

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: NEFROLOGIA

**MARCADORES MOLECULARES NA REJEIÇÃO AGUDA SUBCLÍNICA DE
TRANSPLANTES RENAIIS**

ESTHER CRISTINA AQUINO DIAS

Porto Alegre

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: NEFROLOGIA

**MARCADORES MOLECULARES NA REJEIÇÃO AGUDA SUBCLÍNICA DE
TRANSPLANTES RENAIIS**

Dissertação de Mestrado apresentada
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências Médicas:
Nefrologia

ESTHER CRISTINA AQUINO DIAS

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro

Porto Alegre

2003

AGRADECIMENTOS

- À minha família pelo afeto, incentivo e compreensão nos momentos de ausência.
- Ao programa de Pós Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia
- Ao Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro, orientador deste trabalho. Agradeço a oportunidade, a confiança, o incentivo ao meu crescimento, a valorização do meu trabalho, os ensinamentos e o exemplo de professor e pesquisador.
- Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Santos Gonçalves pelo apoio, pela disponibilidade constante, pela ajuda nas análises estatísticas, pelo convívio e amizade ao longo destes anos.
- Ao Dr. Francisco José Veronese pela disponibilidade e atenção.
- Aos colegas do laboratório de pesquisa do Curso de Pós Graduação em Nefrologia Virna Carpio, Ane Nunes e Alessandro Peres pelo apoio, convívio e incentivo.

- A secretária do Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, Rute Helena dos Santos pelo auxílio e amizade.
- Aos funcionários do Serviço de Nefrologia do HCPA pelo convívio e apoio ao longo desses anos.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.
- Ao Grupo de Pós Graduação e Pesquisa (GPPG) e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo suporte financeiro e editorial.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	5
LISTAS DE FIGURAS	7
LISTAS DE TABELAS	9
I.INTRODUÇÃO	11
A resposta imune aos tecidos transplantados	12
A rejeição aguda e a nefropatia crônica do enxerto	20
A rejeição aguda subclínica	23
A reação em cadeia da polimerase	25
Referências da introdução	32
II. OBJETIVOS	42

III. ARTIGO EM PORTUGUÊS: MARCADORES MOLECULARES NA REJEIÇÃO AGUDA SUBCLÍNICA DE TRANSPLANTES RENAIIS	43
Resumo	44
Introdução	46
Pacientes e Métodos	47
Pacientes	47
Métodos	48
Resultados	51
Discussão	54
Referências	59

IV. ARTIGO EM INGLÊS: MOLECULAR MARKERS IN ACUTE SUBCLINICAL REJECTION OF RENAL TRANSPLANTS	67
Abstract	68
Introduction	70
Patients and Methods	71
Patients	71
Methods	72
Results	75
Discussion	78
References	82

LISTA DE ABREVIATURAS

- CPH: Complexo principal de histocompatibilidade
- HLA: antígeno leucocitário humano (“Human Leucocyte Antigen”)
- CD: “cluster of differentiation”
- RcT: receptor da célula T
- IL: interleucina
- NK: célula assassina natural (“natural killer”)
- Th: linfócito T auxiliar (“T helper”)
- Tc: linfócito T citotóxico
- Fas-L: Fas ligante
- TNF: fator de necrose tumoral (“Tumor Necrosis Factor”)
- TNF α : fator de necrose tumoral α
- RNAm: mensageiro do ácido ribonucléico
- INF γ : interferon gama
- DNA: ácido desoxirribonucléico
- NCE: nefropatia crônica do enxerto

- PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas ("Platelet-Derived Growth Factor)
- TGF β : fator de crescimento transformador β ("Transforming Growth Factor")
- RASC: rejeição aguda subclínica
- PCR: reação em cadeia da polimerase (" Polymerase Chain Reaction")
- RT: transcrição reversa ("Reverse Transcription")
- Qc: competidor quantitativo ("quantitative competitor")
- RA: rejeição aguda
- DEPC: dietilpirocarbonato
- DNTPs: deoxinucleotídeos trifosfatos
- DTT: ditioneitol
- GAPDH: gliceraldeído fosfato desidrogenase

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do reconhecimento celular de células CD4 e CD8 restrita ao complexo principal de histocompatibilidade	16
Figura 2 - Representação esquemática dos braços aferente e eferente da resposta imune aos aloantígenos	18
Figura 3 - Princípio da reação em cadeia da polimerase	26
Figura 4 - Esquema representando a expressão genética desde a replicação e a transcrição do DNA, a transcrição reversa do RNA ao DNA complementar e a translação protéica	28

Artigo em Português

Figura 1 - Expressão de GAPDH, perforina, fas ligante e granzima B em biópsias de vigilância aos 2 meses em pacientes transplantados renais com e sem rejeição aguda subclínica	66
---	----

Artigo em Inglês

Figure 1 - Representative examples of GAPDH, perforin, granzyme B and fas Ligand transcripts expression in 2-month protocol biopsy specimens collected from kidney transplant recipients with and without acute subclinical rejection	89
---	----

LISTA DE TABELAS

Artigo em Português

Tabela 1- Avaliação dos parâmetros diagnósticos em percentagens e riscos relativo para rejeição aguda sub-clínica aos 2 meses. Expressão isolada e conjunta de transcritos de perforina, granzima B e fas-ligante 63

Tabela 2- Avaliação dos parâmetros diagnósticos e riscos relativos para rejeição aguda sub-clínica aos 12 meses. Expressão isolada e conjunta dos diferentes genes 64

Artigo em Inglês

Table 1 - Diagnostic parameters and relative risk for acute subclinical rejection at 2 months. Individual and combined expression of perforin, granzyme B and Fas ligand transcripts 86

Table 2 - Diagnostic parameters and relative risk for acute subclinical rejection at 12 months. Individual and combined expression of different gene 87

INTRODUÇÃO

O transplante renal passou a ser um procedimento de rotina para o tratamento dos pacientes com insuficiência renal crônica terminal, oferecendo maior sobrevida e melhor qualidade de vida para esses pacientes. Em muitos centros transplantadores as taxas de sobrevida em um ano de pacientes e enxertos são superiores a 95% e 90% respectivamente (1, 2).

Apesar dos avanços na preservação dos órgãos, nos testes de histocompatibilidade e da introdução de potentes fármacos com atividade imunossupressora, a reação de rejeição ainda é um problema a ser superado, sendo uma das causas da perda de enxertos. A compreensão dos mecanismos de rejeição é de fundamental importância, tanto na abordagem terapêutica do receptor quanto no desenvolvimento de novas estratégias imunossupressoras (3, 4).

A Resposta Imune aos Tecidos Transplantados

Os tecidos transplantados são rejeitados devido a respostas imunológicas do receptor direcionadas a antígenos expressos nos tecidos do doador. A natureza imunológica da reação de rejeição foi estabelecida há mais de quarenta anos, quando experimentos de enxertos de pele em ratos levaram à descoberta do complexo principal de histocompatibilidade (CPH) (2).

Os antígenos do sistema HLA (antígenos leucocitários humanos, do inglês *human leukocyte antigens*) – denominação do complexo principal de histocompatibilidade, em humanos, são geneticamente determinados e encontram-se no braço curto do cromossomo 6, sendo constituídos por glicoproteínas e têm importantes funções no sistema imune (5-9).

Estes antígenos são também chamados de antígenos de transplante e são divididos em duas classes, denominadas I e II. Os antígenos de classe I, isto é, HLA-A, B e C estão presentes nas membranas citoplasmáticas da maioria das células nucleadas do organismo, incluindo os linfócitos T e B, plaquetas e células de órgãos parenquimatosos, sendo os alvos dos linfócitos T citotóxicos, e são facilmente detectados por métodos sorológicos. Os antígenos de classe II, principalmente HLA-DP, DQ e DR, são menos bem caracterizados e têm distribuição restrita. São normalmente encontrados em linfócitos B, células T ativadas, macrófagos, no endotélio vascular e em algumas células epiteliais. Assim como os antígenos de classe I podem ser detectados por métodos sorológicos e moleculares. A compatibilização dos pares doador e receptor nos antígenos do CPH é importante para o sucesso dos transplantes (10-16).

A rejeição do enxerto é uma mistura complexa entre respostas celular e humoral, desencadeadas pelas incompatibilidades nos antígenos de histocompatibilidade. Efeitos citotóxicos voltados às células do órgão transplantado, acompanhados de resposta inflamatória não específica resultam em alterações estruturais e funcionais no órgão (17). Uma variedade de células está envolvida na reação de rejeição, como macrófagos, leucócitos, células T citotóxicas (CD8+) e auxiliares (CD4+), plasmócitos, entre outras. Essas células são mediadoras de uma cascata de eventos que, se não for modificada por agentes imunossupressores ou mecanismos naturais, resultará na destruição do enxerto.

A resposta imune inicia com o reconhecimento e captação de antígenos do doador por células apresentadoras de antígeno (monócitos, macrófagos ou células dendríticas) que os apresentam às células auxiliares (CD4) do receptor. A apresentação ocorre na fenda dos antígenos de classe II do complexo principal de histocompatibilidade na forma de pequenos peptídeos que são apresentados ao receptor da célula T (RcT) dos linfócitos CD4+. A apresentação antigênica pode ser feita por duas vias, denominadas direta e indireta. Na primeira, os peptídeos são apresentados por células apresentadoras do doador, transplantadas com o enxerto. Na via indireta os peptídeos processados são apresentados por células do receptor.

Os sinais de ativação são transmitidos para o citosol da célula T por moléculas denominadas CD3, que estão não covalentemente associadas aos RcT e situadas proximamente às moléculas CD4 e CD8 na superfície dos linfócitos. O complexo RcT/CD3 é composto por um segmento variável, que

reconhece o peptídeo antigênico no contexto das proteínas do CPH e um segmento invariável, que inicia os sinais intracelulares originados do reconhecimento antigênico. Existem dados sugerindo que algumas células T do receptor reconhecem diretamente o enxerto, enquanto outras células T reconhecem o antígeno do doador depois de processado e apresentado pelas células apresentadoras de antígenos (11).

As proteínas CD4 e CD8 expressam-se em recíprocas populações de células T do sangue, ligando-se a um componente monomórfico dos antígenos de classe II e de classe I, respectivamente, das células apresentadoras de antígeno. O acoplamento de antígenos do doador, apresentados na fenda de moléculas de HLA de classe II de células apresentadoras de antígeno, com o receptor de células T promove o chamado primeiro sinal; porém, este sinal não é suficiente para promover a ativação das células T, sendo necessários outros estímulos que constituem o segundo sinal necessário para a ativação das células T. Estes sinais são denominados sinais co-estimulatórios, cujo bloqueio leva a célula T a um estado de anergia/paralisia (10-12, 19, 20). As moléculas co-estimulatórias mais importantes descritas até o momento são as da via B-7 (B7-1 e B7-2), cujos ligantes são CD-28 e CTLA4. Outro mecanismo co-estimulatório proposto é o da via CD40-CD40L, sendo que a estimulação do CD40 também induz a expressão da via B7-1 e B7-2 como parte desta cascata de ativação (11, 20-22).

A partir da interação do antígeno com o receptor da célula T associado ao complexo CD3 ocorre uma série de eventos intracelulares, entre eles a ativação de inúmeras proteína-quinases, como a proteína quinase C e outras

dependentes de cálcio e de calmodulina. A produção de interleucina I (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) pelas células apresentadoras do antígeno, na presença de co-estimulação, também contribui para a ativação das células T auxiliares que produzem interleucina 2 (IL-2), um potente fator de crescimento dos linfócitos T, além de induzirem a expressão do receptor para a IL-2 em sua superfície. A ativação das células T depende basicamente destes eventos que estimulam a divisão celular e, conseqüentemente, promovem a expansão clonal das células auxiliares e citotóxicas (10,18). Adicionalmente a interleucina-2 estimula a produção de outras linfocinas que desempenham papéis importantes na rejeição, como a interleucina-3 (IL-3), que estimula a proliferação de células precursoras que se diferenciam em granulócitos e macrófagos, e o interferon γ , que aumenta a expressão de antígenos de classe II nas células induzíveis, aumentando a imunogenicidade dos enxertos e ativando a função citodestrutiva dos macrófagos.

Fatores de crescimento e diferenciação dos linfócitos T e B como IL-4, IL-5 e IL-6 são sintetizados a após ativação dos linfócitos T auxiliares. Estes induzem a expansão clonal dos linfócitos B estimulados pelos antígenos, que acabam por produzir anticorpos específicos com atividade citotóxica contra as células do órgão transplantado (18).

Após a ocorrência destes eventos iniciais de ativação, as células T citotóxicas proliferam sob a influência da IL-2 e, sob a ação do interferon γ , IL-4 e IL-6, assumem a função citotóxica. Ao entrarem em contato com as células do enxerto os linfócitos citotóxicos diferenciados reconhecerão os antígenos de classe I do CPH, expressos na superfície das mesmas e assim as células do receptor iniciam a fase efetora de ataque às células do enxerto (10).

Na Figura 1 abaixo estão representados esquematicamente linfócitos T CD4 e CD8 interagindo respectivamente com antígenos apresentados no contexto de moléculas HLA classes II e I presentes em células apresentadoras de antígenos e células alvo do aloenxerto. Estão também representadas as moléculas CD3 associadas aos R_cT. Conjuntamente estas estruturas propiciam o denominado primeiro sinal para a ativação celular, já descrito anteriormente. O segundo sinal, ilustrado a seguir na Figura 2, completa os requisitos para a ativação que se dará em um ambiente propício, na presença de diversas citocinas.

Figura 1. Representação esquemática do reconhecimento celular de células CD4 e CD8 restrito ao complexo principal de histocompatibilidade.

Na Figura 2 a seguir estão representados de forma esquemática os principais eventos das fases de montagem da resposta imune aos aloantígenos – braço aferente: captação, reconhecimento, apresentação do antígeno, co-estimulação, produção de interleucinas, estimulação de seus receptores, seguidos de expansão clonal. Também está representado o braço eferente ou efetor que é constituído por mecanismos celulares específicos, como os mediados pelos linfócitos citotóxicos CD8+ e também por mecanismos não específicos, tais como os desencadeados por macrófagos e células NK. Também ocorrem mecanismos efetores humorais dependentes da produção de anticorpos anti-HLA.

A evolução da resposta imune pode ser descrita com base em um modelo teórico recentemente proposto. Foi demonstrado que existem ao menos duas subpopulações funcionalmente distintas de linfócitos T auxiliares, classificadas de acordo com o tipo de citocinas produzidas. Estas células podem ser do tipo Th1 ou Th2. Os linfócitos Th1 secretam IL-2, interferon γ e fator de necrose tumoral α , estando envolvidos, principalmente, na resposta imune celular a partir da produção de reações de hipersensibilidade tardia e ativação de macrófagos. Os linfócitos Th2 secretam IL-4, IL-5 e IL-10, estando envolvidos na resposta humoral e estimulando a produção de mastócitos, eosinófilos e imunoglobulinas. As citocinas podem então levar à ativação de vários mecanismos efetores. Demonstrou-se *in vitro* que as células dessas duas subpopulações apresentam capacidade de regularem umas às outras. A diferenciação das células Th0 em Th2 é inibida pela presença de interferon γ , enquanto que a presença de IL-4 inibe a diferenciação das células Th0 em Th1 (5, 10, 23).

Figura 2. Representação esquemática dos braços de montagem aferente e efetor da resposta imune aos aloantígenos.

O processo que inicia na ativação dos linfócitos T citotóxicos resulta em suas fases finais na lise das células alvo, por mecanismos ainda não totalmente conhecidos. Pelo menos dois mecanismos são possivelmente envolvidos, e parecem operar por indução da célula-alvo à apoptose: (a) a ligação à célula-alvo estimula as células Tc a liberarem vesículas secretoras no ponto de contato que contém perforina, que se polimeriza na membrana plasmática da célula-alvo para formar canais transmembrana; (b) também estão contidas nessas vesículas as proteases serinas, que parecem passar através dos canais de perforina para

induzir a apoptose. O Fas-L é uma proteína de superfície que também pode estimular o processo de apoptose quando unido ao seu ligante - Fas - expresso na superfície das células alvo (7, 10, 24). Essas duas vias estão envolvidas no processo de lise celular que ocorre minutos ou horas após a sua ativação. Discute-se ainda uma terceira via, a via do fator de necrose tumoral (TNF) que participa de forma mais lenta na morte celular.

As células assassinas naturais (do inglês *natural killer* - NK) reconhecem patógenos revestidos de anticorpos específicos e reconhecem inespecificamente estruturas ligadas a glicoproteínas e alterações na superfície celular. Estas células liberam perforina, que se insere na membrana citoplasmática da célula-alvo que se polimeriza, formando um poro transmembrânico, aparentemente por ligação à fosforilcolina. As células NK também secretam grânulos que contém indutores de apoptose (TNF- α e granzimas) e estes passam através do poro, desencadeando assim os mecanismos apoptóticos (7, 24).

As perforinas e as granzimas estão armazenadas em vesículas citoplasmáticas e estão presentes nas células NK e nos linfócitos T citotóxicos. Ensaio *in vitro* demonstram uma estreita relação entre a expressão das proteínas granzima e perforina e o desenvolvimento da função citolítica (25).

Como citado anteriormente, perforinas são moléculas formadoras de poros, que perfuram membranas das células alvo, sendo liberadas sob a forma de monômeros lipofílicos que se inserem na membrana da celular. Os poros facilitam a entrada de água e eletrólitos pela diferença das pressões osmóticas e oncóticas entre o meio intra e o extracelular, causando a lise e morte celular. Outra função dos poros é permitir a entrada das granzimas na célula alvo (26).

As granzimas são proteases com atividade de estearases serinas, que clivam proteínas nos resíduos de ácido aspártico. A mais abundante nos linfócitos citotóxicos é a granzima B. Demonstrou-se que a expressão de RNAm de granzima B está significativamente relacionada com a rejeição(26).

Fas e seu ligante (Fas-L, CD95 ou APO-1) são proteínas de membrana pertencentes à família do fator de necrose tumoral (TNF). A molécula de Fas-L se expressa predominantemente na superfície dos linfócitos Th1 ativados, interagindo na regulação da resposta imune. A ligação do Fas ao seu ligante Fas-L induz morte celular apoptótica, através de mecanismos ainda não totalmente esclarecidos (27, 28). Estudos clínicos empregando técnicas de avaliação da expressão molecular têm demonstrado a presença do RNA mensageiro de Fas-L e de perforina em rins com rejeição irreversível (29).

Uma via independente de cálcio e perforina tem sido observada e parece efetuar-se através de enzimas liberadas por células citotóxicas. Outro mecanismo envolve a ativação de um receptor na superfície da célula alvo pela liberação de grânulos contendo fator de necrose tumoral α e interferon γ , que modulam a sua síntese protéica e causam dano citotóxico à parede celular. Todos estes mecanismos resultam em citólise. Além disso, enzimas das células alvo fragmentam o DNA nuclear quando ativadas por linfotoxinas (7, 10). Este conjunto de eventos torna-se cíclico e acaba por destruir as células do enxerto.

A Rejeição Aguda e a Nefropatia Crônica do Enxerto

A rejeição aguda se caracteriza pela rápida diminuição da função do enxerto, manifesta laboratorialmente pela retenção de escórias nitrogenadas. Os

episódios de rejeição aguda podem ocorrer a qualquer momento após o transplante, sendo, porém, considerado mais crítico o período que vai da primeira semana aos seis primeiros meses após o transplante. A apresentação clínica da rejeição aguda depende substancialmente do protocolo de imunossupressão ao qual o paciente é submetido, ou seja, regimes imunossupressores mais potentes, em geral, não se acompanham dos sinais e sintomas característicos, tais como dor, febre, diminuição da diurese e aumento de volume do enxerto (6). O diagnóstico da rejeição aguda baseia-se no quadro clínico acima descrito, quando presente, em exames de imagem, biópsia aspirativa ou de fragmento renal e também na resposta ao aumento da imunossupressão levando à melhora na função do enxerto.

As manifestações clínicas e os exames de imagem são considerados pouco sensíveis e pouco específicos para o diagnóstico diferencial da disfunção aguda do enxerto, principalmente na diferenciação entre rejeição aguda e necrose tubular aguda, nefrotoxicidade causada por inibidores da calcineurina, infecções do enxerto e outras causas (6). Assim, atualmente a biópsia do rim transplantado é largamente utilizada na avaliação da disfunção renal aguda dos enxertos e, apesar de suas limitações evidentes é considerada “padrão-ouro” no diagnóstico diferencial da rejeição aguda. Recentemente foi proposta e atualizada uma classificação denominada Banff, que tem por objetivo de padronizar as diversas lesões estruturais do rim transplantado e estabelecer de modo uniforme e reprodutível para clínicos e patologistas os diferentes graus de severidade da rejeição (30). Esta classificação preliminar foi revisada em 1995 (31) e posteriormente em 1997 (32).

A nefropatia crônica do enxerto é a principal causa de perda tardia de rins transplantados. Inicia, em geral, após o 6º mês pós-transplante, caracterizando-se por uma deterioração funcional do enxerto lenta e progressiva, acompanhada de proteinúria não nefrótica e hipertensão arterial (6).

A etiopatogenia da nefropatia crônica do enxerto envolve mecanismos imunológicos e mecanismos não imunológicos (33, 34). Os fatores de risco, com base imunológica, associados ao desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto são a rejeição aguda na fase inicial e a rejeição aguda tardia (35, 36), a má compatibilidade HLA, a sensibilização prévia aos antígenos do doador (37), e a imunossupressão insuficiente. Estudos em modelos animais de rejeição crônica mostram a participação de células e citocinas específicas como interferon γ e macrófagos (38). Alguns modelos experimentais em ratos demonstram que a inibição de mecanismos celulares e humorais pode proteger funcionalmente o enxerto e também prevenir a obliteração vascular que caracteriza a rejeição crônica (39). Sugere-se que o dano endotelial repetido e sustentado pela agressão humoral e celular estimule a produção de citocinas inflamatórias, fatores pró-coagulantes e fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês *platelet derived growth factor* - PDGF) e o fator de crescimento transformador beta (do inglês *transforming growth factor beta* - TGF β), culminando na proliferação das células musculares lisas, obliteração vascular progressiva e isquemia secundária do parênquima, manifestada por fibrose intersticial, atrofia tubular e glomeruloesclerose (40- 42).

A melhor compreensão dos mecanismos celulares e humorais envolvidos nos processos de rejeição tornou-se alvo dos estudos a partir da década de 70,

quando o infiltrado renal passou a ser analisado por técnicas de imunofluorescência (43- 45).

A técnica de imunohistoquímica com anticorpos monoclonais permitiu uma melhor avaliação dos eventos intra-enxerto com e sem rejeição aguda. Nos rins com rejeição aguda, a proporção das subpopulações de células em relação à área total do infiltrado cortical mostrava um predomínio de células T CD3+ com maior proporção de linfócitos T CD8+, e porcentagem de linfócitos B inferior a 10%. Nos enxertos sem rejeição clinicamente manifesta observou-se também um infiltrado mononuclear com predomínio de células T, mas em menor número e com uma fração menor de CD8+/CD4+; monócitos e macrófagos também foram identificados em proporção substancial no infiltrado (45, 46).

A Rejeição Aguda Subclínica

Um infiltrado linfo-monocitário de localização túbulointersticial e mais raramente perivascular tem sido observado freqüentemente em biópsias de vigilância de rins transplantados funcionalmente estáveis, na ausência de manifestações clínicas ou laboratoriais que caracterizam a rejeição aguda ao aloenxerto (46, 47). Até o momento existem controvérsias quanto ao infiltrado intersticial representar uma forma limítrofe de rejeição celular aguda ou se irá evoluir para esta condição, sendo portanto, patogênico e deletério para a sobrevida do enxerto a longo prazo, ou ainda, se vai permanecer estável ou desaparecer (47- 49). Alternativamente, ele pode constituir um mecanismo de adaptação do receptor para aquisição de tolerância imunológica, não evoluindo

para rejeição clínica e, portanto sendo desnecessária e indesejada a modificação da imunossupressão diante deste achado (49).

Estudos têm mostrado que aproximadamente 30% dos enxertos renais estáveis com infiltrado leucocitário têm critérios histológicos bem definidos para rejeição aguda, constituindo a chamada rejeição aguda subclínica (RASC) (47, 48, 50). A fenotipagem do infiltrado celular através de imunohistoquímica demonstrou que estas células são predominantemente linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+, e em menor proporção monócitos e macrófagos (51, 52).

Pacientes com RASC podem apresentar uma evolução clínica desfavorável, em termos de pior função do enxerto, evolução para nefropatia crônica e menor sobrevida tardia dos rins transplantados (48, 53, 54). Adicionalmente, foi demonstrado aumento da expressão de genes que codificam para moléculas citotóxicas em biópsias de rins estáveis com rejeição subclínica (48, 53, 56), evidenciando a presença de imunoativação na RASC. Segundo alguns autores, a identificação precoce da RASC através de biópsias de vigilância e o seu tratamento poderiam modificar o curso clínico e imunológico dos rins transplantados (57, 58). Foi sugerido em um ensaio clínico randomizado com pequeno número de pacientes que o tratamento da RASC pode ser benéfico pra a função dos enxertos renais (57).

O diagnóstico de rejeição subclínica depende da realização de biópsias de protocolo preferencialmente seqüenciais para monitorização imunológica do enxerto. A utilidade deste procedimento, também denominado de biópsia de vigilância, não é consenso na literatura (59). Biópsias de rins estáveis aos 3, 6 ou 12 meses pós-transplante poderiam revelar rejeição aguda subclínica (47, 48, 50,

53) e conseqüentemente levar à modificações no esquema imunossupressor (57). Entretanto, as biópsias seriadas ainda não constituem um procedimento de rotina nas unidades de transplante, e faltam grandes estudos multicêntricos que comprovem a sua utilidade clínica. Adicionalmente, a análise histológica ainda apresenta um elevado grau de discordância intra e interobservador, reduzindo a acurácia do diagnóstico e da graduação de lesões, principalmente no que se refere à rejeição aguda do enxerto renal (60).

A expansão dos conhecimentos e o surgimento de novas técnicas em biologia celular e molecular vêm revolucionando o entendimento da fisiopatogenia de diversas condições, possibilitando diagnósticos mais precisos e precoces de inúmeras doenças na maioria das especialidades médicas. Estas técnicas, aplicadas no estudo da rejeição celular aguda e crônica do enxerto renal, têm elucidado os mecanismos imunológicos do receptor que levam a destruição do enxerto (34, 40, 41, 48, 55).

A reação em cadeia da polimerase

Conhecida pela sigla inglesa PCR (*polymerase chain reaction*), a reação em cadeia da polimerase é uma técnica conceitualmente simples para análise de ácidos nucleicos, desenvolvida por Kary Mullis em 1985 (61). O surgimento desta técnica teve grande impacto e ela vem sendo, desde então, muito utilizada em estudos de biologia molecular.

A reação pode ampliar seletivamente uma única molécula de DNA mais de um milhão de vezes em algumas horas e permite a detecção de seqüências de genes específicos na amostra de um paciente sem a necessidade de clonagem

ou do uso de outras técnicas como *Southern* ou *Northern blotting*. Além disto as análises podem ser realizadas a partir de concentrações muito baixas da seqüência alvo (62, 63).

A reação em cadeia da polimerase baseia-se na amplificação *in vitro* de seqüências de ácido desoxirribonucléico (DNA). Essa técnica, além de muito eficiente, não depende de proliferação biológica, utilizando-se apenas de uma característica físico-química do DNA, o seu comportamento quando exposto a diferentes temperaturas (62, 63). A característica mais importante da reação é que a enzima polimerase é direcionada para sintetizar uma região específica do DNA, resultando na amplificação desta região. A técnica é extremamente sensível, mas também está sujeita a problemas técnicos e de contaminação. A PCR está esquematicamente representada na Figura 3 abaixo e descrita a seguir.

Figura 3. Princípio da reação em cadeia da polimerase. Após os ciclos de amplificação são criadas múltiplas cópias da seqüência a ser analisada. Modificado da referência 62.

O material inicial para a execução de uma PCR é um DNA que contenha a seqüência-alvo a ser amplificada. Não é necessário isolar a seqüência a ser amplificada, pois esta é definida pelos “primers” ou iniciadores utilizados na reação. A quantidade de DNA necessária para uma PCR é muito pequena, menos que um micrograma de DNA é suficiente (64). O fragmento é flanqueado por dois iniciadores da reação. Estes são oligonucleotídeos curtos que se hibridizam com os filamentos opostos do molde e desencadeiam a síntese da seqüência de DNA complementar pela enzima DNA polimerase.

As condições iniciais para amplificação, hibridização e anelamento devem ser definidas para cada par de “primers”. Cuidados especiais devem ser tomados para evitar contaminações, o que representa um grande problema para esta técnica. A PCR é executada em termocicladores, que são aparelhos onde as temperaturas correspondentes a cada protocolo são programadas para cada ciclo da reação (62). Os ciclos de amplificação são repetidos diversas vezes (de 25 a 40) e originam novos moldes para a próxima reação, resultando na amplificação exponencial da seqüência alvo, conforme demonstrado na Figura 3.

Além da avaliação do DNA, pode-se avaliar a presença de mensagem genética para a translação protéica, através do isolamento de ácido ribonucléico (RNA) seguido de transcrição reversa pela ação da enzima transcriptase reversa, levando à síntese do DNA complementar. Este pode ser submetido à PCR e a sua presença, para um determinado gene indica a presença do sinal para a translação protéica. Esta reação é denominada RT-PCR, ou seja, a PCR precedida de transcrição reversa a qual foi submetido o RNA (62), conforme apresentado na Figura 4.

Figura 4. Esquema representando a expressão genética desde a replicação e a transcrição do DNA, a transcrição reversa do RNA ao DNA complementar e a translação protéica. Modificado da referência 62.

Existem situações em que os níveis de transcritos específicos apresentam-se em pequena quantidade, não sendo determinados pela RT-PCR, necessitando ser quantificados por outro método. A RT-PCR com competidor (QCRT-PCR ou QC-PCR) pode ser usada para indicar níveis absolutos de transcritos em diferentes amostras e baseia-se na utilização de um fragmento competidor dentro da PCR, que é acrescentado na reação com uma quantidade fixa ou variável da amostra a ser analisada. O ponto em que a soma do produto da PCR da amostra e do competidor é equivalente dá uma indicação do nível do transcrito da amostra analisada. A utilização desta técnica permite estudos de expressão gênica com número muito pequeno de células e RNA (61, 65).

O produto final de uma PCR é, em geral, separado em gel de agarose ou acrilamida. O gel é corado com brometo de etídeo, que tem a capacidade de intercalar-se nas hélices duplas do DNA ligando-se às pontes de hidrogênio

existentes na molécula e tornando possível a sua visualização sob luz ultravioleta (66).

No transplante renal e de outros órgãos, a técnica da PCR tem sido utilizada para elucidação dos diversos mecanismos moleculares envolvidos nos processos de rejeição e de tolerância em modelos experimentais e em amostras de transplantes em humanos. Estuda-se principalmente a expressão dos genes que codificam para a formação de citocinas, moléculas de adesão e proteínas que atuam na fase efetora da resposta imune.

Estudos envolvendo a expressão e a quantificação de perforina, granzima B, fas ligante e diversas outras citocinas ligadas à rejeição do enxerto têm sido conduzidos por diferentes pesquisadores na busca de métodos moleculares auxiliares para o diagnóstico da rejeição aguda (67-73).

A identificação dos linfócitos T com propriedades citotóxicas foi demonstrada por Strom e colaboradores (44), através da fenotipagem do infiltrado mononuclear em rins com rejeição irreversível. Posteriormente, utilizando a técnica do PCR competitivo em rins com rejeição aguda, os mesmos autores quantificaram o aumento da expressão dos genes de perforina e granzima B, que atuam na fase citodestrutiva da resposta imune (68). Já Strehlau e colaboradores detectaram em rins com critérios histológicos de rejeição aguda um aumento estatisticamente significativo da expressão dos genes de IL-7, IL-10, IL-15, Fas ligante, perforina e granzima B (69). Neste estudo a análise simultânea de perforina, granzima B e Fas ligante foi capaz de identificar rejeição aguda mesmo em órgãos com infiltrados leves, com uma sensibilidade e especificidade de 100%. Achados semelhantes foram descritos por Sharma e colaboradores

que demonstraram a co-expressão intraenxerto de duas vias citolíticas distintas, Fas e Fas ligante, granzima B e perforina, correlacionando positivamente o nível de RNAm dos genes que codificam para estas moléculas com a severidade histológica da rejeição aguda (70). Mais recentemente, estes autores mensuraram por PCR quantitativo o RNAm das proteínas citotóxicas perforina e granzima B em células de urina, com o objetivo de testar um método adicional não invasivo para o diagnóstico de RA. A transcrição do RNAm de ambas as moléculas estava significativamente aumentada nos enxertos com rejeição aguda em comparação aos enxertos sem esta condição (71). Recentemente, no Brasil, Netto e colaboradores obtiveram resultados semelhantes em amostras de sangue periférico e aspirado renal (72).

Vasconcelos e colaboradores avaliaram a expressão gênica de perforina, granzima B e fas-ligante em linfócitos do sangue periférico, cotejando com a expressão dos mesmos a expressão obtida a partir de material de biópsias pareadas dos enxertos renais. Foi encontrada correlação significativa entre a presença de transcritos destes genes tanto no sangue, como nas biópsias. No estudo observou-se também uma diferença estatisticamente significativa na expressão destes genes em material obtido a partir de linfócitos de sangue periférico em pacientes com e sem rejeição aguda (73).

Atualmente, com o advento da técnica de PCR em tempo real, a quantificação dos produtos da reação é feita ciclo a ciclo, com elevada precisão. O método é extremamente sensível e reprodutível e permite a detecção simultânea da expressão de genes de ativação de células T em um curto período de tempo. A aplicação deste método na avaliação de transplantes renais já foi

iniciada e poderá vir a se constituir em um importante método auxiliar na monitorização dos eventos inflamatórios intra-enxerto (74). Sabek e colaboradores, utilizando este método, analisaram e quantificaram a expressão dos genes de ativação da célula T perforina, granzima B e HLA-DR em células do sangue periférico e em biópsias de enxertos renais, correlacionando os resultados com achados histológicos. A utilidade deste ensaio na detecção de rejeição em transplante renal também foi avaliada. Os resultados demonstraram que a utilização da técnica de PCR em tempo real para detectar os genes de ativação granzima B e HLA-DR apresentaram excelente sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de rejeição em células do sangue periférico (74).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cecka JM. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. Clin Transplant 1999; 1-21.
2. Morris PJ. Results of Renal Transplantation. In: Morris PJM, editor. Kidney Transplantation. Principles and Practice. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995.
3. Bastos MG, Medeiros R, Manfro, RC. Transplante renal. Revista da Associação Médica do Brasil 1994; 40: 283- 92.
4. Jordan SC, Quartel AW, Czer LS et al. Posttransplant therapy using high-dose human immunoglobulin (intravenous gammaglobulin) to control acute humoral rejection in renal and cardiac allograft recipients and potential mechanism of action. Transplantation 1998; 66: 800-5.
5. Dalman MJ, Morris PJ Immunology of rejection In: Morris PJ Kidney Transplantation, Principles and Practice. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995.
6. Manfro RC, Gonçalves LF, Veronese FV e cols. Aspectos clínicos, rotinas e complicações do transplante renal. In: Barros E, Manfro RC, Thomé FS, Gonçalves LF, editores. Nefrologia. Rotinas, Diagnóstico e Tratamento. 2 ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1998. p. 475-500.
7. Roitt, I. Roitt's essential immunology. 9th. Ed. Berlin: Blackwell Science, 1997.
8. Powis SH, Trowsdale J. Major and minor histocompatibility antigens. In: Thomson, AW, Catto, GRD, editors. Immunology of Renal Transplantation. 1st ed. London:Edward Arnold; 1993. p. 3-26.

9. Sayegh MH, Perkins DL, Carpenter CB. Transplantation Immunobiology. In: Brenner B, Rector, editors. The Kidney. 6th ed., Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. p. 2518-41.
10. Manfro RC, Gonçalves LF, Saitovich D. Imunologia e farmacologia das drogas imunossupressoras. In: Barros EJJ, Manfro RC, Thomé FS, Gonçalves LF, editores. Nefrologia. Rotinas, Diagnóstico e Tratamento. 2nd ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1998. P. 463-74.
11. Sayegh MH; Turka LA. Cell costimulatory pathways: promising novel target for immunosuppression and tolerance induction. J Am Soc Nephrol, 1995; 6:1143-50.
12. Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. Annu Rev Biochem 1990; 59:253-88.
13. Carpenter CB. Histocompatibility systems in man. In: Ginns LC, Cosimi AB, Morris PJ, editors. Transplantation. 2nd ed. Boston: Blackwell Science; 1999. p. 61-72.
14. Kappes D, Strominger JL. Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. Annu Rev Biochem 1988; 57:991-1028.
15. Opelz G, Mytilineos J, Wujciak T, Schwarz V, Back D. Current status of HLA matching in renal transplantation. The Collaborative Transplant Study. Clin Investig 1993; 70:767-72.
16. Salazar TA, Aweeka FT. Transplantation In: Herfindal ET, Gourley DRH, Lloyd L. Clinical Pharmacy and Therapeutics. 5ed Baltimore: Willian & Wilkins, 1992.

17. Suthantiran M, Morris RE, Strom TB. Immunosupresants: cellular and molecular mechanisms of action. *Am J Kidney Dis*, 1996; 28: 159-72.
18. Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. *N Eng J Med* 1994; 331:365-76.
19. Linsley OS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C, et al Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 1992; 176:1595-604.
20. Tan P, Anasetti C, Hansen JA, Melrose J, Brunwand M, Bredshaw J, et al. Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. *J Exp Med* 1993; 177: 165-73.
21. Lenschow DJ, Zeng Y, Hathcock KS. Inhibition of transplant rejection following treatment with anti-B7-2 and anti-B7-1 antibodies. *Transplantation* 1995; 60:1171-8.
22. Hall BM. Cells mediating allograft rejection. *Transplantation*. 1991; 51.
23. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia molecular da célula*. 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas. 1997.
24. Liu CC, Walsh CM, Young JDE Perforin: structure and function. *Immunol. Today* 1995; 16: 194-201.
25. Lichtenheld MG, Olsen K, Lowrey DV, et al Structure and function of human perforin. *Nature* 1988; 335: 448- 51.
26. Lipman ML, Stevens AC; Bleakley RC et al The strong correlation of cytotoxic T Lymphocyte specific serine protease gene transcripts with renal allograft rejection. *Transplantation* 1992; 53:73-9.

27. Larsen CP, Alexander DZ, Hendrix R, Ritchie SC, Pearson TC. Fas-mediated cytotoxicity. An immunoeffector or immunoregulatory pathway in T cell-mediated immune response? *Transplantation* 1995; 60(3): 221-4.
28. Dhein J, Walczak H, Bäumler C, Debatin KM, Kramer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 1995; 373:438-41.
29. Marques VP, Balda CA, Moura LAR, Pestana JOM, Azjen H, Pacheco-Silva A. Expressão intra-enxerto renal humano de RNAm de perforina, FasL e iNOS durante rejeição aguda irreversível [abstract]. *J Bras Nefrol* 1996; 18:165.
30. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993; 44:411-22.
31. Solez K, Benediktsson H, Cavallo T, Crocker B, Demetris AJ, Drachenberg C et al. Report of the Third Banff Conference on Allograft Pathology on classification and lesion scoring in renal allograft pathology. *Transplant Proc* 1996; 28:441-4.
32. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bousib SM, Castro MC, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55:713-23.
33. Tilney NL, Whitley WD, Diamond J, Kupiec- Weglinski JW, Adams DH. Chronic rejection – an undefined conundrum. *Transplantation* 1991; 52: 389-98.

34. Tullius SG, Tilney NL. Both alloantigen-dependent and independent factors influence chronic allograft rejection. *Transplantation* 1995; 59:313-8.
35. Cecka JM. Early rejection: determining the fate of renal transplants. *Transplant Proc* 1991; 23:1263-4.
36. Cosio FG, Pelletier RP, Falkenhain ME, Henry MC, Elkhammas EA, Davies EA, et al. Impact of acute rejection and early allograft function on renal allograft survival. *Transplantation* 1997; 63:1611-5.
37. Hunsicker LG, Held PJ. The role of HLA matching for cadaveric renal transplants in the cyclosporine era. *Semin Nephrol* 1992; 12:293-303.
38. Azuma H, Nadeau KC, Ishibashi M, Tilney NL. Prevention of functional, structural and molecular changes of chronic rejection of rat renal allografts by a specific macrophage inhibitor. *Transplantation* 1995; 60:1577-82.
39. Akalin E, Chandraker A, Russell ME, Tinke LA, Hancock WW, Sayegh MH. CD28-B7 T cell costimulatory blockade by CTLA4Ig in the rat renal allograft model: inhibition of cell-mediated and humoral immune responses in vivo. *Transplantation* 1996; 62:1942-5.
40. Noronha I, Weis H, Hartley B, Wallach D, Cameron JS, Waldherr R. Expression of cytokines, growth factors, and their receptors in renal allograft biopsies. *Transplant Proc* 1993; 25:917-8.
41. Sharma V, Bologa R, Xu GP, Li B, Mouradian J, Wang J, et al. Intragraft TGF- β mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 1996; 49:1297-303.

42. Tilney NL, Strom TB, McPherson SG, Carpenter CB. Surface properties and functional characteristics of infiltrating cells harvested from acutely rejecting cardiac allografts in inbred rats. *Transplantation* 1975; 20: 323-30.
43. Strom TB, Tilney NL, Carpenter CB, Busch GJ. Identity and cytotoxic capacity of cells infiltrating renal allografts. *N Eng J Med* 1975; 292:1257-63.
44. Strom TB, Tilney NL, Paradysz JM, Bancewicz J, Carpenter CB. Cellular components of allograft rejection: identity, specificity, and cytotoxic function of cells infiltrating acutely rejecting allografts. *J Immunol* 1977; 118:2020-26.
45. Platt JL, LeBien TW, Michael AF. Interstitial mononuclear cell populations in renal graft rejection. Identification by monoclonal antibodies in tissue sections. *J Exp Med* 1982; 151:17-30.
46. Séron D, Díaz-Gallo C, Griñó JM, Castela AM, Carrera M, Bover J, et al. Characterization of interstitial infiltrate in early renal allograft biopsies in patients with stable renal function. *Transplant Proc* 1991; 23:1267-9.
47. Rush DN, Jeffery JR, Gough J. Sequential protocol biopsies in renal transplant patients: repeated inflammation is associated with impaired graft function at 1 year. *Transplant Proc* 1995; 27:1017-8.
48. Kirk AD, Jacobson LM, Heisey DM, Radke NF, Pirsch JD, Sollinger HW. Clinically stable human renal allografts contain histological and RNA-based findings that correlate with deteriorating graft function. *Transplantation* 1999; 68:1578-82.
49. Kawai T, Cosimi AB, Colvin RB, Powelson J, Eason J, Kozlowski T, et al. Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 1995; 59:256-62.

50. Rush DN, Henry SF, Jeffery JR, Schroeder TJ, Gough J. Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. *Transplantation* 1994; 57:208-11.
51. Burdick JF, Beschorner WE, Smith WR, McGraw D, Bender WL, Melville G, et al. Characteristics of early routine renal allograft biopsies. *Transplantation* 1984; 38: 679-84.
52. McWhinnie DL, Thompson JF, Taylor HM, Chapman JR, Bolton EM, Wood RFM, et al. Leucocyte infiltration patterns in renal allografts assessed by immunoperoxidase staining of 245 sequential biopsies. *Transplant Proc* 1985; 17:560-1.
53. Serón D, Moresco F, Bover J, Condom E, Gil-Vernet S, Cañas C et al. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 1997; 51:310-6.
54. Nickerson P, Jeffery JR, Gough J, McKenna M, Grimm PC, Cheang M et al. The identification of clinical and histopathological risk factors of diminished renal function 2 years posttransplant. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:482-7.
55. Lipman ML, Shen Y, Jeffery JR, Gough J, McKenna M, Grimm PC, et al. Immune-activation gene expression in clinically stable renal allograft biopsies: molecular evidence for subclinical rejection. *Transplantation* 1998; 66:1673-81.
56. Grimm PC, McKenna R, Nickerson P, Russell ME, Gough J, Gospodarek E, et al. Clinical rejection is distinguished from subclinical rejection by increased infiltration by a population of activated macrophages. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:1582-9.

57. Rush DN, Nickerson P, Gough J, Mckenna R, Grimm P, Cheang M, et al. Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:2129-34.
58. Rush DN, Karpinski ME, Nickerson P, Dancea S, Birk P, Jeffery JR. Does subclinical rejection contribute to chronic rejection in renal transplant patients? *Clin Transplantation* 1999; 13:441-6.
59. Veronese FV, Centeno AD, Almeida AG, Fritsch A, Mello AG, Webber A, et al. Biópsia percutânea do enxerto renal: para onde vamos? *Rev Ass Med Br* 1999; 45:169-74.
60. Colvin RB. The renal allograft biopsy. *Kidney Int* 1996; 50(3): 1069-82.
61. Saik RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf S., Higuchi R, Horn GT, Mullis KB. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239:487-91.
62. Manfro RC, Barros EJJ, Saitovitch D. Introdução à biologia celular e molecular In: Barros EJJ, Manfro RC, Thomé FS, Gonçalves LFS e colaboradores *Nefrologia: Rotinas, Diagnóstico e Tratamento*. 2 ed. Ed. Artes Médicas Sul, Porto Alegre, 1999.
63. Passaglia LMP, Zaha A. Técnicas do DNA recombinante In: Zaha A *Biologia Molecular Básica*. Ed. Mercado Aberto. Porto Alegre, 1996.
64. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. *Recombinant DNA*. 2 ed. New York: Scientific American Books, W.H. Freeman and Company, 1992.
65. Eisenstein BI. The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Eng J Med* 1990; 322:178-83.

66. Sambrook J, Fritsch EI, Maniats T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, cap. 6, 1989.
67. Pavlakis M, Lipman M, Strom TB. Intragraft expression of T-cell activation genes in human renal allograft rejection. *Kidney Int* 1996; 53 Suppl 1:7-12.
68. Lipman ML, Stevens AC, Strom TB. Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts. *J Immunol* 1994; 152:5120-7.
69. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L, Harmon W, et al. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:695-700.
70. Sharma VK, Bologa RM, Li B, Xu GP, Lagman M, Hiscock W, et al. Molecular executors of cell death - differential intrarenal expression of Fas ligand, Fas, granzyme B, and perforin during acute and/or chronic rejection of human renal allografts. *Transplantation* 1996; 62:1860-6.
71. Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, et al. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Eng J Med* 2001; 344:947-54.
72. Netto MVP, Fonseca BAL, Dantas M, Saber LTS, Castro MCR, Ferraz AS. Granzyme B, fas-ligand and perforin expression during acute cellular rejection episodes after kidney transplantation: comparison between blood and renal aspirates. *Transplant Proc* 2002; 34:476-8.

73. Vasconcellos LM, Asher F, Schachter D, Vasconcellos LH, Shapiro M, Harmon WE et al. Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation* 1998; 66: 562-6.

74. Sabek O, Dorak MT, Kotb M, Gaber AO, Gaber L. Quantitative detection of T- cell activation markers by real-time PCR in renal transplant rejection and correlation with histopathologic evaluation. *Transplantation* 2002; 7:701-7.

II. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a expressão de marcadores moleculares de rejeição aguda em biópsias de vigilância de pacientes transplantados renais.

Objetivos específicos

1. Avaliar a expressão de genes que codificam para a formação de moléculas com capacidade citotóxica em rejeições subclínicas do aloenxerto renal.
2. Avaliar os parâmetros diagnósticos da expressão molecular destes genes na rejeição aguda subclínica.

III. Marcadores Moleculares na Rejeição Aguda Subclínica de Transplantes Renais.

Esther Cristina Aquino Dias

Luiz Felipe Santos Gonçalves

Roberto Ceratti Manfro

Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Serviço de Nefrologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre RS. Brasil.

Titulo Resumido: **Marcadores moleculares na rejeição subclínica**

Marcadores Moleculares na Rejeição Aguda Subclínica de Transplantes Renais.

Clin Transplant

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a expressão de marcadores moleculares da rejeição aguda em biópsias renais de protocolo de pacientes com e sem rejeição aguda subclínica (RASC). Foram realizadas biópsias de protocolo aos dois meses (n=21) e aos doze meses (n=14) pós-transplante renal em pacientes com função estável do enxerto. Após a extração do RNA procedeu-se a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para os genes GAPDH, perforina, granzima B e fas-L. Para o diagnóstico histológico utilizou-se a classificação de Banff 97. A creatinina aos dois meses foi significativamente maior nos pacientes com RASC ($1,46 \pm 0,27$ x $1,18 \pm 0,24$; $P < 0,02$). Transcritos da perforina estiveram presentes em quinze biópsias, dez das quais apresentavam manifestações histológicas de RASC ($P = 0,06$). A expressão da granzima B foi verificada em dez biópsias, nove das quais apresentavam RASC ($P < 0,01$). Ocorreu expressão de fas-L em nove biópsias, tendo oito sido classificadas como RASC ($P < 0,01$). A perforina foi o gene cuja expressão apresentou maior sensibilidade (81%) para o diagnóstico de RASC. A granzima B e o fas-L apresentaram especificidade de 90%. Aos doze meses não houve diferença significativa nas creatininemias dos pacientes com e sem RASC ($1,63 \pm 0,57$ x $1,28 \pm 0,31$; $p = 0,10$). Na análise molecular a expressão de perforina e de granzima B não diferiu nos pacientes com e sem RASC. A expressão de fas-L ocorreu em cinco amostras, quatro das quais apresentavam achados histológicos

de RASC ($P=0,03$). Aos doze meses a perforina foi o gene cuja expressão apresentou maior sensibilidade (83%) e o fas-L apresentou a maior especificidade (88%) para o diagnóstico de RASC. Concluiu-se que a expressão dos genes que codificam para proteínas de ataque citolítico ao enxerto está aumentada nos enxertos com RASC. Estes achados reforçam a noção de que a RASC é um processo imune ativo potencialmente deletério aos enxertos renais.

Palavras Chave: perforina, granzima B, fas L, transplante renal, rejeição subclínica.

Autor para correspondência

Dr. Roberto Ceratti Manfro

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Serviço de Nefrologia

Ramiro Barcelos, 2350, sala 2030

Porto Alegre, RS, Brasil. 90035-003

E-mail: rmanfro@hcpa.ufrgs.br

Fax: 51 33168001

Introdução

Apesar da significativa diminuição de sua incidência observada nos últimos anos a rejeição aguda ainda é um problema relevante na prática dos transplantes renais. O diagnóstico da rejeição aguda do aloenxerto renal tem sido baseado na presença de um infiltrado de células mononucleares em biópsias obtidas no momento da disfunção do órgão. Porém, infiltrados linfo-monocitários de localização túbulo-intersticial e mais raramente perivascular tem sido observados freqüentemente em biópsias de vigilância de rins transplantados funcionalmente estáveis, na ausência de manifestações clínicas ou laboratoriais que sugiram a presença de rejeição aguda (1), caracterizando assim a chamada rejeição aguda subclínica (RASC). A rejeição subclínica nos primeiros meses pós-transplante é detectada em cerca de 30% das biópsias de rotina de rins transplantados estáveis, existindo a sugestão de que deva ser tratada (2, 3). No entanto ainda existem controvérsias sobre a relevância do diagnóstico e pertinência do seu tratamento. Além disso, apesar de a ocorrência de episódios de rejeição aguda ser o principal correlato do desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto, não está completamente aceita a associação entre a RASC e a sua evolução para rejeição crônica (3-5).

A reação de polimerização em cadeia (PCR) permite detectar e quantificar transcritos de genes de diversas citocinas e moléculas citotóxicas presentes em enxertos estáveis, alguns deles com RASC tal como definido pelos critérios de Banff (6). Neste contexto foi então demonstrada a presença inequívoca de imunoativação, embora em grau menor do que na rejeição acompanhada de disfunção do enxerto (7, 8). A expressão de genes envolvidos na ativação e

proliferação linfocitária tem sido estudada como marcador para rejeição, já que estes compõem a maior parte do infiltrado leucocitário e são, possivelmente, os principais mediadores da rejeição ao enxerto. Transcritos de moléculas efetoras das células T citotóxicas têm sido identificados em biópsias renais de enxertos com rejeição aguda e RASC (7, 8, 9).

Conduzimos o presente estudo em que pacientes transplantados renais estáveis foram submetidos à biópsias de protocolo aos dois e aos doze meses pós-transplante com o objetivo de avaliar a presença de transcritos de genes que codificam produtos citotóxicos em biópsias de vigilância de aloenxertos renais com e sem rejeição aguda subclínica, e avaliar os parâmetros diagnósticos que decorrem da sua expressão.

Pacientes e Métodos

Pacientes

Pacientes transplantados renais adultos foram submetidos à biópsias renais de protocolo aos dois e doze meses pós-transplante renal. Aos dois meses pós-transplante vinte e um pacientes foram biopsiados; destes, onze receberam rins de doadores cadáveres e dez receberam órgãos de doadores vivos relacionados. Aos doze meses pós-transplante foram obtidas biópsias em quatorze pacientes, nove receptores de rins de doadores cadáveres e cinco pacientes que receberam rins de doadores vivos. Os motivos para as sete perdas foram: recusa do paciente em submeter-se a segunda biópsia de protocolo em quatro pacientes, gestação, interrupção voluntária da imunossupressão e perda

do enxerto aos três meses em um caso cada. Em todos os casos a imunossupressão inicial foi feita com prednisona, azatioprina e ciclosporina.

Todos os pacientes concordaram em participar do estudo assinando o termo de consentimento. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre acreditado pelo Conselho Nacional de Pesquisa de Ministério da Saúde do Brasil e registrado no Escritório para Proteção de Humanos em Pesquisa (Office for Human Research Protections - OHRP-USDHHS) (Institutional Review Board - IRB 00000921).

Os critérios de inclusão no estudo foram função do enxerto estável com variação da creatinina sérica inferior a 10% nos quinze dias que antecediam a biópsia e ausência de alteração na imunossupressão no mesmo período.

Métodos

Pressão arterial sistólica e diastólica, creatinina sérica e proteinúria de 24 horas foram os parâmetros clínicos e laboratoriais avaliados.

As biópsias renais foram realizadas utilizando-se pistola semi-automática com agulha 16-G após localização ultrassonográfica. O diagnóstico histológico utilizando a classificação de Banff (10) foi efetuado por um patologista renal, sem conhecimento dos dados clínicos. Um terço do fragmento obtido foi imediatamente colocado em nitrogênio líquido e conservado a -70°C para a análise molecular. O restante do tecido foi usado para análise histológica convencional.

A caracterização histológica, de acordo com a classificação Banff 97, aos dois meses pós-transplante apresentou os seguintes resultados:

rim transplantado normal (n=1); suspeita de rejeição (n=5); rejeição aguda 1A (n=3); rejeição aguda 1B (n=2); rejeição aguda 2A (n=1); nefropatia crônica do enxerto (n=2); outras lesões não rejeição (n=7). Para a correlação com os achados das análises moleculares foram consideradas como tendo RASC as onze amostras que ao exame histológico apresentaram os diagnósticos de suspeita de rejeição ou rejeições grau 1A, 1B e 2A.

O material para as análises moleculares foi descongelado, macerado e processado para a extração do RNA utilizando-se o método Rneasy mini kit (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria (GeneQuant-Pro, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cambridge, UK) em um comprimento de onda de 260 nm e estocado à -70°C. A transcrição reversa em DNA foi executada em três etapas. Primeiro, em um tubo para microcentrífuga de 0,5 ml, preparou-se a mistura de componentes para o volume de 31µl: 10 µl de tampão "First Strand" (5x); 10 µl de deoxinucleotídeos (dNTPs) com 10 mM de cada base (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); 5 µl de Ditioneitol (DTT) 0,1 M; 1 µl de albumina bovina acetilada (20 µg/ml); 1 µl de RNAsin (inibidor de ribonuclease) 40 U/µl; 2 µl de "primers" de hexanucleotídeos (oligo-dt₁₂₋₁₈ - 0,1 ug/µl); 2 µl da enzima transcriptase reversa do vírus Moloney murine leucemia (RVT- MMLV [200 U/µl]). Segundo, 1 a 10 µg do RNA total, elevando-se seu volume a 19 µl com água DEPC, completando o volume final de 50 µl de reação. Esta preparação foi incubada a 65°C por 10 minutos e mantida no gelo por mais 5 minutos. Terceiro, adicionou-se o RNA linearizado à primeira mistura completando o volume final de 50µl de reação. Para síntese de DNA complementar foram utilizadas as seguintes temperaturas:

37°C por 1 hora; gelo picado por 5 minutos; 65°C por 10 minutos e gelo picado seguido de congelamento a - 70°C.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi executada visando-se avaliar a expressão dos genes que codificam para a produção de perforina, granzima B e fas-ligante. A expressão do gene da enzima gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizada para comprovar a eficiência da extração do RNA e da transcrição reversa. A mistura da PCR constou de: 1 µl primers (sense e antisense) gene específico (0,1 µg/ul), 3 µl de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 10 mM, 3 µl de cloreto de magnésio (MgCl₂) 50 mM, 5 µl de solução tampão 10x, 0,5 µl de *taq* DNA polimerase, 2 µl de cDNA e água estéril para um volume final de 50 µl.

As seqüências dos “primers” utilizados foram:

(a) GAPDH - (5' Sense: GGTGAAGGTCGGAGTCAACG e 3' Antisense: CAAAGTTGTCATGGATGACC), que resultam em um fragmento de 496 pares de base (pb).

(b) Perforina - (5' Sense: CGGCTCACACTCACAGG e 3' Antisense: CTGCCGTGGATGCCTATG) que resultam em um fragmento de 369 pb.

(c) Granzima B - (5' Sense: GGGGAAGCTCCATAAATGTCACCT e 3' Antisense: TACACACAAGAGGGCCTCCAGAGT) que resultam em um fragmento de 431pb.

(d) Fas-ligante - (5' Sense: GCCTGTGTCTCCTTGTGA e 3' Antisense: GCCACCCTTCTTATACTT) que resultam em um fragmento de 321 pb.

As condições de ciclagem na PCR foram: desnaturação a 94°C (45s), anelamento a 55°C (45s) e extensão a 72°C (60s) por 35 ciclos para os genes de GAPDH e fas-ligante. Para os genes da granzima B e perforina as condições de ciclagem foram: 94°C (45s), 62°C (45s) e 72°C (60s) por 40 ciclos respectivamente para desnaturação, anelamento e extensão. Utilizou-se o termociclador MJ-Research, Inc., modelo PTC-100, Watertown, USA.

Os controles positivos foram obtidos a partir de fragmentos de rim normal para expressão de GAPDH e de células mononucleares estimuladas em cultura com fitohemaglutinina para os demais genes. Produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 2%, evidenciados com brometo de etídeo por transiluminação com luz ultra violeta e fotografados pelo software de captura de imagens Kodak Digital Science[®] (Rochester, USA).

A expressão dos genes foi avaliada de acordo com a presença ou ausência de rejeição aguda histológica. Para o desfecho rejeição aguda subclínica avaliou-se o risco relativo (\pm intervalo de confiança de 95%) da presença ou ausência da expressão dos genes em estudo individualmente e em conjunto.

Utilizou-se o teste *t* para amostras independentes para a análise de variáveis contínuas. O teste exato de Fisher foi utilizado para as variáveis categóricas. O nível de significância utilizado foi o de $P < 0,05$.

Resultados

Os genes de imunoativação perforina, granzima e fas-ligante foram analisados em vinte e uma biópsias de protocolo feitas dois meses após o

transplante. Para a análise aos doze meses pós-transplante, quatorze amostras estiveram disponíveis.

A diferença das médias das creatininas séricas aos dois meses foi estatisticamente significativa tendo sido maior no grupo de pacientes com rejeição aguda subclínica ($1,46 \pm 0,27$ x $1,18 \pm 0,24$ mg/dl; $P = 0,02$). As médias das proteinúrias de 24 horas foram $370,4 \pm 185,7$ e $412,9 \pm 387,7$ mg/24 horas respectivamente nos pacientes com e sem RASC ($P = 0,748$). As médias de pressão arterial sistólica foram $138,9 \pm 13,6$ e $135,0 \pm 23,2$ mmHg para pacientes com e sem RASC ($P = 0,667$). As médias das pressões diastólicas foram $83,9 \pm 7,8$ e $84,5 \pm 12,6$ mmHg para pacientes com e sem RASC ($P = 0,902$).

Identificou-se a presença de transcritos de perforina em quinze biópsias, das quais dez apresentavam manifestações histológicas de rejeição aguda subclínica ($P = 0,06$). A expressão do gene da granzima B foi verificada em dez biópsias, das quais nove apresentavam manifestações histológicas de rejeição aguda ($P < 0,01$). Para o gene do fas-ligante, a expressão ocorreu em nove biópsias e entre estas, oito foram classificadas como tendo rejeição aguda ($P < 0,01$). Na figura 1 estão demonstrados exemplos representativos de transcritos obtidos a partir das biópsias de vigilância aos dois meses (Figura 1).

A avaliação dos dados da expressão e dos parâmetros diagnósticos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia das amostras de biópsias aos dois meses pós-transplante estão demonstrados na tabela 1, bem como os riscos relativos com os respectivos intervalos de confiança de 95% para a ocorrência de rejeição

aguda subclínica de acordo com a expressão dos diferentes genes analisados isoladamente e em conjunto. Associações estatisticamente significativas foram encontradas para a expressão isolada de granzima B e de fas-ligante. Nas análises combinadas a expressão conjunta de granzima B com fas-ligante e a expressão de quaisquer dois dos três genes resultaram em associações estatisticamente significativas. Os riscos relativos para a presença de RASC aos dois meses pós-transplante obtiveram valores elevados ($\geq 3,6$) para todas as análises das expressões dos genes isoladamente e em conjunto (Tabela 1).

As amostras colhidas aos doze meses pós-transplante apresentaram a seguinte classificação histológica: rim transplantado normal (n=1), suspeita de rejeição (n=4), rejeição aguda 1 B (n=2), nefropatia crônica do enxerto I (n=2), nefropatia crônica do enxerto II (n=1), outras lesões não rejeição (n=4).

Apesar da diferença observada nas médias das creatininas séricas aos doze meses, este valor não alcançou significância estatística quando comparada ao grupo sem rejeição aguda subclínica ($1,63 \pm 0,57$ x $1,28 \pm 0,31$ mg/dl; $P = 0,10$). Aos doze meses, as médias das proteinúrias de 24 horas foram $402,8 \pm 194,0$ e $414,8 \pm 368,1$ mg/24 horas respectivamente nos pacientes com e sem RASC ($P = 0,942$). As médias de pressão arterial sistólica foram $148,0 \pm 10,9$ e $139,0 \pm 15,8$ mmHg para pacientes com e sem RASC ($P = 0,276$). As pressões diastólicas foram $90,0 \pm 7,0$ e $85,4 \pm 8,5$ mmHg para pacientes com e sem RASC ($P = 0,317$).

Na análise molecular aos 12 meses sete amostras apresentaram expressão para o gene da perforina, das quais cinco apresentavam critérios diagnósticos histológicos para rejeição aguda ($P = 0,10$). A expressão do gene da

granzima B foi detectada em seis amostras, das quais cinco apresentavam diagnóstico histológico de rejeição aguda ($P = 0,091$). Por fim, a expressão do gene do fas-L ocorreu em cinco amostras quatro das quais apresentavam achados histológicos compatíveis com rejeição aguda ($P = 0,03$). Os parâmetros diagnósticos das expressões moleculares para o desfecho RASC e os riscos relativos avaliados os doze meses pós-transplante estão demonstrados na tabela 2. Uma associação estatisticamente significativa foi encontrada para a expressão isolada de fas-ligante. Na análise combinada da expressão de qualquer um dos três genes não foi encontrada associação estatisticamente significativa. Os riscos relativos para a presença de RASC aos doze meses pós-transplante foram elevados ($\geq 4,0$) para todas as análises das expressões dos genes isoladamente e em conjunto (Tabela 2).

Discussão

A identificação de células inflamatórias com potencial citotóxico na presença de tubulite e/ou vasculite suscita a hipótese de que a rejeição aguda subclínica (RASC) possa ser patogênica e que possa tardiamente resultar em dano crônico ao enxerto. As biópsias de protocolo, também chamadas de biópsias de vigilância, são utilizadas para diagnosticar a RASC (10).

A utilidade das biópsias de vigilância para monitorização imunológica de rins transplantados estáveis ainda é debatida, embora diversos estudos tenham demonstrado que ao redor de 30% destes enxertos tem critérios inequívocos de rejeição aguda nos primeiros três meses pós transplante (11-15), e cerca de 20% a 50% apresentam rejeição crônica histológica decorrido um ano do transplante

(2, 13). Serón et al, diferentemente das séries citadas, detectaram RASC em biópsia de protocolo oito semanas pós-transplante em apenas 4,1% dos pacientes, o que poderia ser explicado, entre outros fatores, pelo esquema imunossupressor que incluiu indução com anticorpos antilinfocitários e pela precocidade da biópsia de vigilância (16). Este dado sugere que a imunossupressão pode influenciar a prevalência e a magnitude do infiltrado intersticial mononuclear, como já observado anteriormente para esquemas que incluíam ciclosporina (17).

No presente estudo, os pacientes com suspeita de rejeição foram incluídos no grupo com rejeição subclínica para fins de análise estatística, com base nos dados de Rush et al (18), que encontraram uma correlação significativa entre alterações limítrofes para rejeição e episódios de rejeição clínica em meses subsequentes. Igualmente, no estudo de Saad et al, o tratamento da rejeição limítrofe ou *“borderline”* resultou na melhora da função do enxerto em uma proporção significativa de pacientes, sugerindo que esta categoria histológica represente uma rejeição tubulointersticial de grau leve (19).

A aplicação de técnicas de biologia molecular em biópsias de vigilância pode aumentar a acurácia diagnóstica. Através de métodos mais sensíveis e específicos como a PCR, a identificação de transcritos de genes citotóxicos pode indicar a presença de um processo patogênico que necessite de tratamento, ou pelo menos imunossupressão profilática mais eficiente para proteção do enxerto renal (3, 5). Diversos estudos empregando estes métodos têm demonstrado a presença de transcritos de genes citotóxicos na rejeição aguda acompanhada de disfunção do enxerto (7, 20) e também no enxerto com função estável (8, 21).

A co-expressão intraenxerto do RNA mensageiro dos genes que codificam para perforina, granzima B e fas ligante mostraram sensibilidade e especificidade de 100% para o diagnóstico de rejeição aguda em um estudo (7) e em outro foi observada uma correlação direta entre esta co-expressão e o grau de severidade da rejeição histológica definida pelos critérios de Banff (22). Lipman et al, utilizando técnica de PCR quantitativo, também demonstraram em biópsias de enxertos estáveis com rejeição aguda subclínica a presença de transcritos dos genes de perforina, granzima B e fas ligante entre outros. Comparando com biópsias normais e com infiltrado limítrofe para rejeição, a expressão de perforina foi significativamente maior na RASC, assim como a expressão da cadeia beta do receptor de célula T, interferon γ , IL-4 e IL-15 (8). No estudo de Sharma et al, empregando a mesma metodologia, mas em rins com rejeição clínica, a expressão do RNA mensageiro de granzima B e de fas ligante mostrou uma excelente correlação com rejeição aguda, demonstrando o envolvimento das duas vias citolíticas na rejeição ao aloenxerto (22).

Mais recentemente, o diagnóstico não invasivo de rejeição aguda em transplantes renais também vem sendo realizado através de métodos moleculares. Em estudos recentes identificou-se a expressão de moléculas efetoras em leucócitos do sangue periférico (23), em células da urina (24) e em células de aspirados renais (25), todos correlacionados à transcrição dos mesmos genes em biópsias de enxertos renais com rejeição aguda. No estudo de Li et al (24), a sensibilidade e a especificidade da expressão do RNA mensageiro de perforina e de granzima B em células da urina para o diagnóstico de rejeição aguda foram 83%, 83%, 79% e 77%, respectivamente.

A identificação de DNA do doador na urina de receptores de transplantes renais também vem sendo sugerida como um método molecular, não invasivo, útil no estabelecimento do diagnóstico de rejeição aguda (26).

Neste estudo avaliamos qualitativamente a presença de transcritos e de acordo com os estudos citados acima, observamos que a expressão dos genes da granzima B e fas ligante detectada nas biópsias aos dois meses foi preditiva de RASC, e que a expressão de fas-ligante persistiu significativamente aumentada nos pacientes com RASC diagnosticada aos doze meses. Embora sem diferença estatística, a expressão de perforina também foi mais prevalente. É possível que a ausência de significância estatística possa estar relacionada ao pequeno número de pacientes na amostra estudada. Nas análises combinadas a expressão conjunta de granzima B e fas-ligante e a expressão de quaisquer dois dos três genes também resultaram em associações estatisticamente significativas aos dois meses, enquanto que as mesmas análises aos doze meses não alcançaram significância estatística. Estes dados reforçam a hipótese de que estas vias citolíticas possam estar presentes como um dos mecanismos efetores de lesão do enxerto na rejeição aguda subclínica.

No presente estudo, o cálculo dos riscos relativos para a presença de rejeição aguda subclínica aos dois e aos doze meses demonstrou valores elevados. Entretanto, apesar da significância estatística, deve-se ressaltar que, em função do pequeno número de casos avaliados, os valores de intervalo de confiança muito amplos dificultam a interpretação dos resultados.

Assim como em outro estudo (15), nossos resultados mostraram que pacientes com RASC aos dois meses apresentam creatinina sérica significativamente maior que pacientes sem RASC. A diferença das médias das creatininas séricas aos doze meses não alcançou significância estatística quando comparada ao grupo sem rejeição aguda subclínica neste momento, possivelmente pelo pequeno número de casos avaliados.

Necessariamente, mais estudos que melhor caracterizem a RASC, seus mecanismos, relevância e repercussões sobre os enxertos deverão ser realizados. Métodos quantitativos mais sensíveis e reprodutíveis, como a reação em cadeia da polimerase em tempo real entre outros (27), poderão ser úteis para a melhor monitorização dos enxertos e para definir os mecanismos da rejeição, provavelmente auxiliando na individualização da terapia imunossupressora.

Referências bibliográficas

1. Serón D, Díaz-Gallo C, Griñó JM et al. Characterization of interstitial infiltrate in early renal allograft biopsies in patients with stable renal function. *Transplant Proc* 1991; 23: 1267.
2. Rush DN, Jeffery J, Gough J. Sequential protocol biopsies in renal transplant patients, Clinical-pathological correlations using the Banff schema. *Transplantation* 1995; 59: 511.
3. Rush DN, Nickerson P, Gough J et al. Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 2129.
4. Rush DN, Karpinski ME, Nickerson P et al. Does subclinical rejection contribute to chronic rejection in renal transplant patients? *Clin Transplant* 1999; 13: 441.
5. Nickerson P, Jeffery J, Gough J et al. Effect of increasing baseline immunosuppression on the prevalence of clinical and subclinical rejection: a pilot study. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1801.
6. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993; 44:411.
7. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M et al. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 695.

8. Lipman ML, Shen Y, Jeffery JR et al. Immune-activation gene expression in clinically stable renal allograft biopsies: molecular evidence for subclinical rejection. *Transplantation* 1998; 66: 1673.
9. Pavlakis M, Lipman M, Strom TB Intragraft expression of T-cell activation genes in human renal allograft rejection. *Kidney Int* 1996; 53 (suppl.1): 7.
10. Racusen LC, Solez K, Colvin RB et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55: 713.
11. Veronese FV, Centeno AD, Almeida AG et al. Biópsia percutânea do enxerto renal: para onde vamos? *Rev Ass Med Br* 1999; 45: 169.
12. Rush DN, Henry SF, Jeffery JR et al Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. *Transplantation* 1994; 57: 208.
13. Legendre C, Thervet E, Skhiri H et al. Histological features of chronic allograft nephropathy revealed by protocol biopsies in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1998; 65: 1506.
14. Veronese FV, Gonçalves LF, Edelweiss MI, Manfro RC. Interpretation of surveillance kidney allograft biopsies according to the Banff criteria. *Transplant Proc* 1999; 31:3019.
15. Rush DN, Jeffery JR, Gough J. Sequential protocol biopsies in renal transplant patients: repeated inflammation is associated with impaired graft function at 1 year. *Transplant Proc* 1995; 27: 1017.

16. Séron D, Moresco F, Bover J et al. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 1997; 51: 310.
17. McWhinnie DL, Thompson JF, Taylor HM et al. Morphometric analysis of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labeling in sequential human renal allograft biopsies. *Transplantation* 1986; 42: 352.
18. Rush, DN, Nickerson P, Jeffery JR et al. Protocol biopsies in renal transplantation: research tool or clinically useful? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; 7: 691.
19. Saad R, Gritsch HA, Shapiro R et al. Clinical significance of renal allograft biopsies with "borderline changes", as defined in the Banff schema. *Transplantation* 1997; 64: 992.
20. Lipman ML, Stevens AC, Strom TB. Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts. *J Immunol* 1994; 152: 5120.
21. Grimm PC, McKenna R, Nickerson P et al. Clinical rejection is distinguished from subclinical rejection by increased infiltration by a population of activated macrophages. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1582.
22. Sharma VK, Bologa RM, Li B et al. Molecular executors of cell death-differential intrarenal expression of Fas ligand, Fas, granzyme B, and perforin during acute and/or chronic rejection of human renal allografts. *Transplantation* 1996; 62: 1860.

23. Vasconcellos LM, Schachter AD, Zheng XX et al. Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation* 1998; 66: 562.
24. Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK et al. Noninvasive diagnosis of renal allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Eng J Med* 2001; 344: 947.
25. Netto MVP, Fonseca BAL, Dantas M, Saber LTS, Castro MCR, Ferraz AS. Granzyme B, fas-ligand and perforin expression during acute cellular rejection episodes after kidney transplantation: comparison between blood and renal aspirates. *Transplant Proc* 2002; 34:476-8.
26. Zhang Z, Ohkohchi N, Sakurada M et al. Analysis of urinary donor derived DNA in renal transplant recipients with acute rejection. *Clin Transplant* 2002; 16 (suppl. 8): 45.
27. Sabek O, Dorak MT, Kotb M et al. Quantitative detection of T- cell activation markers by real- time PCR in renal transplant rejection and correlation with histopathologic evaluation. *Transplantation* 2002; 7: 701.

Tabela 1. Avaliação dos parâmetros diagnósticos em percentagens e riscos relativos para rejeição aguda sub-clínica aos 2 meses. Expressão isolada e conjunta de transcritos de perforina, granzima B e fas-ligante.

Genes	Expressão	Se	Es	VPP	VPN	Ac	P*	RR (IC 95%)
Perforina	15/21	91	50	67	83	71	0,06	4,0 (0,65 - 24,8)
Granzima B	10/21	81	90	90	81	86	0,002	5,0 (1,40 - 17,6)
Fas-Ligante	09/21	72	90	88	66	81	0,008	3,6 (1,30 - 9,7)
Perf + GB	15/21	90	50	67	83	86	0,06	4,0 (0,65 - 24,8)
Perf + FasL	15/21	90	50	67	83	86	0,06	4,0 (0,65 - 24,8)
GB + FasL	11/21	82	80	82	80	81	0,009	4,1 (1,20 - 14,6)
Um dos três	15/21	90	50	67	83	71	0,06	4,0 (0,65 - 24,8)
Dois dos três	11/21	82	80	82	80	81	0,009	4,1 (1,20 - 14,6)

Se = sensibilidade; Es = especificidade; VPP = valor preditivo positivo; VPN = valor preditivo negativo; Ac = acurácia; RR = risco relativo; IC = intervalo de confiança;

*teste exato de Fisher.

Tabela 2. Avaliação dos parâmetros diagnósticos e riscos relativos para rejeição aguda sub-clínica aos 12 meses. Expressão isolada e conjunta dos diferentes genes.

Genes	Expressão	Se	Es	VPP	VPN	Ac	P*	RR (IC 95%)
Perforina	07/14	83	75	71	86	79	0,10	5,0 (0,77 - 32,5)
Granzima B	06/14	80	77	66	87	79	0,091	5,3 (0,78 - 36,3)
Fas-Ligante	05/14	80	88	80	88	86	0,03	7,2 (1,08 - 48,1)
Um dos três	07/14	80	67	57	57	71	0,266	4,0 (0,58 - 27,4)

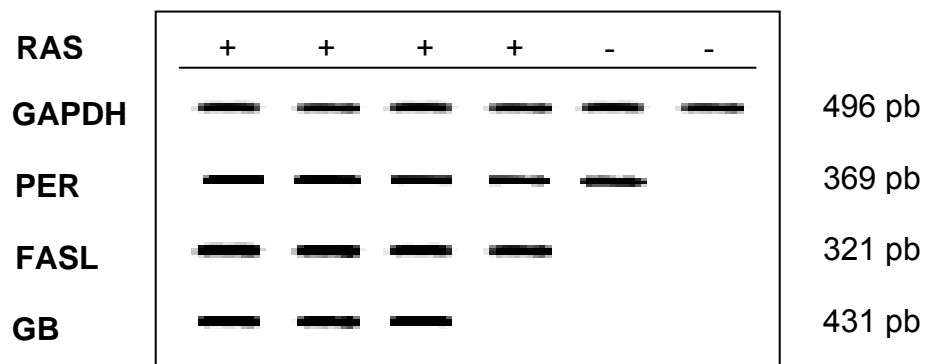
Se = sensibilidade; Es = especificidade; VPP = valor preditivo positivo; VPN = valor preditivo negativo; Ac = acurácia; RR = risco relativo; IC = intervalo de confiança;

*teste exato de Fisher

Legenda da figura

Figura 1: Expressão de GAPDH, perforina, fas ligante e granzima B em biópias de vigilância aos 2 meses em pacientes transplantados renais com e sem rejeição aguda subclínica. * 1 Rasc = Rejeição aguda subclínica; + = presente; - = ausente; GAPDH = Gliceraldeído fosfato desidrogenase; Per = Perforina; FasL = Fas Ligante; GB = Granzima B; pb = pares de bases.

FIGURA 1



Molecular markers in acute subclinical rejection of renal transplants.

Esther Cristina Aquino Dias

Francisco José Veríssimo Veronese

Luiz Felipe Santos Gonçalves

Roberto Ceratti Manfro

Post Graduation Medical Sciences: Nephrology Program. School of Medicine,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Renal Division, Hospital de Clínicas
de Porto Alegre. Porto Alegre, Brazil.

Running head: Molecular markers in subclinical rejection.

Dias ECA, Veronese FJ, Gonçalves LF, Manfro RC.

Molecular markers in acute subclinical rejection of renal transplants.

Clin Transplant

ABSTRACT

In this study we evaluated the expression of molecular markers of acute rejection in protocol biopsies of patients with and without acute subclinical rejection (ASCR). Protocol biopsies were performed at 2 months (N = 21) and 12 months (N = 14) after kidney transplantation in patients with stable allograft function. After biopsy tissue RNA isolation, reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) for the GAPDH, perforin, granzyme B and Fas ligand genes were performed. The Banff 97 classification was used for histological diagnosis. Creatinine concentrations at 2 months were significantly higher in patients with ASCR (1.46 ± 0.27 x 1.18 ± 0.24 ; $P < 0.02$). Perforin transcripts were found in 15 biopsy specimens, ten of which had histological signs of ASCR ($P = 0.06$). Granzyme B expression was found in 10 specimens, 9 of which had ASCR ($P < 0.01$). Fas ligand was expressed in 9 specimens, and 8 of them were classified as ASCR ($P < 0.01$). Perforin expression had the highest sensitivity (81%) for the diagnosis of ASCR. Granzyme B and Fas ligand had specificity of 90%. At 12 months, there was no significant difference in creatinine concentrations for patients with and without previous ASCR (1.63 ± 0.57 x 1.28 ± 0.31 ; $P = 0.10$). Molecular analysis revealed that there was no statistically significant difference in the expression of perforin and granzyme B in patients with and without ASCR. Fas ligand expression

was observed in 5 samples, 4 of which had histological signs of ASCR (P = 0.03). At 12 months, perforin expression had the highest sensitivity (83%), and Fas ligand, the highest specificity (88%) for the diagnosis of ASCR. We concluded that the expression of genes that encode proteins involved in the cytolytic attack against the allograft is increased in kidneys with ASCR. These findings support the understanding that ASCR is an active immune process potentially deleterious to renal allografts.

Key words: perforin, granzyme B, Fas ligand, renal transplantation, subclinical rejection.

Corresponding author:

Roberto Ceratti Manfro M.D.

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Renal Division

Ramiro Barcelos, 2350, sala 2030

Porto Alegre, RS, Brazil. 90035-003

E-mail: rmanfro@hcpa.ufrgs.br

Fax: 55 51 33168001

Introduction

The incidence of acute rejection of renal allograft has significantly decreased in recent years, but this episode remain a significant problem in renal transplantation. The diagnosis of renal allograft acute rejection has been based on the identification of a mononuclear cell infiltrate in biopsies obtained when organ dysfunction is observed. However, tubulointerstitial and, less often, perivascular lymphocytic and monocytic infiltrates have often been found in protocol biopsies of transplanted kidneys with stable function and without clinical or laboratory findings that may suggest acute rejection (1), which characterizes the so-called acute subclinical rejection (ASCR). ASCR is detected in routine allograft biopsies in the first two or three months post-transplantation in about 30% of stable kidneys, existing the suggestion that it should be treated (2, 3). However, the relevance of its diagnosis and the pertinence of its treatment are still controversial. Moreover, the association between ASCR and chronic allograft nephropathy and its progression is not fully accepted, although it is known that acute rejection episodes are closely related to the development of chronic allograft nephropathy (3-5).

By using polymerase chain reaction (PCR) it is possible to detect and quantify gene transcripts for several cytokines and cytotoxic molecules found in stable allografts, some of which may have ASCR according to the Banff criteria (6). In such situation, the unequivocal presence of immunoactivation gene transcripts has been demonstrated, although at a lesser degree than it is observed in rejection accompanied by allograft dysfunction (7, 8). The expression of genes involved in lymphocyte activation and proliferation has been studied as a rejection marker, among other reasons, because

lymphocytes compose the largest part of the graft infiltrate and are likely to be the main mediators of acute allograft rejection. Transcripts of effector molecules present in cytotoxic T-cells have been found in allograft biopsies with acute rejection and ASCR (7-9).

We performed protocol biopsies in stable renal transplant patients at 2 and 12 months post-transplantation. Our purpose was to evaluate the presence of intragraft gene transcripts encoding cytotoxic products in renal allografts with and without subclinical acute rejection, and to evaluate the diagnostic parameters of their expression.

Patients and Methods

Patients

Protocol biopsies were performed in adult renal transplant patients at 2 and 12 months post-transplantation. Twenty-one patients underwent biopsy at 2 months post-transplantation; eleven of them received kidneys from cadaver donors, and ten, from living-related donors. At 12 months post-transplantation, fourteen of the initial 21 patients underwent a second biopsy; nine received kidneys from cadaver donors, and five, from live donors. The reasons for the seven losses were: refusal to undergo a second biopsy (4 patients); pregnancy, voluntary discontinuation of immunosuppression, and allograft loss at 3 months (one patient each). Prednisone, azathioprine and cyclosporine made up the initial immunosuppression regimen for all patients.

All patients agreed to participate in the study and signed an informed consent document. This study was approved by the Committee on Medical Ethics of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, accredited by Conselho Nacional de Pesquisa (National Research Council) of the Brazilian Health Ministry, and registered at the Office for Human Research Protections – OHRP-USDHHS, Institutional Review Board – IRB 00000921.

Patients included in the study had stable allograft function with a serum creatinine concentration that had not changed by more than 10% in the 15 days before biopsy, and an immunosuppressive drug regimen that had not changed in the same period. Ultrasound-guided kidney biopsy specimens were collected with a 16-gauge needle in a spring-loaded biopsy gun. A renal pathologist blinded to clinical data made the histological diagnoses according to the Banff 97 classification (10). A fragment of each sample was immediately placed in liquid nitrogen and stored at –70° C for molecular analysis. The rest of the sample was used for conventional histological analysis.

Methods

Systolic and diastolic blood pressure, serum creatinine and 24 hour proteinuria were the clinical and laboratory parameters evaluated.

The material for molecular analysis was thawed, macerated and processed for RNA isolation with Rneasy Mini Kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA) according to manufacturer's instructions. Isolated RNA was quantified in an spectrophotometer (GeneQuant-Pro, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cambridge, ING) adjusted to a

wavelength of 260 nm, and stored at -70°C . Reverse transcription was performed in three steps. First, a mixture of components for a volume of 31 μl was prepared in a 0.5 ml microcentrifuge tube: 10 μl first-strand buffer (5x); 10 μl 10 mM deoxynucleoside triphosphates - dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); 5 μl 0.1 M Dithiothreitol (DTT); 1 μl (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bovine serum albumin; 1 μl 40 U/ μl RNAsin (ribonuclease inhibitor); 2 μl hexanucleotide primers (oligo-dt₁₂₋₁₈ - 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); 2 μl Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (RVT-MMLV [200U/ μl]). Second, one to 10 μg of total RNA, was added to another tube to a final volume of 19 μl with DEPC-treated water. This preparation was incubated at 65°C for 10 minutes and stored in ice for 5 more minutes. Third, the linearized RNA was added to the first mixture completing the 50 μl final volume of the reaction. Complementary DNA synthesis was performed in the following sequence: incubation at 37°C for one hour, cooling in crushed ice for five minutes, incubation again at 65°C for ten minutes, cooling in crushed ice and freezing at -70°C .

Polymerase chain reaction (PCR) was performed to evaluate the expression of genes that encode perforin, granzyme B and Fas ligand. The expression of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene was used to check effective RNA isolation and reverse transcription. The PCR solution contained 1 μl specific gene (sense and antisense) primers (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 3 μl 10 mM dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 3 μl 50 mM magnesium chloride (MgCl_2), 5 μl 10x buffer solution, 0.5 μl *Taq* DNA polymerase, 2 μl cDNA, and sterile water to a final volume of 50 μl .

The following primer sequences were used:

- (a) GAPDH - (5' Sense: GGTGAAGGTCGGAGTCAACG and 3' Antisense: CAAAGTTGTCATGGATGACC), producing a 496 base pair (bp) fragment.
- (b) Perforin - (5' Sense: CGGCTCACACTCACAGG and 3' Antisense: CTGCCGTGGATGCCTATG), producing a 369 bp fragment.
- (c) Granzyme B - (5' Sense: GGGGAAGCTCCATAAATGTCACCT and 3' Antisense: TACACACAAGAGGGCCTCCAGAGT), producing a 431 bp fragment.
- (d) Fas ligand – (5' Sense: GCCTGTGTCTCCTTGTGA and 3' Antisense: GCCACCCTTCTTATACTT), producing a 321 bp fragment.

PCR cycling conditions were: 35 cycles of denaturation at 94° C (45 s), annealing at 55° C (45 s) and extension at 72° C (60 s) for GAPDH and Fas ligand. For granzyme B and perforin, cycling conditions were: 40 cycles of 94° C (45 s), annealing at 62° C (45 s), and extension at 72° C (60 s). A PTC-100 thermocycler was used (MJ-Research Inc., Watertown, USA).

Positive controls were obtained from normal kidney fragments for GAPDH expression, and from mononuclear cells stimulated in culture with phytohemagglutinin for the other genes. PCR products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gel, stained with ethidium bromide, visualized by UV transillumination, and photographed with the image capture software Kodak Digital Science® (Rochester, USA).

Gene expression was correlated with the presence or absence of histological acute rejection. For the subclinical acute rejection outcome, the relative risk (\pm 95% confidence interval) of presence or absence of gene expression was evaluated for each product and for all of them as a group.

The *t* test for independent samples was used for the analysis of continuous variables. The Fisher exact test was used for categorical data. Statistical significance was established at $P < 0.05$.

Results

Genes encoding for perforin, granzyme B and Fas ligand expression were analyzed in 21 and 14 protocol biopsy specimens at 2 and 12 months post-transplantation respectively.

Histological examination at 2 months post-transplantation showed the following results: normal transplanted kidney (N = 1); suspicious for acute rejection (N = 5); acute rejection grade 1A (N = 3); acute rejection grade 1B (N = 2); acute rejection 2A (N = 1); chronic allograft nephropathy (N = 2); lesions other than rejection (N = 7). For the correlation with molecular analysis findings, the 11 samples histologically classified as borderline and rejection 1A, 1B and 2A were considered to have ASCR.

The difference of the means for serum creatinine concentrations at 2 months was statistically significant, and was greater for the group of patients with acute subclinical rejection (1.46 ± 0.27 x 1.18 ± 0.24 mg/dl; $P = 0.02$). The means for 24-hour proteinuria were 370.4 ± 185.7 and 412.9 ± 387.7 mg/24 hours for the patients

with and without ASCR ($P = 0.748$). The means for systolic blood pressure were 138.9 ± 13.6 and 135.0 ± 23.2 mmHg for patients with and without ASCR ($P = 0.667$). Means for diastolic blood pressure were 83.9 ± 7.8 and 84.5 ± 12.6 mmHg for patients with and without ASCR ($P = 0.902$).

Perforin transcripts were found in 15 biopsy specimens, 10 of which had histological signs of acute subclinical rejection ($P = 0.06$). Granzyme B expression was found in 10 specimens, 9 of which had histological signs of acute rejection ($P < 0.01$). Fas ligand was expressed in 9 specimens, 8 of which had acute rejection ($P < 0.01$). Figure 1 shows examples of the transcripts obtained from 2-month surveillance biopsy specimens (Figure 1).

Table 1 shows expression data and diagnostic parameters of sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and accuracy for the biopsies at 2 months post-transplantation, and relative risk with corresponding 95% confidence intervals for acute subclinical rejection according to expression of the different genes analyzed individually or as a group. Statistically significant associations were found for individual expression of granzyme B and Fas ligand. The combined expression of granzyme B and Fas ligand and the expression of any two of three genes showed statistically significant associations. Relative risk for presence of ASCR at 2 months post-transplantation was high (≥ 3.6) for all individual and group analyses of gene expression (Table 1).

The samples collected at 12 months post-transplantation had the following histological diagnoses: normal transplanted kidney ($N = 1$); suspicious for acute rejection ($N = 4$); acute rejection grade 1B ($N = 2$); chronic allograft nephropathy

grade II (N = 1); lesions other than rejection (N = 4).

The difference of mean serum creatinine concentration at 12 months was not statistically significant in the comparison of the groups with and without acute subclinical rejection (1.63 ± 0.57 x 1.28 ± 0.31 mg/dl; $P = 0.10$) although it was higher than in the group with ASCR. At 12 months, the means for 24-hour proteinuria were 402.8 ± 194.0 and 414.8 ± 368.1 mg/24 hours for the patients with and without ASCR respectively ($P = 0.942$). The means for systolic blood pressure were 148.0 ± 10.9 and 139.0 ± 15.8 mmHg for patients with and without ASCR ($P = 0.276$), and for diastolic blood pressure the means were 90.0 ± 7.0 and 85.4 ± 8.5 mmHg for patients with and without ASCR ($P = 0.317$).

Molecular analysis at 12 months revealed that seven samples expressed perforin, 5 of which had histological signs of acute rejection ($P = 0.10$). Granzyme B was expressed in 6 samples, 5 of which were diagnosed as acute rejection ($P < 0.091$). Fas ligand was expressed in five samples, four of which had histological signs of acute rejection ($P = 0.03$). Diagnostic parameters of molecular expression for ASCR and the relative risk at 12 months post-transplantation are shown in Table 2. A statistically significant association was found for isolated expression of Fas ligand. The combined analysis of any of the three genes did not reveal any statistically significant association. Relative risk for the presence of ASCR at 12 months post-transplantation was high (≥ 4.0) for all individual and group analyses of gene expression (Table 2).

Discussion

The identification of inflammatory cells with cytotoxic potential in the presence of tubulitis and/or vasculitis suggests that acute subclinical rejection (ASCR) may be pathogenic and lead to chronic damage to the allograft. Protocol biopsies, also called surveillance biopsies, are used in diagnosing ASCR (10).

The usefulness of protocol biopsies in immunological monitoring of stable transplanted kidneys is controversial, however several studies have demonstrated that about 30% of the renal allografts have unequivocal signs of acute rejection in the first 3 months post-transplantation (11-15), and from 20 to 50% have histologically proven chronic rejection one year after transplantation (2, 13). Serón et al, differently from other authors, detected ASCR in only 4.1% of their patients with protocol biopsies at 8 weeks post-transplantation. This finding may be explained, among other factors, by the immunosuppressive regimen that included induction with antilymphocytic antibodies, and by the fact that their protocol biopsies were obtained earlier than in another studies (16). These data suggest that the intensity of the immunosuppression influences the incidence and magnitude of the mononuclear interstitial infiltrate, as previously observed in studies with regimens that included cyclosporine (17).

In accordance to data reported by Rush et al who found a significant correlation between borderline changes and clinical rejection episodes in subsequent months, in our study patients with a borderline classification were included in the group of patients with subclinical rejection for statistical analysis (18). Also, Saad et al reported that treatment of borderline rejection resulted in

improvement of allograft function in a significant number of patients, and suggested that this histological category represents cases of mild tubulointerstitial rejection (19).

The use of molecular biology techniques for protocol biopsies may increase diagnostic accuracy for acute rejection in kidney transplantation. More sensitive and specific methods, such as PCR, may identify transcripts of cytotoxic genes that indicate the presence of a pathogenic process requiring treatment or a more efficient prophylactic immunosuppression regimen in order to protect the renal allograft (3, 5). Several studies have adopted these techniques; they found cytotoxic gene transcripts when acute rejection was accompanied by allograft dysfunction (7, 20), and also when the allograft had stable function (8, 21).

The intragraft coexpression of messenger RNA of genes that encode perforin, granzyme B and Fas ligand presented a 100% sensitivity and specificity for the diagnosis of acute rejection in one study (7), and there is a direct correlation between this coexpression and the degree of severity of histological rejection defined according to the Banff classification (22). Lipman et al. used the quantitative PCR technique and reported the presence of gene transcripts for perforin, granzyme B and Fas ligand, among others, in stable allograft biopsies with acute subclinical rejection. When compared with normal biopsies and biopsies with borderline infiltrates, the expression of perforin, as well as the expression of T-cell receptor beta-chain, interferon gamma, IL-4 and IL-15, was significantly greater in ASCR (8). Another study used the same technique for kidneys with clinical rejection, and showed that the messenger RNA expression for granzyme B and

Fas ligand had an excellent correlation with acute rejection, demonstrating the involvement of these two cytolytic pathways in allograft rejection (22).

Noninvasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants has also been made by means of molecular methods. Recent studies identified the expression of effector molecules in peripheral blood (23) and in urine cell (24) leukocytes, both correlated with the transcription of the same genes in biopsy specimens of renal allografts with acute rejection. Also the expression observed in fine needle aspiration obtained material correlates well with the one observed in peripheral blood and in needle core biopsies (25). In the study conducted by Li et al. (19), sensitivity and specificity of messenger RNA expression for perforin and granzyme B in urine cells for the diagnosis of acute rejection were 83%, 83%, 79% and 77%, respectively. The identification of the donor's DNA in the urine of kidney transplant recipients has also been described as a noninvasive molecular method useful in the diagnosis of acute rejection (25).

We qualitatively evaluated the presence of transcripts and, consistently with the studies mentioned above, observed that the expression of granzyme B and Fas ligand in 2-month biopsy specimens was predictive of ASCR, and that the expression of Fas ligand remained significantly high in patients with histologically diagnosed ASCR at 12 months. Perforin expression was also frequent, although there was no statistically significant difference. The small number of patients studied may explain this lack of statistical significance. The combined expression of granzyme B and Fas ligand, as well as of any two of the three genes, also showed statistically significant associations at 2 months, while the same analyses

at 12 months did not reveal any statistically significant results. In our study, relative risk for the presence of acute subclinical rejection at 2 and 12 months was high. However, in spite of statistical significance, it should be pointed out that the broad ranges of confidence intervals resulting from the small number of patients might confuse the interpretation of results. These data reinforce the hypothesis that these cytolytic pathways may be one of the effector mechanisms of allograft lesion in acute subclinical rejection.

Similarly to results reported in another study (15) we showed that patients with ASCR at 2 months post-transplantation had serum creatinine concentrations significantly higher than patients without ASCR. The difference of the means of serum creatinine concentrations at 12 months were not statistically significant when compared with the group of patients without acute subclinical rejection, probably because of the small number of patients.

Further studies should be conducted to better characterize ASCR, its mechanisms, relevance and effects on allografts. More sensitive and reproducible quantitative methods, such as real time polymerase chain reaction (26), will probably be useful in monitoring allografts and uncovering rejection mechanisms, which may help individualization of the immunosuppressive therapy.

References

1. Serón D, Díaz-Gallo C, Griño JM et al. Characterization of interstitial infiltrate in early renal allograft biopsies in patients with stable renal function. *Transplant Proc* 1991; 23: 1267.
2. Rush DN, Jeffery J, Gough J. Sequential protocol biopsies in renal transplant patients, Clinical-pathological correlations using the Banff schema. *Transplantation* 1995; 59: 511.
3. Rush DN, Nickerson P, Gough J et al. Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 2129.
4. Rush DN, Karpinski ME, Nickerson P et al. Does subclinical rejection contribute to chronic rejection in renal transplant patients? *Clin Transplant* 1999; 13: 441.
5. Nickerson P, Jeffery J, Gough J et al. Effect of increasing baseline immunosuppression on the prevalence of clinical and subclinical rejection: a pilot study. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1801.
6. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993; 44:411.

7. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M et al. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 695.
8. Lipman ML, Shen Y, Jeffery JR et al. Immune-activation gene expression in clinically stable renal allograft biopsies: molecular evidence for subclinical rejection. *Transplantation* 1998; 66: 1673.
9. Pavlakis M, Lipman M, Strom TB. Intragraft expression of T-cell activation genes in human renal allograft rejection. *Kidney Int* 1996; 53 (suppl.1): 7.
10. Racusen LC, Solez K, Colvin RB et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55: 713.
11. Veronese FV, Centeno AD, Almeida AG et al. Biópsia percutânea do enxerto renal: para onde vamos? *Rev Ass Med Br* 1999; 45: 169.
12. Rush DN, Henry SF, Jeffery JR et al. Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. *Transplantation* 1994; 57: 208.
13. Legendre C, Thervet E, Skhiri H et al. Histological features of chronic allograft nephropathy revealed by protocol biopsies in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1998; 65: 1506.

14. Veronese FV, Gonçalves LF, Edelweiss MI, Manfro RC. Interpretation of surveillance kidney allograft biopsies according to the Banff criteria. *Transplant Proc* 1999; 31:3019.
15. Rush DN, Jeffery JR, Gough J. Sequential protocol biopsies in renal transplant patients: repeated inflammation is associated with impaired graft function at 1 year. *Transplant Proc* 1995; 27: 1017.
16. Séron D, Moresco F, Bover J et al. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 1997; 51: 310.
17. McWhinnie DL, Thompson JF, Taylor HM et al. Morphometric analysis of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labeling in sequential human renal allograft biopsies. *Transplantation* 1986; 42: 352.
18. Rush, DN, Nickerson P, Jeffery JR et al. Protocol biopsies in renal transplantation: research tool or clinically useful? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; 7: 691.
19. Saad R, Gritsch HA, Shapiro R et al. Clinical significance of renal allograft biopsies with “borderline changes”, as defined in the Banff schema. *Transplantation* 1997; 64: 992.
20. Lipman ML, Stevens AC, Strom TB. Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts. *J Immunol* 1994; 152: 5120.

21. Grimm PC, McKenna R, Nickerson P et al. Clinical rejection is distinguished from subclinical rejection by increased infiltration by a population of activated macrophages. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1582.
22. Sharma VK, Bologa RM, Li B et al. Molecular executors of cell death-differential intrarenal expression of Fas ligand, Fas, granzyme B, and perforin during acute and/or chronic rejection of human renal allografts. *Transplantation* 1996; 62: 1860.
23. Vasconcellos LM, Schachter AD, Zheng XX et al. Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation* 1998; 66: 562.
24. Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK et al. Noninvasive diagnosis of renal allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Eng J Med* 2001; 344: 947.
25. Zhang Z, Ohkohchi N, Sakurada M et al. Analysis of urinary donor derived DNA in renal transplant recipients with acute rejection. *Clin Transplant* 2002; 16 (suppl. 8): 45.
26. Sabek O, Dorak MT, Kotb M et al. Quantitative detection of T- cell activation markers by real- time PCR in renal transplant rejection and correlation with histopathologic evaluation. *Transplantation* 2002; 7: 701.

Table 1. Diagnostic parameters and relative risk for acute subclinical rejection at 2 months. Individual and combined expression of perforin, granzyme B and Fas ligand transcripts.

Genes	Expression	Se	Sp	PPV	NPV	Ac	P*	RR (95% CI)
Perforin	15/21	91	50	67	83	71	0.06	4.0 (0.65 - 24.8)
Granzyme B	10/21	81	90	90	81	86	0.002	5.0 (1.40 - 17.6)
Fas ligand	09/21	72	90	88	66	81	0.008	3.6 (1.30 - 9.7)
Perf + GB	15/21	90	50	67	83	86	0.06	4.0 (0.65 - 24.8)
Perf + FasL	15/21	90	50	67	83	86	0.06	4.0 (0.65 - 24.8)
GB + FasL	11/21	82	80	82	80	81	0.009	4.1 (1.20 - 14.6)
One of three	15/21	90	50	67	83	71	0.06	4.0 (0.65 - 24.8)
Two of three	11/21	82	80	82	80	81	0.009	4.1 (1.20 - 14.6)

Se = sensitivity; Sp = specificity; PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value; Ac = accuracy; RR = relative risk; CI = confidence interval.* Fisher's exact test.

Table 2. Diagnostic parameters and relative risk for acute subclinical rejection at 12 months. Individual and combined expression of different genes.

Genes	Expression	Se	Sp	PPV	NPV	Ac	P*	RR (95% CI)
Perforin	07/14	83	75	71	86	79	0.10	5.0 (0.77 - 32.5)
Granzyme B	06/14	80	77	66	87	79	0.091	5.3 (0.78 - 36.3)
Fas ligand	05/14	80	88	80	88	86	0.03	7.2 (1.08 - 48.1)
One of the three	07/14	80	67	57	57	71	0.266	4.0 (0.58 - 27.4)

Se = sensitivity; Sp = specificity; PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value; Ac = accuracy; RR = relative risk; CI = confidence interval.*

Fisher's exact test.

Figure legend

Figure 1: Representative examples of GAPDH, perforin, granzyme B and Fas ligand transcripts expression in 2-month protocol biopsy specimens collected from kidney transplant recipients with and without acute subclinical rejection. *1 Rasc = subclinical acute rejection; GAPDH = glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; Per = Perforin; FasL = Fas Ligand; GB = Granzyme B; bp

FIGURE 1

