultar num sinal negativo para as células T (Grey e col., 1994). (O anticorpo que nós usámos identifica CD14 e temos registado que, em certos casos de rejeição aguda, células que morfologicamente nos pareceriam como monócitos-macrófagos não foram marcadas, o que tenuemente está de acordo com esta divisão).

Supomos que o aumento do número de monócitos-macrófagos nos receptores com necrose tubular aguda, comparada com os receptores estáveis, pode estar associada à importância destas células na reparação (Sedor, 1992). A célula tubular renal, após ter sofrido a lesão isquémica, poderá constituir a origem de mediadores inflamatórios para a activação macrofágica, nomeadamente através da síntese de PDGF, GM-CSF e IL-6 (Frank e col., 1993), de tal modo que monócitos-macrófagos constituem a principal célula nas áreas de lesão isquémica renal. Mais interessante, a subida do número de monócitos precede a fase de aceleração da proliferação das células renais tubulares. Se os resultados observados para a síntese de IL-6, pelas culturas da biópsia aspirativa ao dia 7 pós-transplante, podem suportar esse papel de activação monocitária (cap.VI), cremos que poderá ser M-CSF, que também medimos (cap.VI), o factor mais importante para a sua atracção na fase inicial pós-transplante,

de acordo também com o que outros observaram em modelos animais de lupus (Bloom e col., 1993).

Tendo em conta os resultados da proliferação das culturas das biópsias aspirativas correspondentes, pensamos que nestes casos de necrose tubular aguda, monócitos-macrófagos não proliferam, ao contrário do que acontecerá durante a rejeição aguda. Esta diferente capacidade de proliferação também já foi comentada em modelos animais de nefrite por anticorpo anti-membrana basal glomerular, em que a actividade clínica se correlaciona com a infiltração de monócitos-macrófagos em proliferação, identificados por positividade para PCNA⁺, mas não com o número total destas células, que incluem aquelas que não estão em proliferação, identificadas por PCNA⁻ (Lan e col., 1995). Curiosamente, num ambiente rico em citocinas Th2, o caso dos doentes sem rejeição aguda, monócitos sintetizam lipoxinas (Kato e col., 1994), que são importantes mediadores anti-inflamatórios (Brady e Serhan e col., 1996). Ainda não está determinado quais os efeitos da presença simultânea destes factores, mas especulamos que a sua conjugação poderá ter um efeito antiproliferativo. De qualquer modo, os resultados que apresentámos no capítulo VI sugerem que a classificação de punções aspirativas só poderá ser melhorada, se se tiver em conta estas diferenças nos monócitos-macrófagos presentes na rejeição aguda versus necrose tubular aguda, mas só recorrendo a colorações adicionais, que os permitam discriminar, poderá ser atingido esse objectivo.

O estudo das citocinas/quemocinas, apresentado no capítulo 6, tinha como objectivo definir mais completamente as diferentes implicações da presença destas células em receptores sem e com rejeições aguda e crónica.

Este estudo enfrentava alguns obstáculos inultrapassáveis, sendo o principal, derivado da capacidade que as células tubulares renais e algumas do glomérulo, nomeadamente as mesangiais, de sintetizar a maior parte dos factores de crescimento avaliados, como IL-6, IL-8, MCP-1 (Wenzel e Abboud, 1995), principalmente em situações de lesão renal, como provavelmente é o caso, na primeira fase pós-transplantação. Além disso, como referimos no capítulo 6, M-CSF está elevado em doentes com insuficiência renal com clearance de creatinina 20 ± 15 ml/min,

sensivelmente dentro dos valores de função renal dos receptores estáveis, ao dia 7 pós-transplantação.

Como tínhamos observado que o número de monócitos-macrófagos diminuiu significativamente no fim do primeiro mês pós-transplante, nos receptores estáveis, optámos por não avaliar a produção destes factores de crescimento pelas culturas da biópsia aspirativa dos 30 dias. Somos da opinião que se tal tivéssemos feito, várias diferenças significativas teriam sido descortinadas para os factores de crescimento estudados, especialmente para MCP-1, que foi produzido em quantidade muito significativa pelas culturas das amostras correspondentes a rejeição aguda, confirmando assim o que outros autores observaram (Wenzel e Abboud, 1995). Foi interessante notar a presença de várias correlações significativas entre os vários factores de crescimento nos receptores com rejeição aguda, especialmente entre IL-8 versus MCP-1, IL-8 versus MIP-1 α e IL-8 versus IL-6, sugerindo os mesmos estímulos a desencadear a síntese destes factores, que talvez sejam de natureza inflamatória inespecífica. Por outro lado, também nos receptores estáveis, MCP-1 apresentou correlações significativas com IL-6 e IL-8. Tal como com a presença de monócitos-macrófagos, cremos que, nestes receptores estáveis, os mecanismos subjacentes à produção destas citocinas deverão ser distintos daqueles empenhados nos casos com rejeição aguda. Provavelmente, radicais livres de oxigénio poderão constituir o principal estímulo para a síntese de MCP-1, IL-8 e IL-6, nos receptores estáveis (Wenzel e Abboud, 1995).

As observações sobre IL-6, IL-1ra e MIP-1 α merecem comentários adicionais.

IL-6 é conhecida essencialmente pela sua associação a estímulo da produção de imunoglobulinas e a várias proteínas da fase aguda pelos hepatócitos (Akira e col., 1993). IL-6 é produzida por vários tipos de células, nomeadamente as células mesangiais e tem sido apontada como indicador útil da actividade das glomerulonefrites mesangioproliferativas (Abbott e col., 1991). Não cremos que as células mesangiais possam ser responsabilizadas pela sua síntese nas nossas culturas, já que raramente estão presentes nas amostras e, quando estão, o seu número é muito limitado. Pensamos que a produção de IL-6, nas amostras do dia 7 de receptores estáveis, deve ser vista à luz das observações sobre Th1/Th2, relatadas no capítulo V. Em alternativa, IL-6 poderia ter sido sintetizada por monócitos-macrófagos, como se

pode pensar, tendo em conta a correlação significativa entre IL-1ra e IL-6. IL-6 poderá ter sido o principal estímulo para a síntese de IL-1ra (Tilg e col., 1994). Outro mecanismo de acção anti-inflamatória de IL-6 poderia ter sido mediado pela libertação de receptores solúveis de TNF, pelos monócitos-macrófagos (Tilg e col., 1994).

Tínhamos previamente feito a análise qualitativa de TNF- α nas culturas que revelaram a sua presença constante. O tipo de análise não nos permite tecer mais comentários, mas é conhecida a importância atribuída a TNF- α nos mecanismos desencadeantes da rejeição aguda (Dallman, 1993; Cambier e col., 1994). A quantidade de IL-6, significativamente menor, sintetizada pelas culturas das amostras do dia 7 nos receptores que vão sofrer crise imunológica, reforça o papel que IL-6 poderá jogar na inibição da cascata imune que leva à rejeição aguda.

A presença de IL-6 no início clínico da rejeição aguda reforça o comportamento ambivalente desta citocina. Também aqui não pensamos que as células renais possam ser responsabilizadas pela produção de IL-6 e, como tínhamos demonstrado no capítulo V que rejeição aguda se associou a padrão Th1, então também linfócitos T não terão assumido o papel de produtores. Novamente, os monócitos-macrófagos deverão ter sintetizado IL-6. O papel de IL-6, na rejeição aguda, parece ser mais consistente no transplante hepático (Kita e col., 1996), apesar de no transplante renal alguns autores terem observado uma elevação significativa de IL-6 circulante (Yoshimura e col., 1991).

A produção de IL-6 na rejeição crónica, inferior à observada no início clínico da rejeição aguda e inferior à medida nas culturas de amostras aos 7 dias nos receptores estáveis, mas ainda assim, em quantidade significativa, poderá ter sido da responsabilidade de vários tipos celulares presentes nos aspirados. Assim, células tubulares renais, células endoteliais, linfócitos T tipo Th2 (cap.V) e monócitos-macrófagos poderão ter sido todos produtores de IL-6, embora, como temos vindo a considerar, favorecemos linfócitos Th2 e/ou monócitos-macrófagos como origem da IL-6.

MIP-1 α foi produzido em quantidades significativamente maiores na rejeição crónica que na rejeição aguda e mesmo que de forma não significativa, MIP-1 α estava

mais elevado na rejeição crónica do que em qualquer outro subgrupo de receptores (cap.VI). Este resultado está de acordo com aqueles relatados no capítulo V. De facto, esta quimocina, uma das mais abundantes nos linfócitos CD4⁺ activados (Kelner e Zlotnik, 1995), é um poderoso quimioatractivo para monócitos-macrófagos, mas particularmente, para o nosso trabalho, possui a interessante característica de inibir fortemente a proliferação de linfócitos T (Zhou e col., 1993), assim como a síntese de IL-2 (Cocchi e col., 1995), de acordo com a quase ausência de IL-2, que observámos nas culturas das punções aspirativas da rejeição crónica. Como MIP-1 α tem maior capacidade quimioatractiva para linfócitos B que T (Schall e col., 1993), cremos que isto reflecte a predominância de monócitos-macrófagos na rejeição crónica assim como o padrão Th2 que descrevemos.

Deixamos para o fim IL-1ra que nos parece ter importância de grande interesse.

As quantidades de IL-1ra que medimos são muito pequenas e, de acordo com o que está aceite, serão incapazes de inibir as acções de IL-1, pois para isso, necessitariam de estar numa relação 10/1, respectivamente, (Tilg e col., 1993), pelo menos no que refere a monócitos *in vitro*. Não medimos IL-1 nas culturas, pelos motivos apresentados no capítulo VI, mas cremos que o seu valor deverá exceder em muito 1/10 dos valores medidos para IL-1ra. No entanto, IL-1ra sintetizada por monócitos estimulados por GM-CSF permanece intracelular na quase totalidade (Muzio e col., 1994) e as culturas das punções aspirativas contêm GM-CSF (cap.VII). Cremos, portanto, que apesar da quantidade de IL-1ra ser pequena no sobrenadante, deverá ter efeito significativo a nível intracelular. Além disso, receamos que a altura escolhida para dosear IL-1ra não corresponde de maneira nenhuma ao pico da sua síntese; fomos obrigados a fazê-lo pela necessidade de medir outros factores de crescimento nos mesmos sobrenadantes. Realmente, numa experiência, relatada por Tilg (Tilg e col., 1993), a melhor altura para avaliar IL-1ra em circulação, depois de estímulo por IFN- γ , era às 12 horas, com rápida descida até às 24 horas. Apesar destes contratempos, demonstrámos no capítulo VI que os receptores livres de rejeição produziram IL-1ra em quantidade significativamente superior, nas culturas das amostras de 7 dias, àqueles que iriam sofrer uma crise imunológica, alguns dias depois da punção dos 7 dias. A não significância da diferença de IL-1ra entre receptores

estáveis e aqueles com rejeição crónica deve ser interpretada à luz do pequeno número dos transplantados com rejeição crónica, já que os valores absolutos não eram diferentes dos receptores com rejeição aguda (cap.VI). Poderia argumentar-se que talvez mecanismos ligados a inflamação inespecífica, própria de aloenxerto renal pós-cirurgia de transplantação, poderiam ser os causadores da libertação de IL-1ra, nomeadamente via TGF- β (Wahl e col., 1993). No entanto, não havia diferenças significativas entre os dois grupos, nesse aspecto, como indirectamente se reflecte nas creatinemias (cap.V). Além disso, como mostrámos no capítulo VII, TGF- β estava mais elevado, embora não significativamente, nos receptores que iriam sofrer rejeição aguda que naqueles que se mantiveram estáveis. Outras citocinas candidatas à promoção da síntese de IL-1ra são IL-1, IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IFN- α , IFN- γ , GM-CSF (Muzio e col., 1994; Tilg e col., 1994; Danis e col., 1995).

Como dissemos acima, não medimos IL-1, mas esta citocina não será candidata a explicar a diferença entre os dois grupos. IL-2 também não poderá explicar as diferenças, pelo contrário, tendo em conta os resultados que apresentámos no capítulo V. O mesmo podemos dizer de IL-4, que está ausente das culturas (cap.V). IL-10 pode ser uma das candidatas (cap.V). IL-13, cujos resultados apresentámos no capítulo VII, não pode ter sido responsável, já que foi sintetizada em quantidades superiores, se bem que não significativas, pelos receptores que iriam sofrer uma rejeição aguda. Também IFN- α e IFN- γ não poderão ser candidatas, embora não tenhamos avaliado a síntese de IFN- α . GM-CSF pode ter desempenhado algum papel, já que foi sintetizado em quantidades maiores, que não atingiram a significância pelo grupo de receptores estáveis (cap.VII). Além disso, GM-CSF apresentou uma correlação directa com IL-6, significativa, $p=0.009$. Resta ainda IL-6 que, curiosamente, apresentou uma correlação directa e significativa com IL-1ra, na análise destes receptores sem rejeição (cap.VI). cremos que estes três factores de crescimento, IL-6, IL-10 e GM-CSF devem estar relacionados com o aumento significativo de IL-1ra. Não sabemos, no entanto, qual será o estímulo, nem sequer o tipo celular envolvido, já que quer linfócitos, quer monócitos-macrófagos poderão assumir essa função. No entanto, no que respeita a IL-1ra, podemos afirmar com confiança que as células responsáveis pela sua produção nas culturas foram os monócitos-macrófagos. Mecanismos genéticos poderão ser importantes. Por exemplo,

GM-CSF promove a síntese de IL-6 e IL-1ra de maneira consistente, mas em quantidades muito variáveis entre diferentes indivíduos saudáveis (Danis e col., 1995). Danis e colaboradores demonstraram, num artigo recente, que um alelo menos comum do gene de IL-1ra se associa a produção significativamente superior de IL-1ra, estimulada por GM-CSF. Curiosamente, este alelo não influenciava a síntese de IL-1, IL-6 e TNF- α por monócitos estimulados por GM-CSF.

Como comentamos no capítulo VI, há várias razões para admitir que IL-1ra pode desempenhar um papel muito importante na transplantação renal, que até agora não tinha sido suspeitado. A importância de IL-1 no transplante deriva da posição que esta citocina ocupa na ativação inicial da cascata imune e, pelo menos, em modelos animais (Kerr e col., 1994), a sua importância já tinha sido assinalada. Em modelos de nefrite em ratos por anticorpo anti-membrana basal glomerular, tratamento com IL-1ra produzia consideráveis benefícios clínicos (Lan e col., 1993). Interessantemente, IL-1ra não diminuía a acumulação de linfócitos T no interstício renal destes animais, mas produzia uma diminuição significativa da expressão do receptor de IL-2, nestas células T (Lan e col., 1993). Além disso, promove uma forte inibição da expressão de moléculas que participam na coativação linfocitária, como ICAM-1, VCAM-1 e antígenos da classe II do complexo major de histocompatibilidade (Williams e col., 1985; Seventer e col., 1991). É conhecido que a ausência de sinais de coestimulação linfocitária, conjuntamente com ligação do receptor de T por antígeno, promove a anergia linfocitária. Mais ainda, IL-1 parece estimular os linfócitos T através da indução da expressão de receptores para outras citocinas, especialmente IL-2 (Dallman, 1995). IL-1ra também tem mostrado capacidade de inibir a proliferação celular nos glomérulos de glomerulonefrite rapidamente progressiva (Atkins, 1995).

Por outro lado, IL-1ra tem sido usada com sucesso em vários modelos de doença autoimune e no choque séptico. Altas doses de IL-1ra têm sido bem toleradas e cursos repetidos de IL-1ra parecem poder ser administrados, dado que IL-1ra recombinante não parece capaz de induzir anticorpos (Atkins, 1995). A capacidade já demonstrada por IL-1ra em inibir a resposta enxerto contra hospedeiro parece ser outro indicador do potencial desta citocina como adjuvante no tratamento/profilaxia da rejeição aguda.

A produção dos factores de crescimento celular pelas culturas da biópsia aspirativa, descrita nos capítulos V e VI, constituía para nós um índice indirecto que apresentação de antigéneo era feita durante essas culturas, com libertação de citocinas diferentes para os sobrenadantes, variando com a clínica. Um dos pressupostos da nossa investigação consistia na apresentação directa de antigéneo, apresentação que poderia ser feita pelas células parenquimatosas renais. Esta apresentação poderia levar quer a reacção aloimune, quer a aceitação do aloenxerto.

A tolerância no transplante, em geral, e no renal, em particular, é um processo até agora muito deficientemente compreendido. Um dos testes mais usados para a sua avaliação é a cultura mista linfocitária (CML). Os resultados relatados no estudo dos transplantados renais pós-cirurgia por CML não têm sido uniformes. No entanto, um padrão predominante vem sendo descrito, que consiste na associação de tolerância ao aloenxerto à hiporresposta específica ao dador (Strober e col., 1989; Wramner e col., 1987; Kahan e col., 1989). Porém, estes resultados não têm sido reproduzidos por todos (Ingulli e col., 1993).

Os resultados que apresentámos no capítulo VII documentam uma hiporresposta específica para o dador, nos receptores que permanecem livres de rejeição durante o primeiro ano pós-transplantação, comparada com a observada naqueles que desenvolveram uma crise imunológica, durante esse período. Como mostrámos, os receptores livres de rejeição não podem ser considerados hiporrespondedores em geral pelo contrário, estes receptores mostraram uma proliferação média maior para os testemunhos que os receptores que desenvolveram rejeição aguda.

No passo seguinte, demonstrámos que os sobrenadantes das culturas da biópsia aspirativa de receptores livres de rejeição inibiam de forma específica a resposta ao dador, enquanto que naqueles que sofreram rejeição aguda, os sobrenadantes respectivos estimulavam, de forma inespecífica, a resposta ao dador. Curiosamente, os sobrenadantes só demonstraram a capacidade de inibição se correspondiam a culturas de biópsia aspirativa, do dia 7 pós-transplantação, nos receptores estáveis. Por outro

lado, sobrenadantes de culturas de biópsia aspirativa, feita ao dia 7 pós-transplantação em receptores que iriam sofrer, alguns dias mais tarde, uma crise imunológica, demonstravam uma capacidade estimulatória inespecífica da resposta ao dador.

Estes resultados demonstram que para haver inibição pelos sobrenadantes é necessária a presença de antigéneos do dador e, por outro lado, que aos 30 dias, as biópsias aspirativas destes receptores já não possuem a capacidade de libertar esse(s) factor(es) solúvel (eis) inibidor(es).

A análise de factores de crescimento que fizemos no capítulo VII não permitiu o esclarecimento de qual factor poderia estar envolvido na inibição específica observada. Inesperadamente, IL-12 foi sintetizada em maior quantidade nas culturas da biópsia aspirativa dos receptores estáveis. Não temos explicação para este dado. TGF- β 1 e TGF- β 2 também não permitiram a diferenciação entre os dois grupos de receptores. O kit usado para medir TGF- β 2 é muito recente e soubemos, já depois do seu uso, através de comunicação pessoal do fabricante, que têm ocorrido alguns problemas de ligação do anticorpo usado na identificação de TGF- β 2, por isso, não podemos estar completamente confiantes nos resultados e contamos repetir esta análise com um novo kit que o laboratório irá disponibilizar brevemente.

TGF- β 1 foi produzido em quantidade maior, sem atingir a significância pelos receptores do grupo de rejeição aguda. Embora esta citocina seja mais conhecida como um factor inibidor do crescimento celular, particularmente dos linfócitos T (Coupes e col., 1994) e ciclosporina A, promove um aumento de TGF- β 1 nas células justaglomerulares do rato (Shehata e col., 1995), TGF- β 1 pode ter efeitos estimuladores, quer em sinergia com IL-2 (Zhang e col., 1995), quer via mecanismos independentes de IL-2 e IL-4 (Lee e Rich, 1991). Mais ainda, TGF- β 1 pode promover o desvio para Th1 com maturação de T CD8 citotóxicos (Mosmann e Sad, 1996). Além disso, num estudo da presença de TGF- β 1 no soro e na urina de transplantados renais, os autores não encontraram diferenças significativas entre receptores estáveis, com rejeição aguda ou crónica (Coupes e col., 1994).

Como tínhamos demonstrado uma maior síntese de IL-1ra nas culturas da biópsia aspirativa dos estáveis (cap.VI), pensámos que seria útil o estudo de IL-13, que entre outras acções, promove a síntese de IL-1ra por monócitos-macrófagos (Muzio e col., 1994). Não foi esse o caso.

Convém lembrar que o nosso modelo de CML utiliza monócitos-macrófagos como células apresentadoras de antigéneo e, não, células dendríticas. Danzer e colaboradores demonstraram a grande capacidade de IL-4 e IL-10 em inibir CML, em que células dendríticas estão ausentes (Danzer e col., 1994). Como tínhamos dito, IL-1ra também pode inibir a CML.

Deste modo pensámos que IL-10 e IL-1ra são os candidatos mais prováveis para assumirem esse papel de inibidores. Sendo assim, talvez os monócitos-macrófagos sejam as células que inibem a resposta ao dador nos receptores estáveis.

Outras hipóteses se podem pôr. Apesar de não termos registado diferenças significativas na síntese de GM-CSF entre os receptores estudados, GM-CSF estava mais elevado nos estáveis, embora em quantidades pequenas. Fu (Fu e col., 1996) demonstrou que células apresentadoras de antigéneo, deficientes em moléculas de coestimulação e incubadas com baixas concentrações de GM-CSF, induzem anergia para T. Contudo, a hiporresposta também se observava para testemunhos, o que nós não observámos. Interessantemente, células tubulares renais sintetizam GM-CSF in vitro, mas provavelmente esta capacidade in vivo deverá ser irrelevante, já que a alta concentração de proteoglicanos, na matriz que rodeia as células tubulares, liga GM-CSF, inibindo a sua acção (Stephens e col., 1996).

A supressão da CML também poderia ter sido mediada por IL-16, uma nóvel citocina produzida por células mononucleares, quemoatractiva para linfócitos e que, também, pode inibir a resposta proliferativa a antigéneo (Center e col., 1996). Contamos avaliar a produção desta citocina, quando for possível.

O estudo citofluorométrico revelou um padrão de linfócitos T, no fim das CML inibidas, compatível com anergia de T (cap.VII). Outros autores (Fournel e col., 1996) estudaram o efeito de anticorpo anti-CD4 nas CML, no homem e observaram

que apesar de CML ser inibida por este anticorpo monoclonal, a expressão de vários marcadores de activação linfocitária, no fim da CML, não mudava, comparada com as CML de controlo não inibidas. Curiosamente, a expressão de CD69 elevava-se no fim da CML inibida, se bem que de forma não significativa, de $5\pm 1\%$ para $8\pm 4\%$. Já tínhamos comentado a maior expressão nas punções aspirativas de CD3CD69, comparada com a observada no sangue periférico, nos receptores estáveis.

A hiporresposta ao dador, comparada com os testemunhos nos receptores livres de rejeição aguda, pode ter sido mediada pelas células do aloenxerto. Como dissemos, as células tubulares renais podem apresentar antigéneo. No entanto, as células tubulares renais são pobres em moléculas envolvidas no segundo sinal de activação linfocitária, como B7, DR e LFA/ICAM (Linsley e Ledbetter, 1993; Townsend e Bodmer, 1989; Austyn, 1992; Hourmant e col., 1996). Além disso, não está ainda estudada a forma como as células renais processam o antigéneo. Mesmo assim, a ausência de expressão de B7 não parece estar envolvida na diminuição da resposta de T a antigéneo (Singer e col., 1993). Se as células tubulares renais processarem o antigéneo de forma diferente das células apresentadoras profissionais, talvez estejamos em presença duma activação por peptídeos ligantes alterados. Estes peptídeos poderão ligar-se a moléculas do complexo major de histocompatibilidade, de maneira que o receptor do linfócito T vê-o duma maneira diferente, resultando uma estimulação de algumas funções, mas, não, todas, efectoras associadas (Evavold e col., 1993).

Já foi demonstrada que esta activação parcial de T aumenta a expressão do receptor de IL-2, aumenta o volume celular, mas não promove a proliferação celular, nem a síntese de citocinas, nem a hidrólise de fosfoinositol (Evavold e col., 1993,a; Sloan-Lancaster e col., 1993). Curiosamente, pode promover a citotoxicidade de T, o que poderá explicar a observação de T citotóxicos infiltrantes nos aloenxertos renais, em ratos, não acompanhada de crise imunológica.

Pensamos que o estudo de transplantados renais por CML pode contribuir, quer como guia para a terapêutica imunossupressora, principalmente, nos casos de hiporresposta clara específica para o dador, em que consideramos que uma redução cautelosa da imunossupressão poderá estar indicada, quer no cenário oposto, em que

se observe uma resposta ao dador idêntica ao testemunho, situação que em nosso entender aconselhará a uma maior prudência na diminuição protocolada da imunossupressão, quer ainda numa maior frequência de observações dos receptores na consulta de pós-transplante.

Finalmente, nos vários capítulos não encontramos influência do painel de anticorpos linfocitotóxicos nas várias análises feitas. Cremos, no entanto, que isto apenas reflecte o baixo número de receptores sensibilizados no grupo de doentes estudados.

IX- Resumo

Estudámos, em receptores de transplante de rim de cadáver, as células infiltrantes no aloenxerto, obtidas por punção aspirativa.

As observações que consideramos mais relevantes são as seguintes:

1- possibilidade de estabelecer culturas celulares a partir das amostras das punções;

2- diferentes capacidades de proliferação celular, consoante as amostras tivessem origem em receptores livres de rejeição aguda ou em receptores estáveis, sendo a proliferação significativamente superior nos que sofriam crise imunológica;

3- estudo citofluorométrico confirmou a diferença entre linfócitos T do sangue periférico versus os linfócitos T presentes nos aspirados, com maior diferença nos receptores com rejeição aguda do que nos estáveis;

4- conjugando os resultados observados na citometria de fluxo dos aspirados para os fenótipos CD3DR, CD8DR, CD8CD57, menos a expressão de CD4CD45RA, adicionados aos quocientes aspirado/sangue periférico das expressões de CD3CD25 e CD3DR, conseguimos bons valores de sensibilidade, especificidade, preditor positivo e preditor negativo para o diagnóstico de rejeição aguda;

5- receptores com rejeição crónica também exibiram um padrão de activação linfocitária, desta vez, quer no sangue periférico, quer no aspirado;

6- a introdução de Neoral™ foi seguida por um menor índice de activação de T, quer no sangue periférico, quer no aspirado, em receptores estáveis, particularmente, o quociente CD4CD45RA/CD4CD29 que subiu de forma significativa;

7- as culturas da biópsia aspirativa produziram citocinas, mostrando um padrão tipo Th0/Th2, nos receptores estáveis, tipo Th1, naqueles que iam sofrer crise de rejeição, assim como, durante a crise imunológica (com raras excepções) e Th2, nos receptores com rejeição crónica;

8- a avaliação de IL-2 é muito útil para a previsão e diagnóstico de rejeição aguda;

9- confirmámos a associação de monócitos-macrófagos com rejeição aguda vascular e corticorresistente;

10- IL-1ra e IL-6 foram produzidas em quantidades superiores, de forma significativa, pelas culturas de punção aspirativa, feitas aos 7 dias pós-transplante, entre receptores que vão permanecer livres de rejeição, comparadas com aquelas de receptores que iriam sofrer, ou já sofriam rejeição aguda;

11- MIP-1 α e M-CSF foram sintetizados, em quantidades significativamente superiores, por receptores com rejeição crónica, comparativamente com aqueles com rejeição aguda;

12- estudados por cultura mista linfocitária, 6-12 meses pós-transplante, receptores livres de rejeição exibiram hiporresposta específica para o dador, enquanto que aqueles que tinham sofrido rejeição aguda não mostraram este padrão de hiporresposta;

13- culturas de biópsia aspirativa, feita 7 dias pós-transplante, em receptores que permaneceram livres de rejeição, produziram um factor solúvel, supressor, específico da resposta anti-dador, o que não foi observado naqueles que iriam sofrer crise de rejeição (este factor poderá ser IL-1ra e/ou IL-10);

14- de acordo com o estudo citofluorométrico, feito nos linfócitos T do fim das CML, inibidas ou estimuladas pelos sobrenadantes das culturas das punções aspirativas, a hiporresposta ao dador foi, provavelmente, causada por anergia de T.

X- Summary

Graft-infiltrating cells, procured by fine-needle aspiration biopsy (FNAB), were studied on kidney transplant patients.

The main observations were the following:

- 1- we were successful in establish cell cultures derived from FNAB samples;
- 2- FNAB cultures from acutely rejecting patients displayed significantly higher proliferative responses than those from stable ones;
- 3- cytofluorometric study showed several significant differences on comparing peripheral blood (PBL) T lymphocytes versus FNAB lymphocytes, the differences being even greater among acutely rejecting patients than among stable ones;
- 4- the sum of scores of FNAB expression of CD3DR, CD8DR, CD8CD57 plus the ratios FNAB/PBL for CD3CD25 and CD3DR minus CD4CD45RA expression allowed an accurate acute rejection diagnosis, with appropriate sensitivity, specificity, positive and negative predictive values;
- 5- chronic rejecting patients displayed greater T lymphocyte activation scores by cytofluorometric analysis than stable patients, both on PBL and on FNAB;
- 6- Neoral™ treatment was followed by a significant downregulation of several activation markers expression on PBL and on FNAB samples compared to previous CsA formulation, in stable patients; CD4CD45RA/CD4CD29 ratio rose significantly on both sample sites;
- 7- FNAB cultures presented different cytokine pattern production with different situations: Th0/Th2 in stable patients, Th1 in acute rejection ones, including at a median of 10 days before rejection and Th2 in chronic rejection;
- 8- IL-2 evaluation proved to constitute a powerful acute rejection predictor as well as acute rejection confirmation test;
- 9- monocyte-macrophage were associated with vascular/corticorresistant acute rejection;
- 10- cultures of FNAB done on day 7 post-transplantation of rejection-free patients synthetized significantly more IL-1ra and IL-6 than FNAB from either those

who were going to develop an immunologic crisis a few days later or were enduring a rejection crisis;

11- MIP-1 α and M-CSF were produced at significantly higher amounts by chronic rejecting FNAB cultures than from acute rejection samples cultures;

12- rejection-free patients studied 6-12 months post-transplantation showed a hyporresponse towards the respective donors, evaluated by mixed lymphocyte reactions (MLR) and this was specific, contrary to what was observed in patients who had endured an acute rejection;

13- cultures of FNAB done on day 7 post-transplantation in rejection-free patients produced a soluble, suppressive, specific factor of anti-donor response, evaluated by MLR, while acutely rejecting ones, both on day 7 (a median of 10 days before rejection) and on rejection day FNAB did not synthesize such factor; IL-1ra and/or IL-10 might be surmised to constitute this factor;

14- cytofluorometric study of T cells recovered at the end of suppressed and stimulated MLR did not reveal any significant differences between them, pointing to T cell anergy as the mechanism of hyporresponse.

XI- Résumé

Nous avons étudié les cellules infiltrées dans la greffe rénale, obtenues par des ponctions aspiratives.

Les résultats les plus importants sont les suivants:

1- la démonstration de la possibilité d'établir des cultures cellulaires dérivées des ponctions aspiratives;

2- la prolifération cellulaire du matériel aspiré auprès des malades subissant un rejet aigu a été supérieure, de forme significative, à la prolifération enregistrée dans les malades sans rejet;

3- l'étude par cytométrie de flux a démontré des différences significatives, en faisant la comparaison entre les lymphocytes T du sang périphérique par rapport à ceux qui étaient présents dans les ponctions, étant ces différences plus grandes dans les malades souffrant un rejet aigu que dans les malades stables;

4- l'addition de l'expression des sous-types lymphocytaires CD3DR, CD8DR et CD8CD57 aux ponctions avec les quotients ponction/sang périphérique de l'expression CD3CD25 et CD3DR, moins l'expression de CD4CD45RA a permis de faire le diagnostic du rejet aigu, présentant des taux hauts de sensibilité, de spécificité, aussi bien que des très bonnes valeurs prédictives positive et négative;

5- le rejet chronique a été accompagné par l'activation des cellules T, soit dans les sangs périphériques soit dans les ponctions, par rapport aux malades stables;

6- Neoral™ a produit une diminution significative des indicateurs d'activation des lymphocytes T par rapport à l'ancienne formulation de CsA, dans les malades stables, soit dans les sangs périphériques soit dans les ponctions; le quotient CD4CD45RA/CD4CD29 a monté significativement dans les deux sites;

7- les cultures des ponctions aspiratives ont produit des cytokines type Th0/Th2 dans les malades stables, Th1, dans les autres qui souffraient, ou allaient souffrir un rejet aigu et Th2, dans les malades présentant un rejet chronique;

8- IL-2 s'est montrée très puissante pour la prévision et la confirmation du rejet aigu;

9- les monocytes-macrophages se sont associés aux rejets vasculaires/corticorésistants;

10- IL-1ra et IL-6 ont été produites en quantités supérieures par les cultures des ponctions aspiratives des malades sans rejet, par rapport à ceux qui allaient souffrir ou souffraient un rejet aigu;

11- MIP-1 α et M-CSF ont été produits davantage par les cultures des ponctions aspiratives des malades souffrant un rejet chronique, par rapport aux malades souffrant un rejet aigu;

12- les malades sans rejet, étudiés 6-12 mois post-transplantation, ont présenté une hyporéponse aux donneurs, spécifique, évaluée par la culture mixte lymphocitaire (CML), au contraire des malades qui ont souffert un rejet aigu;

13- les cultures des ponctions, faites au 7^{ème} jour post-transplantation, dans les malades sans rejet, ont produit un facteur soluble, suppresseur et spécifique de la réponse anti-donneur, évaluée par CML, au contraire de ceux qui allaient souffrir ou souffraient un rejet aigu et qui n'ont pas produit ce facteur, qu'on soupçonne être IL-1ra et/ou IL-10;

14- d'après l'étude par cytométrie de flux des cellules T, récupérées à la fin des CML, qui ont été, soit inhibées, soit stimulées par les surnaisants des cultures des ponctions, qui n'a pas montré de différences entre elles, nous croyons que ces cellules T des malades sans rejet étaient anérgiques.

XII- Bibliografia

Abbott F, Ryan JJ, Ceska M, Matsushima K, Sarraf CE, Rees AJ (1991). Interleukin-1 beta stimulates human mesangial cells to synthesize and release interleukin-6 and -8. *Kidney Int*, 40:597-605.

Abramowicz D, Goldman M, de Pauw L, Vanherweghem JL, Kinnaert P, Vereerstraeten P (1992). The long-term effects of prophylactic OKT3 monoclonal antibody in cadaver kidney transplantation - a single-center, prospective, randomized study. *Transplantation*, 54:433-437.

Akira S, Taga T, Kishimoto T (1993). Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol*, 54:1-78.

Alard P, Lantz O, Perrot JY, Chavanel G, Senik A, Charpentier B (1993). A possible role for specific "anergy" in immunologic hyporeactivity to donor stimulation in human kidney allograft recipients. *Transplantation*, 55:277-283.

Allen RD, Staley TA, Sidman CL (1993). Differential cytokine expression in acute and chronic murine graft-versus-host-disease. *Eur J Immunol*, 23:333-337.

Armstrong HE, Bolton EM, McMillaan I, Spencer SC, Bradley JA (1987). Prolonged survival of actively enhanced rat renal allografts despite accelerated cellular infiltration and rapid induction of both class I and class II MHC antigens. *J Exp Med*, 164:891-897.

Atkins RC (1995). Interleukin-1 in crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int*, 48:576-586.

Atkins RC, Holdworth SR, Glasgow EF, Matthews FE (1976). The macrophage in human rapidly progressive glomerulonephritis. *Lancet*, I:830-832.

Austyn JM (1992). Antigen uptake and presentation by dendritic leukocytes. *Seminar Immunol*, 4:227-236.

Austyn JM, Larsen CP (1990). Migration patterns of dendritic leukocytes. *Transplantation*, 49:1-7.

Baccarini M, Scwinzer R, Lohmann-Matthes ML (1989). Effect of human recombinant IL-2 on murine macrophage precursors. Involvement of a receptor distinct from the p55 (Tac) protein. *J Immunol*, 142:118-125.

Barone G, Chang CT, Choc MGJ, Klein JB, Marsh CL, Meligeni JA, Min DI, Pescovitz MD, Pollak R, Pruett TL, Stinson JB, Thompson JS, Vasquez E, Waid T, Wombolt DG, Wong RL (1996). The pharmacokinetics of a microemulsion formulation of cyclosporine in primary renal allograft recipients. *Transplantation*, 61:875-880.

Batiuk TD, Urmson J, Vincent D, Yatscoff RW, Halloran PF (1996). Quantitating immunosuppression. *Transplantation*, 61:1618-1624.

Bennet WM, Pulliam JP (1983). Cyclosporine nephrotoxicity. *Ann Intern Med*, 99:851-854.

Benson A, Ziegler HK (1989). Macrophages as targets for inhibition by cyclosporine. *Transplantation*, 47:696-703.

Berthoux FC, Jones EHP, Mehls O, Valderrábano F, on behalf of the EDTA-ERA Registry (1996). *Nephrol Dial Transplant*, 11(Suppl 1):37-40.

Binder J, Hancock WW, Wasowska B, Gallon L, Watschinger B, Sayegh MH, Brock J, Lehmann M, Volk HD, Kupiec-Weglinski JW (1995). Donor-specific transplantation unresponsiveness in sensitized rats following treatment with a nondepleting anti-CD4

mAB is associated with selective intragraft sparing of Th2-like cells. *Transplant Proc*, 27:114-116.

Bishop GA, Hall BM (1989). Expression of leukocyte and lymphocyte adhesion molecules in the human kidney. *Kidney Int*, 36:1078-1085.

Bishop GA, Rokahr KL, Napoli J, McCaughan GW (1993). Intragraft cytokine mRNA levels in human liver allograft rejection analysed by reverse transcription and semiquantitative polymerase chain reaction amplification. *Transplant Immunol*, 1:253-261.

Blackman MA, Kappler JW, Marrack P (1988). T cell specificity and repertoire. *Annu Rev Immunol*, 101:5-20.

Bland P (1988). MHC class II expression by the gut epithelium. *Immunol Today*, 9:174-178.

Bloom RD, Florquin S, Singer GG, Brennan DC, Rubin-Kelley V (1993). Colony stimulating factor-1 in the induction of lupus nephritis. *Kidney Int*, 43:1000-1009.

Bogman MJTT (1995). Fine-needle aspiration biopsy of the renal transplant - is it worthwhile or a waste of time? *Nephrol Dial Transplant*, 10:2182-2184.

Bonneville M, Moreau JF, Blokland E, Pool J, Moisan JP, Goulmy E, Souillou JP (1988). T lymphocyte cloning from rejected human kidney allograft. *J Immunol*, 141:4187-4195.

Borel JF (1981). The history of cyclosporine A and its significance. In *Cyclosporin A*, McMillan Publishing Co, Proceedings of an International Conference on Cyclosporin A, ed. White DSG.

Brady HR, Serhan CN (1996). Lipoxins: putative braking signals in host defense, inflammation and hypersensitivity. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 5:20-27.

Briggs WA, Gao Z-H, Xing J-J, Scheel Jr PJ, Gimenez LF, Burdick JF (1996). Heterogeneity of dialysis patient lymphocyte responses to cyclosporine. *Transplant Proc*, 28:2063-2065.

Brockmeyer C, Ulbrecht M, Schendel DJ, Weiss EH, Hillebrand G, Burkhardt K, Land W, Gokel MJ, Riethmuller G, Feucht HE (1993). Distribution of cell adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1) in renal tissue during allograft rejection. *Transplantation*, 55:610-615.

Bromberg JS (1995). IL-10 immunosuppression in transplantation. *Curr Opin Immunol*, 7:639-643.

Burgeon K, Cuturi M-C, Hallet J, Paineau J, Chabannes D, Souillou J-P (1992). Peripheral tolerance of an allograft in adult rats-characterization by low interleukin-2 and interferon- γ mRNA levels and by strong accumulation of major histocompatibility complex transcripts in the graft. *Transplantation*, 54:219-225.

Calne RY, White DJG, Thiru S, Evans DR, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Pentlow BD (1978). Cyclosporine A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet*, 2:1323-1327.

Cambier JC, Pleiman CM, Clark MR (1994). Signal transduction by the B cell antigen receptor and its coreceptors. *Annu Rev Immunol*, 12:457-486.

Carlquist JF, Hammond EH, Anderson JL (1988). Propagation and characterization of lymphocytes from rejecting human cardiac allografts. *J Heart Transplant*, 397:402-407.

Carter LL, Dutton RW (1996). Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets. *Curr Opin Immunol*, 8:336-342.

Center DM, Kornfeld H, Cruikshank (1996). Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol Today*, 17:476-481.

Chadburn A, Inghirami G, Knowles DM (1992). The kinetics and temporal expression of T cell activation associated antigens CD15 (leuM1) CD30 (ki-1) EMA and CD11c (leuM5) by benign activated T cells. *Haematol Pathol*, 6:193-202.

Chatenoud L, Chkoff N, Kreis H, Bach JF (1983). Interest in and limitations of monoclonal anti-T cell antibodies for the follow-up of renal transplant patients. *Transplantation*, 36:45-50.

Chen N, Field EH (1995). Enhanced type 2 diminished type 1 cytokines in neonatal tolerance. *Transplantation*, 59:933-941.

Chen N, Gao Q, Field EH (1996). Prevention of Th1 responses is critical for tolerance. *Transplantation*, 61:1076-1083.

Chen W-F, Zlotnik A (1991). IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol*, 147:528-534.

Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P (1995). Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T cells. *Science*, 270:1811-1815.

Cohen AH, Gonzalez S, Nast CC, Wilkinson A, Danovitch GM (1991). Frozen-section analysis of allograft renal biopsy specimens. Reliable histopathologic data for rapid decision making. *Arch Pathol Lab Med*, 115:386-389.

Colvin RB (1996). The renal allograft biopsy. *Kidney Int*, 50:1069-1082.

Cosimi AB (1987). Clinical development of Orthoclone OKT3. *Transplant Proc*, 19 (2 Suppl 1):7-16.

Coupes BM, Newstead CG, Short CD, Brenchley PEC (1994). Transforming growth factor β 1 in renal allograft recipients. *Transplantation*, 57:1727-1731.

Cresswell P (1994). Assembly, transport and function of MHC Class II molecules. *Annu Rev Immunol*, 12:259-293.

Croft M, Bradley LM, Swain SL (1994). Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. *J Immunol*, 152:2675-2685.

Croft M, Swain SL (1995). Recently activated naive CD4 T cells can help resting B cells, and can produce sufficient autocrine IL-4 to drive differentiation to secretion of T helper 2-type cytokines. *J Immunol*, 154:4269-4282.

Dallman MJ (1992). The cytokine network and regulation of the immune response to organ transplants. *Transplant Revs*, 6:209-217.

Dallman MJ (1995). Mechanisms of graft rejection, in: *The handbook of transplant immunology*, edited by Kathryn Wood, MedSci publications:87-112.

Dallman MJ (1995). Cytokines and transplantation: Th1/Th2 regulation of the immune response to solid organ transplants in the adult. *Curr Opin Immunol*, 7:632-638.

Dallman MJ, Larsen CP, Morris PJ (1991). Cytokine gene transcription in vascularised organ grafts: analysis using semiquantitative polymerase chain reaction. *J Exp Med*, 174:493-496.

Dallman MJ, Shiho O, Page TH, Wood KJ, Morris PJ (1991,a). Peripheral tolerance to alloantigen results from altered regulation of the interleukin 2 pathway. *J Exp Med*, 173:79-87.

D'Andrea A, Aste-Amezaga, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G (1993). Interleukin-10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon- γ -production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med*, 178:1041-1048.

Danis VA, Millington M, Hyland VJ, Grennan D (1995). Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol*, 99:303-310.

Danzer SG, Kirchner H, Rink L (1994). Cytokine interaction in human mixed lymphocyte culture. *Transplantation*, 57:1638-1642.

de Lange WE, Doorenbos H (1975). Corticotrophins and corticosteroids, in: Dukes MNG, ed. *Meyler's side effects of drugs: a survey of unwanted effects of drugs reported in 1972-1975*. Excerpta Medica, vol 8:812.

de Waal-Malefyt R, Haanen J, Spits H, Rancorolo M-G, te Velde A, Fidgor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE (1991). Interleukin-10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigenic-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*, 174:915-924.

de Waal-Malefyt R, Yssel H, Roncarolo MG, Spits H, de Vries JE (1992). Interleukin-10. *Curr Opin Immunol*, 4:314-320.

Dinarello CA, Wolff SM (1993). The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med*, 328:106-113.

Ding L, Linsley PS, Huang L-Y, Germain RN, Shevach EM (1993). IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol*, 151:1224-1234.

Dooper IM, Bogman MJ, Hoitsma AJ, Maass CN, Assmann KJ, Koene RA (1992). Detection of interstitial increase in macrophages, characteristic of acute interstitial rejection, in routinely processed renal allograft biopsies using the monoclonal antibody KP1. *Transplant Int*, 5:209-213.

Dooper IM, Hoitsma AJ, Maass CN, Assmann KJM, Tax WJM, Koene RAP, Bogman JJT (1994). The extent of peritubular CD14 staining in renal allografts as an independent immunohistological marker for acute rejection. *Transplantation*, 58:820-827.

Dousset B, Hubscher SG, Padbury RTA, Gunson BK, Buckels JAC, Mayer AD, Elias E, McMaster, Neuberger JM (1993). Acute liver allograft rejection - is treatment always necessary? *Transplantation*, 55:529-534.

Duquesnoy RJ (1990). Second International Conference on graft-infiltrating cells. *Hum Immunol*, 28-40.

Duquesnoy RJ, Trager JDK, Zeevi A (1991). Propagation and characterization of lymphocytes from transplant biopsies. *Critical Rev in Immunol*, 10:455-480.

Ellis TM, Berry CR, Mendez-Picon G, Goldman MH, Lee HM, Lower RR, Mohanakumar T (1982). Immunological monitoring of renal allograft recipients using monoclonal antibodies to human T lymphocyte subpopulations. *Transplantation*, 33:317-319.

Emara M, Sanfilippo F (1989). Human suppressor T cells induced in vitro with an autologous renal allograft-derived T cell line. *Transplantation*, 47:364-371.

Evavold BD, Sloan-Lancaster J, Allen PM (1993). Tickling the TCR: selective T cell functions stimulated by altered peptide ligands. *Immunol Today*, 14:602-609.

Evavold BD, Sloan-Lancaster J, Hsu BL, Allen PM (1993,a). Separation of T helper 1 clone cytotoxicity from proliferation and lymphokine production using analog peptides. *J Immunol*, 150:3131-3140.

Fanges O, Morris PJ, Dallman MJ (1995). Spontaneous acceptance of liver allografts is associated with an early downregulation of intragraft IL-4 mRNA expression. *Hepatology*, 21:767-775.

Fanslow WC, Clifford KN, Park LS, Rubin AS, Voice RF, Beckman MP, Widmer MB (1991). Regulation of alloreactivity in vivo by IL-4 and the soluble IL-4 receptor. *J Immunol*, 147:535-540.

Faull RF, Russ GR (1990). Tubular expression of intercellular adhesion molecule-1 during renal allograft rejection. *Transplantation*, 1990, 48:226-230.

Fitch FW, Mckisic MD, Lancki DW, Gajewski TF (1993). Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu Rev Immunol*, 11:29-48.

Fournel S, Vincent C, Assoussou O, Gorman SD, Robinet E, Phillips JM, Flacher M, Cordier G, Waldmann H, Revillard JP (1996). CD4 mAbs prevent progression of alloactivated CD4⁺ T cells into the S phase of the cell cycle without interfering with early activation signals. *Transplantation*, 62:1136-1143.

Frank J, Engler-Blum G, Rodemann HP, Muller GA (1993). Human renal tubular cells as a cytokine source: PDGF-b, GM-CSF and IL-6 mRNA expression in vitro. *Exp Nephrol*, 1:26-35.

Frankel AH, Sayegh MH, Rothstein DM, Milford EL, Carpenter CB (1989). Requirements for the induction of allospecific CD8⁺ suppressor T cells in the rat primary mixed lymphocyte response. *Transplantation*, 48:639-646.

Fu F, Li Y, Qiang S, Lu L, Chambers F, Starzl TE, Fung JJ, Thompson AW (1996). Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II⁺, CD80^{dim}, CD86⁻) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients. *Transplantation*, 62:659-665.

Fung JJ, Zeevi A, Kaufman C, Paradis IL, Dauber JH, Hardesty RL, Griffith B, Duquesnoy RJ (1985). Interactions between bronchoalveolar lymphocytes and macrophages in heart-lung transplant recipients. *Hum Immunol*, 14:287-292.

Gaber LW, Gaber AO, Tolley EA, Hathaway DK (1992). Prediction by post-revascularization biopsies of cadaveric kidney allografts of rejection, graft loss, and preservation nephropathy. *Transplantation*, 53:1219-1225.

Gaber LW, Shroeder TJ, Moore LW, Shakouh-Amiri MH, Gaber AO (1996). The correlation of Banff scoring with reversibility of first and recurrent rejection episodes. *Transplantation*, 61:1711-1715.

Gajewski TF, Schell SR, Nau G, Fitch FW (1989). Regulation of T cell activation: differences among T-cell subsets. *Immunol Rev*, 111:79-110.

Germain RN, Margulies DH (1993). The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol*, 11:403-450.

Gibson IW, Marcussen N, Brown RW, Solez K, Truong LD (1996). The use of immunocytochemistry (LCA and Leu-7) in diagnosis of renal allograft rejection. *Transplant Proc*, 28:457-464.

Go NF, Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W, Mosmann TR, Moore KW, Howard M (1990). Interleukin 10 a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J Exp Med*, 172:1625-1631.

Gordon MY (1991). Hemopoietic growth factors and receptors: bound and free. *Cancer Cells*, 3:127-133.

Goto S, Lord R, Kobayashi E, Vari F, Edwards-Smith C, Kamada N (1996). Novel immunosuppressive proteins purified from the serum of liver-transplanted rats. *Transplantation*, 61:1147-1151.

Goulmy E, Blokland E, Persijn G, Paul LC, Wilmink J, van Rood JJ (1985). HLA regulates postrenal transplant CML nonreactivity. *J Immunol*, 135:3082-3086.

Goulmy E, Persijn G, Blokland E, D'Amaro J, van Rood JJ (1981). Cell-mediated lympholysis studies in renal allograft recipients. *Transplantation*, 31:210-217.

Gray DWR, Richardson A, Hughes D, Fuggle S, Dunnill M, Higgins R, McWhinnie D, Morris PJ (1992). A prospective, randomized, blind comparison of three biopsy techniques in the management of patients after renal transplantation. *Transplantation*, 53:1226-1232.

Grey ST, Tsuchida A, Hau H, Orthner CL, Salem HH, Hancock WW (1994). Selective inhibitory effects of the anticoagulant activated protein C on the responses of human mononuclear phagocytes to LPS, IFN- γ , or phorbol ester. *J Immunol*, 153:3664-3672.

Grimm EA, Robb RJ, Roth JA, Neckers LM, Lachman LB, Wilson DJ, Rosenberg SA (1983). Lymphokine-activated killer cell phenomenon. III. Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells. *J Exp Med*, 158:1356

Gulanikar AC, MacDonald AS, Sungartekin U, Belitsky P (1992). The incidence and impact of early rejection episodes on graft outcome in recipients of first cadaver kidney transplants. *Transplantation*, 53:323-328.

Hadley GA, Mohanakumar T (1993). Kidney cell-restricted recognition of MHC class I alloantigens by human cytolytic T cell clones. *Transplantation*, 55:400-404.

Hadley GA, Linders B, Mohanakumar T (1992). Immunogenicity of MHC class I alloantigens expressed on parenchymal cells in the human kidney. *Transplantation*, 54:537-542.

Hagerty DT, Allen PM (1992). Processing and presentation of self and foreign antigens by the renal proximal tubule. *J Immunol*, 148:2324-2330.

Halwani F, Guttman RD, Sainte-Croix H, Prud'homme GJ (1992). Identification of natural suppressor cells in long-term renal allograft recipients. *Transplantation*, 54:973-977.

Hancock WW, Sayegh MH, Kwok CA, Weiner HL, Carpenter CB (1993). Oral, but not intravenous, alloantigen prevents accelerated rejection by selective intragraft Th2 cell activation. *Transplantation*, 55:1112-1118.

Harcombe AA, Cary NR, Mullins P, Sharples LD, Schofield PM, Large SR, Wallwork J, Weissberg PL, Borysiewicz LK (1994). Lymphocyte culture from endomyocardial biopsies. *Transplantation*, 58:1277-1279.

Haug CE, Colvin RB, Delmonico FL, Auchincloss HJ, Tolkoff-Rubin N, Preffer FI, Rothlein R, Norris S, Scharschmidt L, Cosimi B (1993). A phase I trial of immunosuppression with anti-ICAM-1 (CD54) mAb in renal allograft recipients. *Transplantation*, 55:766-773.

Hayry P, von Willebrand E (1981). Practical guidelines for fine needle aspiration biopsy of human renal allografts. *Annals of Clin Res*, 13:288-306.

Hayry P (1989). Fine-needle aspiration biopsy in renal transplantation. *Kidney Int*, 36:130-141.

Hayry P, Isoniemi H, Yilmaz S, Mennander A, Lemstrom K, Raisanen-Sokolowski A, Koskinen P, Ustinov J, Lautenschlager I, Taskinen E, Krogems L, Aho P, Paavonen T (1993). Chronic allograft rejection. *Immunol Rev*, 134:134-181.

Heelan BT, Thompson M, McCormack A, Peters AM, Batchelor JR, George AJT (1996). The kinetics of MHC class I and II expression in rat renal allografts. *Transplantation*, 61:1274-1276.

Helderman JH (1995). Transplantation and the elderly. *Nephrol Dial Transpl*, 10:773-774.

Helderman JH, Hernandez J, Sagalowsky A, Dawidson I, Glennie J, Womble D, Toto RD, Brinker K, Hull AR (1988). Confirmation of the utility of fine-needle aspiration biopsy of the renal allograft. *Kidney Int*, 34:376-382.

Henney FC, Weening JJ, Baldwin WM, Oljans PJ, Tanke HJ, van Es LA Paul LC (1986). Expression of HLA-DR antigens on peripheral blood T lymphocytes and renal graft tubular epithelial cells in association with rejection. *Transplantation*, 42:479-483.

Hongwei W, Nanra RS, Stein A, Avis L, Price A, Hibberd AD (1994). Eosinophils in acute renal allograft rejection. *Transplant Immunol*, 2:41-46.

Hourmant M, Bedrossian J, Durand D, Lebranchu Y, Renoult E, Landrelier P, Buffet R, Soulillou JP (1996). A randomized multicenter trial comparing leukocyte function-associated antigen-1 monoclonal antibody with rabbit antithymocyte globulin as induction treatment in first kidney transplantations. *Transplantation*, 62:1565-1570.

Hsieh C-S, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM (1992). Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an $\alpha\beta$ T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:6065-6069.

Hsieh C-S, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM (1993). Development of Th1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by listeria-induced macrophages. *Science*, 260:547-549.

Hsu DH, Moore KW, Spits H (1992). Differential effects of IL-4 and IL-10 on IL-2-induced IFN-gamma synthesis and lymphokine-activated killer activity. *Int Immunol*, 4:563-569.

Hughes CC, Savage CO, Pober JS (1990). The endothelial cell as a regulator of T cell function. *Imm Rev*, 117:85-102.

Hume SR (1993). Renal transplantation: is the impact of new molecules acting on the immune system already clinically measurable? *J of Nephrol*, 6:6-11.

Hutchinson IV (1986). Suppressor T cells in allogeneic models. *Transplantation*, 41:547-555.

Ibrahim S, Dawson DV, Sanfilippo F (1995). Predominant infiltration of rejecting human renal allografts with T cells expressing CD8 and CD45RO. *Transplantation*, 59:724-728.

Ingulli E, Sharma V, Singh A, Suthanthiran M, Tejani A (1993). Steroid withdrawal, rejection and the mixed lymphocyte reaction in children after renal transplantation. *Kidney Int*, 44, Suppl 43:S36-S39.

Isobe M, Yagita H, Okumura K, Ihara A (1992). Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Science*, 255:1125-1127.

Jevnikar AM, Brennan DC, Singer GG, Heng JE, Maslinski W, Wuthrich RP, Glimcher LH, Rubin-Kelley VE (1991). Stimulated kidney tubular epithelial cells express membrane associated and secreted TNF α . *Kidney Int*, 40:203-211.

Johnson CP, Choharmonal A, Buchmann E, Roza AM, Adams MB (1990). Plasma IL-2 levels and diagnosis of renal transplant rejection. *Transplant Proc*, 22:1849-1851.

Kahan BD, Dunn J, Fitts C, van Buren D, Wombolt D, Pollak R, Carson R, Alexander JW, Choc M, Wong R, Hwang DS (1995). Reduced inter- and intrasubject variability in cyclosporine pharmacokinetics in renal transplant recipients treated with a microemulsion formulation in conjunction with fasting, low-fat, or high-fat meals. *Transplantation*, 59:505-511.

Kahan BD, Flechner SM, Lorber MI, Jensen C, Golden D, van Buren CT (1986). Complications of cyclosporine therapy. *World J Surg*, 10:348-360.

Kahan BD, Kerman RH, VanBuren CT, Flechner SM, Golden DL, Lewis RM (1989). Clinical outcome in 36 patients after at least one up to 5 years of steroid withdrawal based upon specific mixed lymphocyte reaction hyporesponsiveness toward the living related donor. *Transplant Proc*, 21:1579-1580.

Kahan BD, Welsh M, Schoenberg L, Rutzky L, Katz SM, Urbauer DL, van Buren CT (1996). Variable oral absorption of cyclosporine. *Transplantation*, 62:599-606.

Kamogawa Y, Minasi L, Carding SR, Bottomly K, Flavell RA (1993). The relationship of IL-4 and IFN γ -producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells. *Cell*, 75:985-995.

Kasiske BL, Heim-Duthoy K, Rao KV, Awni WM (1988). The relationship between cyclosporine pharmacokinetics parameters and subsequent acute rejection in renal transplant recipients. *Transplantation*, 46:716-722.

Katoh T, Lakkis FG, Makita N, Badr KF (1994). Co-regulated expression of glomerular 12/15-lipoxygenase and interleukin-4 mRNAs in rat nephrotoxic nephritis. *Kidney Int*, 46:341-349.

Kaufman C, Zeevi A, Zerbe T, Kormos R, Griffith B, Hardesty R, Duquesnoy RJ (1989). In vitro studies of endomyocardial biopsies from heart transplant recipients on RATG and OKT3 immunoprophylaxis protocols. *Transplantation*, 48:621-625.

Kekow J, Wachmann W, McCutchan JA, Gross WL, Zachariah M, Carson DA, Lotz M (1991). Transforming growth factor- β and suppression of humoral immune response in HIV infection. *J Clin Invest*, 87:1010-1016.

Kelner G, Zlotnik (1995). Cytokine production profile of early thymocytes and the characterization of a new class of chemokine. *J Leuko Biol*, 57:778-781.

Kerr PG, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY, Rainone S, Tesch G, Atkins RC (1994). Deoxyspergualin suppresses local macrophage proliferation in renal allograft rejection. *Transplantation*, 58:596-601.

Kim JM, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Khan TA, Moore KW (1992). Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J Immunol*, 148:3618-3623.

Kimball PM, Radovancevic B, Isom T, Spickard A, Frazier OH (1996). The paradox of cytokine monitoring - predictor of immunologic activity as well as immunologic silence following cardiac transplantation. *Transplantation*, 61:909:915.

Kirby JA, Rajasekar MR, Lin Y, Proud G, Taylor RMR (1993). Interaction between T lymphocytes and kidney epithelial cells during renal allograft rejection. *Kidney Int*, 43, Suppl 39:S124-S128.

Kirk AD, Ibrahim MA, Bollinger RR, Dawson DV, Finn OJ (1992). Renal allograft-infiltrating lymphocytes. *Transplantation*, 53:329-338.

Kita Y, Iwaki Y, Noguchi K, Griffith BP, Tzakis AG, Todo S, Fung JJ, Starzl TE (1996). Daily serum interleukin-6 monitoring in multiple organ transplantation with or without liver allografts. *Transplant Proc*, 28:1229-1234.

Knudsen PJ, Dinarello CA, Strom TB (1987). Glucocorticoids inhibit transcriptional and post-transcriptional expression of interleukin 1 in U937 cells. *J Immunol*, 139:4129-4134.

Kolbeck PC, Miceli C, Finn OJ, Bollinger RR, Sanfilippo F (1988). Relationships among renal allograft biopsy infiltrates, growth of T cell lines, and irreversible rejection. *Transplant Proc*, 20:303-305.

Kondo M, Takeshita T, Ishii N, Nakamura M, Watanabe S, Arai K-I, Sugamura K (1993). Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor γ chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science*, 262:1874-1877.

Kooijmans-Coutinho MF, Brujin JA, Hermans J, Schindler R, Frei U, Schrama E, van Es LA, Daha MR, van der Woude FJ (1995). Evaluation by histology, immunohistology and PCR of protocolized renal biopsies 1 week post-transplant in relation to subsequent rejection episodes. *Nephrol Dial Transplant*, 10:847-854.

Kooijmans-Coutinho MF, Hermans J, Schrama E, Ringers J, Daha MR, Bruijn JA, van Der Woude FJ (1996). Interstitial rejection, vascular rejection, and diffuse thrombosis of renal allografts. *Transplantation*, 61:1338-1344.

Koskinen P, Lemstrom K, Hayry P (1996). Chronic rejection. *Curr Opin Nephrol Hypert*, 5:269-272.

Krakauer H, Grauman JS, McMullen MR, Creede CC (1983). The recent U.S. experience in the treatment of end-stage renal disease by dialysis and transplantation. *N Engl J Med*, 308:1558-1563.

Kreis H, Mansouri R, Deschamps JM, Dandavino R, N'Guyen AT, Bach JF, et al (1981). Antithymocyte globulin in cadaver kidney transplantation: a randomized trial based on T-cell monitoring. *Kidney Int*, 19:438-444.

Krieger NR, Most D, Bromberg JS, Holm B, Huie P, Sibley RK, Dafoe DC, Alfrey EJ (1996). Coexistence of Th1- and Th2-type cytokine profiles in anti-CD2 monoclonal antibody-induced tolerance. *Transplantation*, 62:1285-1292.

Kuchle CCA, Thoenes GH, Langer KH, Schorlemmer HU, Bartlett RR, Schleyerbach R (1991). Prevention of kidney and skin allograft rejection in rats by felfunomide, a new immuno-modulating agent. *Transplant Proc*, 23:1083-1086.

Kumano K, Irie A, Mashimo S, Endo T, Koshiba K (1996). Changes in urinary interleukin-2 in kidney transplant recipients. *Transplant Proc*, 28:1248-1249.

Kupiec-Weglinski JW, Filho MA, Strom TB, Tilney NL (1984). Sparing of suppressor cells: a critical action of cyclosporine. *Transplantation*, 38:97-101.

Kusaka S, Grailer AP, Fechner JHJ, Burlingham WJ (1995). Evidence for a possible Th2 bias in human renal transplant tolerance. *Transplant Proc*, 27:225-226.

Kutner NG, Brogan D, Kutner MH (1986). End-stage renal disease treatment modality and patients' quality of life: Longitudinal assessment. *Am J Nephrol*, 6:396-402.

Kutukculer N, Clark K, Rigg KM, Forsythe JLR, Proud G, Taylor RMR, Shenton BK (1995). The value of posttransplant monitoring of interleukin (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, and soluble CD23 in the plasma of renal allograft recipients. *Transplantation*, 59:333-340.

Lan HY, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC (1995). Local macrophage proliferation in the progression of glomerular and tubulointerstitial injury in rat anti-GBM glomerulonephritis. *Kidney Int*, 48:753-760.

Lan Y, Nikolic-Paterson DJ, Zarama M, Vannice JL, Atkins RC (1993). Suppression of experimental glomerulonephritis by the IL-1 receptor antagonist. *Kidney Int*, 43:479-485.

Lee H-M, Rich S (1991). Co-stimulation of T cell proliferation by transforming growth factor- β 1. *J Immunol*, 147:1127-1133.

Lee MS, Wogensen L, Shizuru J, Oldstone MBA, Sarvetnick N (1994). Pancreatic islet production of murine interleukin-10 does not inhibit immune-mediated tissue destruction. *J Clin Invest*, 93:1332-1338.

Le Meur Y, Fixe P, Aldigier JC, Leroux-Robert C, Praloran V (1996). Macrophage colony stimulating factor involvement in uremic patients. *Kidney Int*, 50:1007-1012.

Lindholm A, Kahan BD (1993). Influence of cyclosporine pharmacokinetics, trough concentrations, and AUC monitoring on outcome after kidney transplantation. *Clin Pharmacol Ther*, 54:205-218.

Linsley PS, Ledbetter JA (1993). The role of the CD28 receptor during T-cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol*, 11:191-212.

Lloyd AR, Oppenheim JJ (1992). Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol Today*, 13:169-172.

Loong CC, Chen A, Lui WY, King KL, Lin CY (1996). Expression of cytokines, growth factors, and adhesion molecules in rejecting human renal allograft. *Transplant Proc*, 28:1445-1446.

Macatonia SE, Doherty TM, Knight SC, O'Garra A (1993). Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN γ production. *J Immunol*, 150:3755-3765.

Mackenzie HS, Brenner BM (1996). Antigen-independent determinants of late renal allograft outcome: the role of renal mass. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 5:289-296.

Makowka L, Sher LS, Cramer DV (1993). The development of brequinar as a immunosuppressive drug for transplantation. *Immunol Rev*, 136:51-70.

Malinowski K, Waltzer WC, Jao S, Pullis C, Shabtai M, Raisbeck AP, Rapaport FT (1992). Homing of CD8CD57 T lymphocytes into acutely rejected renal allografts. *Transplantation*, 54:1013-1017.

Malkovski M, Loveland B, North M, Asherson GL, Gao L, Ward P, Fiers W (1987). Recombinant interleukin-2 directly augments the cytotoxicity of human monocytes. *Nature*, 325:262-265.

Mannon RB, Sundar SK, Sanfilippo FP, Coffman TM (1993). Alterations in renal interleukin-1 production during kidney transplant rejection in the rat. *Transplantation*, 56:1157-1162.

Manfo RC, Gonçalves LFS, De Moura LAR (1995). Reproducibility of fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis of acute rejection of renal allografts. *Nephrol Dial Transplant*, 10:2306-2309.

Massengill SF, Pena DR, Drane WE, Fennell RS, Richard GA (1992). Technetium-99m sulfur colloid accumulation as a predictor of acute renal transplant rejection. *Transplantation*, 54:969-973.

Mayer TM, Fuller AA, Fuller TC, Lazarovits AI, Boyle LA, Kurnick JT (1985). Characterization of in vivo-activated allospecific T lymphocytes propagated from human renal allograft biopsies undergoing rejection. *J Immunol*, 134:258-264.

Medawar PB (1944). The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits. *J Anat*, 78:176-199.

Metcalf D (1991). The leukaemia inhibitory factor (LIF). *Int J Cell Cloning*, 9:95-108.

Moore KW, O'Garra A, de Waal-Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR (1993). Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*, 11:165-190.

Moreau JF, Peyrat MA, Vie H, Bonneville M, Soulillou JP (1985). T cell colony-forming frequency of mononucleated cells extracted from rejected human kidney transplants. *Transplantation*, 39:649-656.

Morris PJ, Carter NP, Cullen PR, Thompson JF, Wood RFM (1982). Role of T cell subsets monitoring in renal allograft recipients. *N Engl J Med*, 306:1110-1111.

Morris RE (1992). Rapamycins: antifungal, antitumor, antiproliferative and immunosuppressive macrolides. *Transplant Rev*, 6:39-87.

Mosmann TR, Sad S (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*, 17:138-146.

Muzio M, Re F, Sironi M, Polentarutti N, Minty A, Caput D, Ferrara P, Mantovani A, Colotta F (1994). Interleukin-13 induces the production of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) and the expression of the mRNA for the intracellular (keratinocyte) form of IL-1ra in human myelomonocytic cells. *Blood*, 83:1738-1743.

Neilson EG (1993). Is immunologic tolerance of self modulated through antigen presentation by parenchymal epithelium? *Kidney Int*, 44:927-931.

Nickerson P, Steurer W, Steiger J, Zheng X, Steele AW, Strom TB (1994). Cytokines and the Th1/Th2 paradigm in transplantation. *Curr Opin Immunol*, 6:757-764.

Nicola NA, Peterson L, Hilton DJ, Metcalf D (1988). Cellular processing of murine colony-stimulating factor (Multi-CSF, GM-CSF, G-CSF) receptors by normal haemopoietic cells and cell lines. *Growth factors*, 1:41-49.

Nikolic-Paterson DJ, Lan HY, Hill PA, Atkins RC (1994). Macrophages in renal injury. *Kidney Int, Suppl* 45:S79-S82.

Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, Ziegler SF, Tsang M, Cao X, Leonard WJ (1993). Interleukin-2 receptor γ chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science*, 262:1877-1880.

O'Connell PJ, Pacheco-Silva A, Nickerson PW, Muggia RA, Bastos M, Kelley VR, Strom TB (1993). Unmodified pancreatic islet allograft rejection results in the preferential expression of certain T cell activation transcripts. *J Immunol*, 150:1093-1104.

Ode-Hakim S, Docke WD, Kern F, Ammerich F, Volk HD, Reinke P (1996). Delayed-type hypersensitivity-like mechanisms dominate late acute rejection episodes in renal allograft recipients. *Transplantation*, 61:1233-1240.

Ohashi Y, Takeshita T, Nagata K, Mori S, Sugamura K (1989). Differential expression of the IL-2 receptor subunits, p55 and p75 on various populations of primary peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol*, 143, 3548-3555.

Oliveira G, Ramos JP, Xavier P, Magalhães M, Torrinha F, Mendes A, Guerra LE (1995). Analysis by FACS of lymphocyte subpopulations present in the peripheral blood (PBL) and fine-needle aspiration biopsies (FNAB) in renal transplant patients (RTX). *J Am Soc Nephrol*, 6:1110P.

Oliveira G, Xavier P, Murphy B, Neto S, Mendes A, Sayegh MH, Guerra L (1996). Cytokine analysis of human renal allograft aspiration biopsies predicts acute rejection. *J Am Soc Nephrol*, 7:1918P.

Oliveira G, Xavier P, Teixeira F, Ramos JP, Neto S, Magalhães M, Torrinha F, Mendes A, Guerra LE (1995). Analysis of cytokines present in fine needle aspiration cultures supernatants and its effects on lymphocyte subpopulations. *J Am Soc Nephrol*, 6:1061P.

Ong ACM, Fine LG (1994). Tubular-derived growth factors and cytokines in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis: implications for human renal disease progression. *Am J Kidney Dis*, 23:205-209.

Opelz G (1994). Effect of the maintenance immunosuppressive drug regimen on kidney transplant outcome. *Transplantation*, 58:443-446.

Ortaldo JR, Mason AT, Gerard JP, Henderson LE, Farrar W, Hopkins RF, Heberman RB, Rabin H (1984). Effects of natural and recombinant IL 2 on regulation of IFN gamma production and natural killer activity: lack of involvement of the Tac antigen for these immunoregulatory effects. *J Immunol*, 133:779-783.

Palay DA, Cluff CW, Wentworth PA, Ziegler HK (1986). Cyclosporine inhibits macrophage-mediated antigen presentation. *J Immunol*, 136:4348-4353.

Pawelec G, Baumgarten P, Rehbein A, Rensch V, Schaudt K (1990). Cytokine regulation of the balance between alloindifferent and allospecific suppressor induction in mixed lymphocyte cultures. *Transplantation*, 49:615-619.

Pearson TC, Alexander DZ, Winn KJ, Linsley PS, Lowry RP, Larsen CP (1994). Transplantation tolerance induced by CTLA4-Ig. *Transplantation*, 57:1701-1706.

Pierpaoli W, Lesnikov VA, Lesnikova MP, Arrighi S, Bardotti A (1996). Specific xenogeneic (human) tolerance in immunosuppressed mice by combined donor-derived human transferrin and antigens. *Transplant Proc*, 28:711-712.

Pober JS, Cotran RS (1990). The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation*, 48:537-544.

Pober JS, Orosz CG, Rose ML, Savage COS (1996). Can graft endothelial cells initiate a host anti-graft immune response. *Transplantation*, 61:343-349.

Ponticelli C, Civati G, Tarantino A, di Palo FQ, Corbetta G, Minetti L, Vegeto A, Belli L (1996). Randomized study with cyclosporine in kidney transplantation: 10-year follow-up. *J Am Soc Nephrol*, 7:792-797.

Poo WJ, Conrad L, Janeway CAJ (1988). Receptor-directed focusing of lymphokine release by helper T cells. *Nature*, 332:378-380.

Prince HE, Jensen ER (1991). Three-color cytofluorometric analysis of CD8 subsets in HIV-1 infection. *J AIDS*, 4:1227-1232.

Rabinowich H, Zeevi A, Paradis IL, Yousem SA, Dauber JH, Kormos R, Hardesty RL, Griffith P, Duquesnoy RJ (1990). Proliferative responses of bronchoalveolar lavage lymphocytes from heart-lung transplants patients. *Transplantation*, 49:115-121.

Rabl H, Khoschsorur G, Colombo T, Petritsch P, Rauchenwald M, Koltringer P, Tatzber F, Esterbauer H (1993). A multivitamin infusion prevents lipid peroxidation and improves transplantation performance. *Kidney Int*, 43:912-917.

Raftery MJ, Séron D, Koffman G, Hartley B, Janossy G, Cameron JS (1989). The relevance of induced class II HLA antigens and macrophage infiltration in early renal allograft biopsies. *Transplantation*, 48:238-243.

Ralph P, Nakoinz I, Rennick D (1988). Role of interleukin 2 and interleukin 4, and alpha, beta and gamma interferon in stimulating macrophage antibody-dependent tumouricidal activity. *J Exp Med*, 167:712-717.

Ramos EL, Tilney NL, Ravenscraft MD (1991). Clinical aspects of renal transplantation, in: *The Kidney* edited by Barry M Brenner and Floyd C Rector, WB Saunders Company: 2361-2407.

Rapaport FT, Dausset J (1995). A historical perspective of the relevance of immunology to transplantation, in: *The handbook of transplant immunology*, edited by Kathryn Wood, MedSci publications: 1-21.

Reed MH, Shapiro ME, Milford EL, Carpenter CB, Kirkman RL (1989). Interleukin 2 receptor expression on peripheral blood lymphocytes in association with renal allograft rejection. *Transplantation*, 48:361-366.

Reinke P, Fietze E, Docke WD, Kern F, Ewert R, Volk HD (1994). Late acute rejection in long-term allograft recipients. *Transplantation*, 58:35-41.

Renz H, Domenico J, Gelfland EW (1991). IL-4-dependent up-regulation of IL-4 receptor expression in murine T and B cells. *J Immunol*, 146:3049-3055.

Roth MD (1994). Interleukin 2 induces the expression of CD45RO and the memory phenotype by CD45RA⁺ peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med*, 179:857-864.

Rubin-Kelley V, Jevnikar AM (1991). Antigen presentation by renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*, 2:13-16.

Rush DN, Jeffery JR, Gough I (1995). Sequential protocol biopsies in renal transplant patients. Clinico-pathological correlations using the Banff schema. *Transplantation*, 59:511-514.

Russell SM, Keegan AD, Harada N, Nakamura Y, Noguchi M, Leland P, Friedman MC, Miyajima A, Puri RK, Paul VE, Leonard WJ (1993). Interleukin-2 receptor γ chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science*, 262:1880-1883.

Safirstein R, Megyesi J, Saggi SJ, Price PM, Poon M, Rollins BJ, Taubman MB (1991). Expression of cytokine-like genes JE and KC is increased during renal ischemia. *Am J Physiol*, 261:F1095-F1101.

Saidman SL, Demetris AJ, Zeevi A, Duquesnoy RJ (1990). Propagation of lymphocytes infiltrating human liver allografts. Correlation with histologic diagnosis of rejection. *Transplantation*, 49:107-111.

Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, Russell ME, Carpenter CB, Linsley PS, Turka LA (1995). CD28-B7 blockade after alloantigen challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med*, 181:1869-1874.

Sayegh MH, Krensky AM (1996). Novel immunotherapeutic strategies using MHC derived peptides. *Kidney Int*, 49, Suppl 53:S13-S20.

Schall TJ, Bacon K, Camp RD, Kaspari JW, Goeddel DV (1993). Human macrophage inflammatory protein α (MIP-1 α) and MIP-1 β chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J Exp Med*, 177:1821-1826.

Schmouder RL, Strieter RM, Wiggins RC, Chensue SW, Kunkel SL (1992). In vitro and in vivo interleukin-8 production in human renal cortical epithelia. *Kidney Int*, 41:191-198.

Schuurman H-J, Meyling FHJG, Wijngaard PLJ, Van Der Meulen A, Slootweg PJ, Jambroes G (1989). Lymphocyte status in endomyocardial biopsies and blood after heart transplantation. *J Pathol*, 159:197-203.

Schwab SJ, Paul LC (1996). Survival with end-stage renal failure in the 1990s: editorial review. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 5:477-479.

Schwartz RH (1990). A cell culture model of T lymphocyte clonal anergy. *Science*, 248:1349-1356.

Schwartz R, Dameshek W (1959). Drug-induced immunological tolerance. *Nature*, 183:1682-1685.

Schwartz R, Dameshek W (1960). The effects of 6-mercaptopurine on homograft reactions. *J Clin Invest*, 39:392-394.

Sedor JR (1992). Cytokines and growth factors in renal injury. *Semin Nephrol*, 12:428-440.

Serón D, Alexopoulos E, Raftery MJ, Hartley RB, Cameron JS (1989). Diagnosis of rejection in renal allograft biopsies using the presence of activated and proliferating cells. *Transplantation*, 47:811-816.

Seventer GAV, Shimizu Y, Horgan KJ, Luce GEG, Webb D, Shaw S (1991). Remote T cell co-stimulation via LFA-1/ICAM-1 and CD2/LFA3: demonstration with immobilized ligand/mAb and implication in monocyte-mediated co-stimulation. *Eur J Immunol*, 21:1711-1718.

Sharma VK, Bologna RM, Xu G-P, Li B, Mouradian J, Wang J, Serur D, Rao V, Suthanthiran (1996). Intragraft TGF- β 1 mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int*, 49:1297-1303.

Shehata M, Cope GH, Johnson TS, Raftery AT, El Nahas AM (1995). Cyclosporine enhances the expression of TGF- β in the juxtaglomerular cells of the rat kidney. *Kidney Int*, 48:1487-1496.

Sheil AGR, Kelly GE, Storey BG, May J, Kalowski S, Mears D, Rogers JH, Johnson JR, Charlesworth J, Stewart JH (1971). Antilymphocyte globulin in renal transplantation. *Lancet*, 1:359-363.

Sherman LA, Cattopadnyay S (1993). The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol*, 1993:385-402.

Sherwood RA, Brent L, Rayfield LS (1986). Presentation of allo-antigen by host cells. *Eur J Immunol*, 16:569-574.

Shoskes DA, Wood KJ (1994). Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol Today*, 15:32-38.

Simpson MA, Madras PN, Cornaby AJ, Etienne T, Dempsey RA, Clowes HA, Monaco AP (1989). Sequential determinations of urinary cytology and plasma and urinary lymphokines in the management of renal allograft recipients. *Transplantation*, 47:218-223.

Singer GG, Yokoyama H, Bloom RD, Jevnikar AM, Nabavi N, Rubin-Kelley V (1993). Stimulated renal tubular epithelial cells induce anergy in CD4⁺ T cells. *Kidney Int*, 44:1030-1035.

Sloan-Lancaster J, Evavold BD, Allen PM (1993). Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature*, 363:156-159.

Smith AY, Citterio F, Welsh M, Kerman RH, Kahan BD (1989). Interleukin-2 receptor as an immunodiagnostic tool to differentiate rejection from nephrotoxicity. *Transplant Proc*, 21:1462-1464.

Smitters AJ, Rose ML, Dominguez MJ, Yacomb MM (1990). Selection for donor-specific cytotoxic T lymphocytes within the allografted human heart. *Transplantation*, 49:1105-1109

Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdik JF, Cohen AH, Colvin RB, Croker BP, Droz D, Dunnill MS, Halloran PF, Hayry P, Jennette JC, Keown PA, Marcussen N, Mihatsch MJ, Morozumi K, Myers BD, Nast CC, Olsen S, Racusen LC, Ramos EL, Rosen S, Sachs DH, Salomon DR, Sanfilippo F, Verani R, von Willebrand E, Yamaguchi Y (1993). International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int*, 44:411-422.

Solez K, Racusen LC, Marcussen N, Slatnik I, Kewon P, Burdick J, Olsen S (1993,a). Morphology of ischemic acute renal failure, normal function, and cyclosporine toxicity in cyclosporine-treated renal allograft recipients. *Kidney Int*, 43:1058-1067.

Sollinger HW, Deierhoi MH, Belzer FO, Diethelm A, Kauffman RS (1992). RS-61443 - a phase I clinical trial and pilot rescue study. *Transplantation*, 53:428-432.

Sorof JM, Vartanian RK, Olson JL, Tomlanovich SJ, Vincenti FG, Amend WJC (1995). Histopathological concordance of paired renal allograft biopsy cores. *Transplantation*, 60:1215-1219.

Soulillou JP, Cantarovich D, Le Mauff B, Giral M, Robillard N, Hourmant M, Hirn M, Jacques Y (1990). Randomized controlled trial of a monoclonal antibody against the interleukin-2 receptor (33B3.1) as compared with rabbit antithymocyte globulin for prophylaxis against rejection of renal allografts. *N Engl J Med*, 322:1175-1182.

Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Ildstad S, Ricordi C, Trucco M (1992). Cell migration chimerism and graft acceptance. *The Lancet*, 339:1579-1582.

Starzl TE, Fung JJ, Venkataramanan R, Todo S, Demetris JA, Jain A (1989). FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *The Lancet*, 334:1000-1004.

Steinan RM (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*, 9:271-296.

Stephens ND, Barton SL, Smith AY, Paul RW, Neidhart JA, Griffith JK (1996). GM-CSF secretion in primary cultures of normal and cancerous human renal cells. *Kidney Int*, 50:1044-1050.

Stout RD, Suttles J (1996). The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses. *Immunol Today*, 17:487-492.

Street NE, Mosmann TR (1991). Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J*, 5:171-177.

Strober S, Dhillon M, Schubert M, Holm B, Engleman E, Benike C, Hoppe R, Sibley R, Myburg JA, Collins G, Levin B (1989). Acquired immune tolerance to cadaveric renal allografts. *N Engl J Med*, 321:28-33.

Strom TB, Carpenter CB (1983). Transplantation: immunogenetics and clinical aspects. II, *Hosp Pract*, 18:135-140.

Strom TB, Roy-Chaudhury P, Manfro R, Zheng XX, Nickerson PW, Wood K, Bushell A (1996). The Th1/Th2 paradigm and the allograft response. *Curr Opin Immunol*, 8:688-693.

Suthanthiran M, Strom TB (1994). Renal transplantation. *N Engl J Med*, 331:365-376.

Takeuchi I, Chikaraishi T, Harada H, Watarai Y, Tanda K, Seki T, Koyanagi T (1995). Analysis of immunosuppressive mechanisms in deoxyspergualin-treated renal transplants in the early postoperative phase. *Transplant Proc*, 27:1563:1564.

Takeuchi T, Lowry RP, Konieczny B (1992). Heart allografts in murine systems: the differential activation of Th2-like effector cells in peripheral tolerance. *Transplantation*, 53:1281-1294.

Tam FWK, Karkar AM, Smith J, Yoshimura T, Steinkasserer A, Kurre R, Langner K, Rees AJ (1996). Differential expression of macrophage inflammatory protein-2 and monocyte chemoattractant protein-1 in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int*, 49:715-721.

Tashiro M, Aikawa A, Sato I, Kimura I, Iwashita Y, Arai K, Ohara T, Hirata K, Hasegawa A (1989). Comparison of lymphocyte subsets of peripheral blood and grafts in renal transplant recipients. *Transplant Proc*, 21:1859-1860.

Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A (1994). The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today*, 15:479-483.

te Velde AA, Malefyt R de W, Huijbens RJF, de Vries JE, Figdor CG (1992). IL-10 stimulates monocyte Fc γ R surface expression and cytotoxic activity. *J Immunol*, 149:4048-4052.

Thompson J, Carter N, Bolton E, McWhinnie D, Wood R, Morris P (1985). The composition of the lymphocyte infiltrate in rejecting human renal allografts is not reflected by lymphocyte subpopulations in the peripheral blood. *Transplant Proc*, 17:556-557.

Thompson DA, Spies A, Stephan RN, Brooks SP, Grande CC, Tomasi TB (1996). Prolongation of survival of rat kidney allografts by transforming growth factor- β 2. *Transplant Proc*, 28:1948-1951.

Thompson NL, Flanders KC, Smith JM, Ellingsworth LR, Roberts AB, Sporn MB (1989). Expression of transforming growth factor β 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. *J Cell Biol*, 108:661-669.

Tilg H, Mier JW, Vogel W, Aulitzky WE, Wiedermann CJ, Vannier E, Huber C, Dinarello CA (1993). Induction of circulating IL-1 receptor antagonist by IFN treatment. *J Immunol*, 150:4687-4692.

Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW (1994). Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood*, 83:113-118.

Tilney NL (1986). Renal transplantation between identical twins: A review. *World J Surg*, 10:381-388.

Tilney NL, Whitley WD, Diamond JR, Kupiec-Weglinski JW, Adams DH (1991). Chronic rejection - an undefined conundrum. *Transplantation*, 52:389-398.

Totterman TH, Hanas E, Bergstrom R, Larsson E, Tufveson G (1989). Immunologic diagnosis of kidney rejection using FACS analysis of graft-infiltrating functional and activated T and NK cell subsets. *Transplantation*, 47:817-823.

Townsend A, Bodmer H (1989). Antigen recognition by Class I-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 7:601-624.

Traversari C, van der Bruggen P, Van den Eynde B, Hainaut P, Lemoine C, Ohta N, Old L, Boon T (1992). Transfection and expression of a gene coding for a human melanoma antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes. *Immunogenetics*, 35:145-152.

Trinchieri G, Matsumoto-Kobayashi M, Clark SC, Sehra J, London L, Perussia B (1984). Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2. *J Exp Med*, 160:1147-1149.

Tripp CS, Wolf SF, Unanue ER (1993). Interleukin 12 and tumor necrosis factor α are costimulators of interferon γ production by natural killers cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis and interleukin 10 is a physiologist antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:3725-3729.

Troppman C, Gillingham KJ, Benedetti E, Almond PS, Gruessner RWG, Najarian JS, Matas AJ (1995). Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal transplantation. *Transplantation*, 59:962-968.

Unanue ER, Allen PM (1986). Comment on the finding of Ia expression in non-lymphoid cells. *Lab Invest*, 55:123-125.

Utans U, Quist WC, McManus BM, Wilson JE, Arceci RJ, Wallace AF, Russell ME (1996). Allograft inflammatory factor-1. *Transplantation*, 61:1387-1392.

van Emmerik NEM, Vaessen LMB, Balk AHMM, Bos E, Claas FHJ, Weimar W (1996). Progressive accumulation of CTL with high avidity for donor antigens during the development of acute cardiac rejection. *Transplantation*, 62:529-536.

van Twuyver E, de Hoop J, ten Berge RJM, Wilmink JM, Lems SPM, van de Berg AP, Slooff MJH, Waal LP (1996). Comparison of T cell responses in patients with a long-term surviving renal allograft versus a long-term surviving liver allograft. *Transplantation*, 61:1392-1397.

van Voorhis WC, Steinman RM, Hair LS, Luban J, Witmer MD, Koide S, Cohn ZA (1983). Specific antimononuclear phagocyte antibodies. *J Exp Med*, 158:126-145.

Volpes R, van den Oord JJ, van Damme B, Desmet V (1991). CD14 as marker for allograft liver rejection? *The Lancet*, 337:60.

von Baher R, Volk HD, Reinke P, Falck P, Wolff H (1989). An immune monitoring program for controlling immunosuppressive therapy. *Transplant Proc*, 21:1189-1191.

von Boehmer H, Swat W, Kisielow P (1993). Positive selection of immature ab T cells. *Annu Rev Immunol*, 135:67-80.

von Willebrand E, Hughes D (1994). Fine-needle aspiration biopsy in rejection diagnosis, in *Kidney Transplantation. Principles and Practice*, ed by PJ Morris, WB Saunders, 4th edition:301-313.

Vossen ACTM, Tibbe GJM, Benner R, Savelkoul HFJ (1995). T-lymphocyte and cytokine-directed strategies for inhibiting skin allograft rejection in mice. *Transplant Proc*, 27:380-382.

Wahl SM, Costa GL, Corcoran M, Wahl LM, Berger AE (1993). Transforming growth factor β mediates IL-1-dependent induction of IL-1 receptor antagonist. *J Immunol*, 150:3553-3560.

Wang SC, Morel PA, Wang Q, Jordan ML, Simmons RL, Twardy DJ (1993). A dual mechanism of immunosuppression by FK-506. *Transplantation*, 56:978-985.

Weber T, Kaufman C, Zeevi A, Zerbe TR, Hardesty RJ, Kormos RH, Griffith BP, Duquesnoy RJ (1988). Propagation of lymphocytes from human heart transplant biopsies: methodological considerations. *Transplant Proc*, 20:176-180.

Weber T, Kaufman C, Zeevi A, Zerbe TR, Hardesty RJ, Kormos RH, Griffith BP, Duquesnoy RJ (1989). Lymphocyte growth from cardiac allograft biopsy specimens with no or minimal cellular infiltrates: association with subsequent rejection episode. *J Heart Transplant*, 8:233-241.

Wenzel UO, Abboud HE (1995). Chemokines and renal disease. *Am J Kidney Dis*, 26:982-994.

Whisler RL, Lindsey JA, Proctor KVW, Newhouse YG, Cornwell DG (1985). The impaired ability of human monocytes to stimulate autologous and allogeneic mixed lymphocyte reactions after exposure to cyclosporine. *Transplantation*, 40:57-61.

Wilczek H (1990). Percutaneous renal biopsy of the renal allograft. A clinical safety evaluation of 1129 biopsies. *Transplantation*, 50:790-797.

Wilkinson AH, Smith JL, Hunsicker LG, Tobacman J, Kapelanski DP, Johnson M, Wright FH, Behrendt DM, Corry RJ (1989). Increased frequency of posttransplant lymphomas in patients treated with cyclosporine, azathioprine, and prednisolone. *Transplantation*, 47:293-296.

Williams JM, DeLoria D, Hansen JA, Dinarello CA, Loertscher R, Shapiro HM, Strom TB (1985). The events of primary T cell activation can be staged by use of sepharose-bound anti-T3(64.1) monoclonal antibody and purified interleukin-1. *J Immunol*, 135:2249-2255.

Williams ME (1995). Management of the diabetic transplant recipient. *Kidney Int*, 48:1660-1674.

Wilson JL, Proud G, Forsythe JLR, Taylor RMR, Kirby JA (1995). Renal allograft rejection. Tubular epithelial cells present alloantigen in the presence of costimulatory CD28 antibody. *Transplantation*, 59:91-97.

Wood KJ, Hopley A, Dallman MJ, Morris PJ (1988). Lack of correlation between the induction of donor class I and class II major histocompatibility complex antigens and graft rejection. *Transplantation*, 45:759-767.

Wrammer L, Olausson M, Soderstrom T, Lindholm L, Rydberg L, Brynner H (1987). Evidence of donor-specific cellular suppressor activity in donor-specific cell-mediated lympholysis unresponsiveness in renal transplant patients. *Transplantation*, 44:390-395.

Wuthrich RP, Glimcher LH, Yiu MA, Jevnikar AM, Dumas SE, Kelley VE (1990). Generation of highly differentiated murine renal tubular epithelial cell lines: MHC class II regulation, antigen presentation and tumor necrosis factor production. *Kidney Int*, 37:783-792.

Wuthrich RP, Jenkins TA, Snyder TS (1993). Regulation of cytokine-stimulated vascular cell adhesion molecule-1 expression in renal tubular cells. *Transplantation*, 55:172-177.

Wuthrich RP, Yui MA, Mazoujian G, Nabavi N, Glimcher LH, Kelley VE (1989). Enhanced MHC class II expression in renal proximal tubules precedes loss of renal function in MLR/pr mice with lupus nephritis. *Am J Pathol*, 134:45-51.

Xu G-P, Sharma VY, Li B, Bologna R, Li Y, Mouradian J, Wang J, Serur D, Rao V, Stenzel KH, Suthanthiran (1995). Intragraft expression of IL-10 messenger RNA: a novel correlate of renal allograft rejection. *Kidney Int*, 48:1504-1507.

Yard BA, Kooijmans-Coutinho M, Paape ME, Bruijn JA, Daha MR, van Es LA, van der Woude FJ (1994). Analysis of cytokine production by graft-infiltrating cells isolated from rejecting renal allografts. *Transplantation*, 57:153-155.

Yard BA, Kooijmans-Coutinho M, Reterink T, van den Elsen P, Paape ME, Bruyn JA, van Es L, Daha MR, van der Woude FJ (1993). Analysis of T cell lines from rejecting renal allografts. *Kidney Int*, 43, Suppl 39:S133-S138.

Yoshimura N, Oka T, Kahan B (1991). Sequential determinations of serum interleukin 6 levels as an immunodiagnostic tool to differentiate rejection from nephrotoxicity in renal allograft recipients. *Transplantation*, 51:172-176.

Yuh DD, Morris RE (1993). The immunopharmacology of immunosuppression by 15-deoxyspergualin. *Transplantation*, 55:578-591.

Zeevi A, Fung J, Paradis I (1985). Lymphocytes of bronchoalveolar lavages from heart-lung transplant recipients. *Heart Transplant*, 4:417-421.

Zhang X, Giangreco L, Broome HE, Dargan CM, Swain SL (1995). Control of CD4⁺ effector fate: transforming growth factor β 1 and interleukin 2 synergize to prevent apoptosis and promote effector expansion. *J Exp Med*, 182:699-709.

Zhou Z, Kim YJ, Pollok K, Hurtado J, Lee JK, Broxmeyer HE, Kwon BS (1993). Macrophage inflammatory protein-1 alpha rapidly modulates its receptors and inhibits the anti-CD3 mAb-mediated proliferation of T lymphocytes. *J Immunol*, 151:4333-4341.

Ziegler-Heitbrock HWL (1996). Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14⁺CD16⁺ subpopulation. *Immunol Today*, 17:424-428.

Zuo X-J, Jordan SC, Wilkinson A, Danovitch GM, Barba L, Schwieger J, Nast CC (1995). Interleukin-12 mRNA levels in renal allograft fine-needle aspirates do not correlate with acute transplant rejection. *Transplantation*, 60:1360-1362.