

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA  
DOUTORADO

EFEITO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD3 NO INFILTRADO  
INFLAMATÓRIO INTRA-ENXERTO EM TRANSPLANTADOS RENAIIS

AUTOR: DR. LUIZ FELIPE SANTOS GONÇALVES

ORIENTADOR: PROF. DR. JAIME KOPSTEIN

PORTO ALEGRE, 1994

Para meus pais Ademar e Aurora e  
a meus filhos Alice, Eduardo e Fernando

## **AGRADECIMENTOS**

Dr. Alfredo Zannier, responsável pelo Laboratório de Citologia Aspirativa de Transplantes do Hospital Edouard Herriot, Lyon, França, pelos ensinamentos e treinamento na realização e interpretação da Punção Aspirativa Renal

Prof. Dr. Jaime Kopstein, orientador

Dr. Roberto Manfro, pelo auxílio na coleta de dados e na revisão crítica do texto

Sra. Adriane Ricacheski, pela revisão do texto

Sr. Marco Rauber, pelo auxílio no processamento das Punções Aspirativas Renais

Sra. Mireille Mutin, pelo treinamento no processamento das Punções Aspirativas Renais

Sra. Norma Martinez, pela revisão das análises estatísticas

Equipe de Transplante Renal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Professores e Médicos Residentes do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Grupo de Apoio à Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

## SUMARIO

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

1. Introdução .....	1
1.1. A Resposta Imune ao Aloenxerto .....	2
1.2. Imunossupressão .....	10
1.3. Anticorpos Monoclonais.....	17
1.3.1. Anticorpos Anti-CD3.....	18
1.3.1.1. Mecanismo de Ação.....	19
1.3.1.2. Uso clínico .....	22
1.3.1.3. Monitorização e Complicações.....	27
1.3.2. Outros Anticorpos Monoclonais.....	30
1.4. A Punção Aspirativa Renal.....	33
1.5. Objetivos.....	37
2. Pacientes, Materiais e Métodos .....	38
2.1. Pacientes .....	38
2.2. Materiais e Métodos .....	42
2.2.1. Punção Aspirativa Renal .....	42
2.2.1.1. PAR - Material Utilizado .....	42
2.2.1.2. PAR - Técnica .....	42
2.2.1.3. Processamento do Material .....	42
2.2.1.4. Avaliação da Adequação, Leitura e Interpretação .	44
2.3. Análises Estatísticas .....	47
2.3.1. Banco de Dados .....	47
2.3.2. Testes Estatísticos .....	47
3. Resultados .....	50
3.1. Características da Amostra .....	50
3.2. Número de Punções Aspirativas Renais (PAR), Representatividade e Variação .....	54
3.3. Avaliação do Infiltrado Inflamatório Intra- Enxerto .....	55
3.3.1. PAR e Imunoativação .....	56
3.3.2. Incremento Corrigido Total .....	60
3.3.3. Expressão de Antígenos CD3 nos Linfócitos .....	64
4. Discussão .....	69

4.1. Características da Amostra .....	70
4.2. Número de PAR, Representatividade e Variação .....	71
4.3. Avaliação do Infiltrado Inflamatório Intra- Enxerto .....	72
4.3.1. PAR e Imunoativação .....	74
4.3.2. Incremento Corrigido Total .....	77
4.3.3. Expressão de Antígenos CD3 nos Linfócitos .....	79
4.4. Significado do Infiltrado Inflamatório Intra- Enxerto .....	83
4.5. Mecanismo de Ação do Anticorpo Monoclonal OKT3 .....	89
4.5.1. Depleção de Linfócitos .....	90
4.5.2. Bloqueio do Complexo CD3 .....	94
4.5.3. Imunomodulação do Complexo CD3 .....	95
4.5.4. Outros Mecanismos de Ação .....	98
5. Conclusões .....	102
6. Summary.....	103
7. Resumo .....	105
8. Anexos .....	107
8.1. Anexo 1. Protocolos de Imunossupressão .....	107
8.2. Anexo 2. Processamento do Aspirado Renal e de Sangue Periférico. Avaliação Citológica .....	112
8.3. Anexo 3. Processamento do Aspirado Renal e de Sangue Periférico. Imunoperoxidase .....	113
8.4. Anexo 4. Punção Aspirativa Renal. Exemplo do Protocolo de Interpretação da Análise Citológica .....	115
8.5. Anexo 5. Protocolo de Leitura das Imunoperoxidasas..	116
8.6. Anexo 6. Banco de Dados. Características dos Pacientes .....	117
8.7. Anexo 7. Banco de Dados. Parâmetros das PAR .....	118
9. Referências Bibliográficas .....	119

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> OKT3 no Tratamento Inicial de Rejeição Aguda....	23
<b>Tabela 2.</b> OKT3 como Terapia de Resgate.....	25
<b>Tabela 3.</b> Estudos de Avaliação de OKT3 Profilático.....	26
<b>Tabela 4.</b> Experiências Clínicas com Outros Anticorpos Monoclonais.....	31
<b>Tabela 5.</b> Dados Demográficos e Gerais dos Pacientes nos Grupos OKT3 Profilático e Controle.....	51
<b>Tabela 6.</b> Dados Demográficos e Gerais dos Pacientes no Grupo OKT3 Terapêutico.....	52
<b>Tabela 7.</b> Resultados em um Ano de Acompanhamento.....	53
<b>Tabela 8.</b> Número de PAR e Representatividade por Grupo....	54
<b>Tabela 9.</b> Imunoativação nas PAR.....	56
<b>Tabela 10.</b> Imunoativação nos Grupos OKT3 Profilático e Controle.....	57
<b>Tabela 11.</b> Imunoativação Durante e Pós-OKT3 Profilático...	58
<b>Tabela 12.</b> Imunoativação Pré, Durante e Pós-OKT3 Terapêutico.....	59
<b>Tabela 13.</b> Incremento Corrigido Total. Medianas, Valores Máximos e Mínimos.....	60
<b>Tabela 14.</b> Incremento Corrigido Total nos Grupos OKT3 Profilático e Controle.....	61
<b>Tabela 15.</b> Incremento Corrigido Total Durante e Após OKT3 Profilático.....	62
<b>Tabela 16.</b> Incremento Corrigido Total Pré, Durante e Pós-OKT3 Terapêutico.....	63
<b>Tabela 17.</b> Porcentagens de Linfócitos CD3+ no Sangue e no Enxerto.....	64
<b>Tabela 18.</b> Evolução das Porcentagens de Linfócitos CD3+ Intra-enxerto nos Grupos OKT3 Profilático e Controle.....	65

**Tabela 19.** Evolução das Porcentagens de Linfócitos CD3+ do Sangue nos Grupos OKT3 Profilático e Controle ....66

**Tabela 20.** Porcentagens de Linfócitos CD3+ Durante e Após OKT3 Profilático.....66

**Tabela 21.** Porcentagens de Linfócitos CD3+ no Grupo OKT3 Terapêutico.....67

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADCC:** Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos  
**AEC:** Acido 3-amino, 9-etilcarbazol  
**AM:** Anticorpo Monoclonal  
**ANOVA:** Análise de Variância  
**CD:** "Cluster of Differentiation"  
**CPH:** Complexo Principal de Histocompatibilidade  
**CyA:** Ciclosporina A  
**DNA:** Acido Desoxiribonucleico  
**DTPA:** Acido Demetilpenta-acético  
**ELAM-1:** Molécula de Adesão Endotélio-Leucócito-1  
**GAL:** Globulina Anti-Linfocítica  
**GAT:** Globulina Anti-Timocítica  
**HLA:** Antígeno Leucocitário Humano  
**IA:** Imunoativação  
**ICAM-1:** Molécula de Adesão Intercelular 1  
**ICT:** Incremento Corrigido Total  
**IL:** Interleucina  
**LFA:** Antígeno Associado à Função do Linfócito  
**MGG:** May-Grünwald-Giemsa  
**MW:** Mann-Whitney  
**NaN<sub>3</sub>:** Azida Sódica  
**NTA:** Necrose Tubular Aguda  
**OKT3<sup>R</sup>:** Anticorpo Monoclonal Anti-CD3  
**OKT3p:** Grupo OKT3 Profilático  
**OKT3t:** Grupo OKT3 Terapêutico  
**PAR:** Punção Aspirativa Renal  
**RcT:** Receptor da Célula T  
**RNA:** Acido Ribonucleico  
**RPMI:** "Roswell Park Memorial Institute" (meio de cultura)  
**Th1:** Linfócitos Auxiliares Tipo 1  
**Th2:** Linfócitos Auxiliares Tipo 2  
**VCAM:** Molécula de Adesão da Célula Vascular



## 1. INTRODUÇÃO

O transplante renal representa atualmente a melhor opção terapêutica e de reabilitação para o paciente com insuficiência renal crônica terminal **138,167,198,235,237**. Sobrevidas em um ano, de órgãos e de pacientes, superiores a 80% e 90%, respectivamente, têm sido obtidas com doadores cadavéricos em vários centros de transplantes **92,224**. A excelência destes resultados correlaciona-se diretamente a alguns fatores, como o aprimoramento das técnicas de microlinfotoxicidade para a prova cruzada; o emprego de antibióticos profiláticos eficientes e os avanços na compreensão dos fenômenos imunobiológicos envolvidos no processo de rejeição e conseqüentes repercussões nos esquemas terapêuticos **32,63,147,227,236,184**.

A imunossupressão visa bloquear a resposta imune aos antígenos do enxerto, procurando preservar, idealmente, os demais aspectos da imunidade. Como a imunidade mediada por linfócitos T é reconhecida como o principal mecanismo na rejeição, procura-se desenvolver métodos que deprimam mais seletivamente este tipo de resposta imune. As preparações policlonais (globulinas antilinfocítica ou antitimocítica) vêm sendo utilizadas na profilaxia da rejeição desde a década de 60, com resultados controversos quanto à sua eficácia em aumentar a longo prazo a sobrevida do enxerto. No entanto, a partir de 1980, seu valor foi comprovado no

tratamento de rejeição aguda, reestabelecendo o interesse por esta modalidade terapêutica <sup>51</sup>. O advento da tecnologia de produção de hibridomas <sup>136</sup> viabilizou o desenvolvimento de anticorpos monoclonais direcionados contra subpopulações linfocitárias, proporcionando uma imunossupressão mais específica. As bases celulares e moleculares da imunologia da rejeição, que serão discutidos a seguir, são muito importantes para a compreensão do mecanismo de ação dos imunossupressores e este entendimento é fundamental para o desenvolvimento e a utilização clínica destas drogas.

### **1.1. A Resposta Imune ao Aloenxerto**

A resposta imune ao aloenxerto é efetivada por diversos tipos de leucócitos, incluindo macrófagos, células T citotóxicas (CD8<sup>+</sup>) e auxiliares (CD4<sup>+</sup>) e plasmócitos. Estas células se envolvem em uma cascata de eventos, na qual mediadores solúveis (interleucinas) desempenham importante papel, que culminará na expansão clonal de células efetoras e anticorpos com atividade citotóxica, que terminam por destruir o enxerto quando a reação não é modificada por drogas imunossupressoras.

O tecido transplantado representa uma importante carga antigênica. No início da resposta imune, parte destes antígenos é captada e processada pelas células apresentadoras do antígeno - monócitos, macrófagos ou

células dendríticas - que, por sua vez, apresentam o antígeno do doador na forma de pequenos peptídios em sua superfície, mais especificamente na fenda dos antígenos classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH), às células auxiliares ( $CD4^+$ ) do receptor. Moléculas  $CD4$  ou  $CD8$  na superfície dos linfócitos T estão próximas às moléculas de receptores da célula T (RcT) que, por sua vez, encontram-se associadas não covalentemente à molécula  $CD3$ , encarregada da transmissão do sinal de ativação para o citosol da célula T. O RcT é um dímero constituído por duas cadeias não-idênticas alfa/beta, ou mais raramente gama/delta, que à semelhança das moléculas de anticorpo, apresentam um segmento variável e um segmento constante. No segmento variável são encontradas pelo menos três regiões de hipervariabilidade, também denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDR1, CDR2 e CDR3), onde ocorrem as interações entre o RcT e os complexos antígeno-porção variável da molécula do CPH. As CDR1 e CDR2 da cadeia alfa do RcT ligam-se aos domínios alfa1 das moléculas de classe I e II do CPH, enquanto estas mesmas regiões da cadeia beta do RcT ligam-se aos domínios alfa2 ou beta1, respectivamente, das moléculas de classe I ou II do CPH **122**. A região central do RcT, formada pelas duas CDR3, interage com o peptídeo apresentado na fenda das moléculas do CPH. O complexo  $CD3$  é constituído por dois complexos autônomos de transdução **244**. Um é formado pelas cadeias gama, delta e epsilon, e o outro por duas cadeias zetas. O contato das moléculas  $CD4$  se dá

com as porções não polimórficas (alfa 2 e beta 2) da molécula classe II e o contato das moléculas CD8 se dá com a porção não polimórfica (alfa 3) da molécula classe I. A ativação celular resulta do acoplamento de RCT - peptídeo+ moléculas do CPH - CD4 ou CD8, mediante a ativação de enzimas tirosina quinases que fosforilam resíduos tirosina presentes na cadeia zeta do complexo CD3 e outras moléculas chaves de transdução. Os linfócitos CD4<sup>+</sup> exercem um papel fundamental na ativação da cascata imune e são subdivididos em duas subpopulações que são os linfócitos T auxiliares 1 (Th1), produtores de interleucina-2 (IL-2), fator de necrose tumoral-beta, linfotoxina e interferon-gama, responsáveis pelo componente celular da reação e que parecem ser ativados pela IL-12 <sup>213</sup> e os linfócitos T auxiliares 2 (Th2), produtores de interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10), que são responsáveis pelo componente humoral e possivelmente pela supressão da via regida pelos Th1, através da ação supressora da IL-10, sendo, por sua vez, aparentemente ativados pela própria IL-4 <sup>75,81,166,168</sup>. Adicionalmente, pelo menos 3 famílias de moléculas, chamadas de moléculas de adesão, participam na localização das células no sistema linfóide e nos sítios de inflamação. A superfamília das Imunoglobulinas inclui ICAM-1 a ICAM-3, LFA-2, LFA-3, VCAM-1, B7 e CD28 que ligam-se respectivamente com LFA-1, LFA-3, LFA-2, VLA-4, CD28 e B7. Elas são encontradas em várias células (monócitos, linfócitos, células endoteliais,

macrófagos, polimorfonucleares) e a sua expressão tende a ser aumentada por citocinas pró-inflamatórias, como interferon gama, fator de necrose tumoral alfa e interleucina-1. A família das Integrinas é constituída por heterodímeros alfa/beta e dividida em 3 subfamílias conforme a subunidade beta presente (beta-1, beta-2 ou beta-3). Fazem parte as moléculas como VLA-1 a VLA-6, LFA-1 e MAC-1, cuja importância reside na regulação dinâmica da adesão e migração; e a família das Selectinas, cujos membros caracterizam-se pela presença de domínios lectinas N-terminais. As lectinas são proteínas que ligam-se a açúcares específicos. São expressas em leucócitos e células endoteliais e estão envolvidas na interação inicial entre leucócitos e células endoteliais <sup>98</sup>. Estas moléculas de adesão participam não somente como elementos de localização e aproximação entre as células, mas também com função de sinalização na resposta imune.

Denomina-se restrição ao CPH ao fenômeno da necessidade de apresentação do antígeno em conjunto com estruturas do CPH reconhecidas como "próprias" pelo RcT. Assim sendo, o antígeno é o primeiro sinal externo necessário à ativação das células T. Uma série de complexos eventos intracelulares ocorre a partir da interação do antígeno com o receptor da célula T, invariavelmente associado ao complexo CD3. Este exhibe na porção intracitosplasmática vários sítios de fosforilação, que são ativados pelas vias de proteína-quinase C e outras proteína-quinases dependentes de cálcio e

de calmodulina. O acoplamento de outros ligantes, por exemplo LFA-1/ICAM-1 e B7/CD28, também levam a importantes sinais co-estimulatórios de ativação **149,214**. A coordenação destes vários sinais é pouco conhecida, mas é claramente crítica para a montagem da resposta de ativação celular. O resultado final destas vias citosólicas é a ativação de uma variedade de gens responsáveis pela produção de diversas citocinas e seus receptores. Um segundo tipo de sinal deriva da estimulação das células T auxiliares pela interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), produzidas pelas células apresentadoras do antígeno após o contato com o mesmo. Possivelmente este segundo sinal não esteja associado somente com IL-1 e IL-6, mas também ocorra a participação de outras moléculas e seus ligantes como ICAM-1/LFA-1, CD2/LFA-3 e CD28/B7. Assim, o segundo sinal seria uma "conversação" entre a célula T e a célula apresentadora de antígeno, via citocinas e moléculas de adesão em uma cascata recíproca de sinalização, que resultaria na ativação de clones específicos de linfócitos CD4+ com alta afinidade para aloantígenos de classe II **98**. Estes dois fenômenos têm um papel central nos eventos da ativação das células T. Após a estimulação pelo antígeno e por estas citocinas e moléculas de adesão, as células T auxiliares produzem IL-2, um potente fator de crescimento dos linfócitos T, e expressam o receptor para a IL-2 em sua superfície. A interação da IL-2 com seu receptor, por mecanismos autócrinos e parácrinos, estimula a divisão celular e conseqüente expansão clonal das

células auxiliares e citotóxicas. Além disso, a IL-2 é um estímulo adicional às células T, ativadas pelo antígeno, a produzir algumas linfocinas que desempenham um papel importante na rejeição. Também ocorre produção de interleucina 3 (IL-3). Essa linfocina estimula a proliferação de células precursoras que se diferenciam em granulócitos e macrófagos. O interferon-gama, cuja síntese também é estimulada pela IL-2, aumenta a expressão de antígenos classe I, classe II e ICAM-1 nas células indúzeis, aumentando a imunogenicidade dos antígenos dos enxertos, tornando-os mais vulneráveis aos linfócitos T citotóxicos. Adicionalmente, a IL-2 ativa a função citodestrutiva dos macrófagos **21,22,99**. Após a ativação de linfócitos T auxiliares por IL-2, ocorre a síntese de fatores de crescimento e diferenciação (IL-4, IL-5 e IL-6) que induzem à expansão clonal das células B estimuladas pelo antígeno, levando à produção de anticorpos específicos com eventual atividade citotóxica contra as células do enxerto. Ocorridos estes eventos iniciais de ativação, as células T citotóxicas proliferam sob a influência de IL-2 e sob a ação de interferon gama, IL-4 e IL-6 assumem a função citotóxica **8,55,65,140,209,213**. Os linfócitos citotóxicos diferenciados, ao entrarem em contato com as células do enxerto, reconhecerão via R<sub>CT</sub> os antígenos expressos na superfície daquelas, associados aos antígenos de classe I do CPH em um processo de reconhecimento do qual participam CD8, LFA-1 e CD2, semelhante ao que ocorreu na estimulação

primária **95,228**. Este reconhecimento leva à ativação do linfócito T citotóxico via CD3, e essa célula desfecha o seu ataque às células alvo (no caso as células do enxerto).

O infiltrado celular na rejeição aguda ao aloenxerto é composto principalmente por linfócitos T  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  e macrófagos. No entanto, nem todos os linfócitos citotóxicos que infiltram os enxertos são dirigidos aos aloantígenos deste enxerto, o que confirma a existência de um componente inespecífico nesse infiltrado **211**. Em modelos experimentais e clínicos, de rejeição primária, fica claramente estabelecida a importância das células  $CD4^+$  na rejeição dos enxertos. Essas células podem sozinhas mediar rejeição aguda, o que não é possível para os linfócitos  $CD8^+$ . A resposta dos linfócitos  $CD8^+$  aos aloantígenos, sem o auxílio dos linfócitos  $CD4^+$ , é bastante limitada, o que sugere que a via  $CD4^+$ -dependente seja predominante **72,124,155,251**. Nas rejeições secundárias, ou seja, naquelas em que já houve exposição prévia ao antígeno, ocorre uma produção muito mais rápida de linfócitos citotóxicos  $CD8^+$  e estes podem ser gerados sem o auxílio dos linfócitos  $CD4^+$  **3,156,157**. Estudos recentes mostraram que as células T fenotipicamente caracterizadas como de memória podem passar do sangue aos tecidos, enquanto que as células T, que não apresentam este fenótipo (células T "naive") têm que passar pelos linfonodos. Em termos de início da resposta imune aos aloenxertos isto significa que na rejeição primária o aloantígeno deve inicialmente chegar ao sistema linfóide,



enquanto que a rejeição secundária pode, mais rapidamente, ocorrer in situ **225**.

O mecanismo final de destruição celular é mediado pela liberação dos grânulos que contém uma proteína monomérica formadora de poros, denominada perforina, e por uma serina esterase, denominada granzima. Na presença de cálcio, ocorre polimerização enzimática da perforina, formando múltiplos poros na membrana da célula alvo. Interessantemente, a via da perforina parece formar-se apenas na presença de elevadas concentrações de IL-2. De maneira alternativa, uma via independente de cálcio e perforina tem sido observada e parece efetuar-se através de enzimas liberadas por células citotóxicas. Além disso, grânulos liberados por células citotóxicas contendo fator de necrose tumoral-alfa e interferon-gama ativam receptores na célula alvo, modulando a sua síntese proteica e causando dano citotóxico à parede celular. Os mecanismos acima citados expõem o meio intracelular ao conteúdo extra-celular, resultando em citólise **14,93,94,171**. Alternativamente, linfoxinas secretadas ativam enzimas nas células alvo que fragmentam o DNA nuclear e o núcleo.

O papel dos anticorpos na rejeição aguda não é bem entendido **245**. Algumas alterações histopatológicas encontradas na rejeição aguda são, em geral, atribuídas à ação de anticorpos sobre o endotélio. Entre estas estão a trombose arteriolar, hemorragia intersticial e a necrose fibrinóide **7,55**. No entanto, a presença de anticorpos

específicos e inespecíficos não guarda uma correlação direta com rejeição aguda ou disfunção do enxerto <sup>229</sup>. Os anticorpos também podem causar dano tecidual, servindo de ponte para a ação de células citotóxicas na chamada citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). Neste modelo, o anticorpo se liga à célula alvo, e as células K a ele se ligam através do receptor para a porção Fc do anticorpo presente na superfície das mesmas. Esta ligação resulta em ativação do mecanismo lítico das células K, produzindo dano tecidual <sup>226</sup>. O bloqueio, através de anticorpos monoclonais anti-CD4, do auxílio das células CD4<sup>+</sup>, têm levado à diminuição das rejeições humorais, mediadas por anticorpos, e a estado de tolerância em modelos experimentais <sup>39</sup>.

Esta cascata de ativação com destruição celular torna-se um ciclo vicioso, a menos que modificada por drogas imunossupressoras potentes em tempo hábil ou que surjam mecanismos supressores capazes de diminuir ou impedir a atividade citotóxica <sup>69,95</sup>.

## 1.2. Imunossupressão

A imunossupressão em transplantes de órgãos visa essencialmente à produção de tolerância específica e indefinida do receptor ao enxerto implantado. Embora atualmente este objetivo ainda esteja distante, uma

variedade de maneiras de manipular o sistema imunológico para a aceitação prolongada de aloenxertos tem sido utilizada, desde o início da transplantação clínica, há mais de 3 décadas. Estas manipulações incluem: a) o uso das chamadas drogas convencionais, como os esteróides e a 6-Mercaptopurina, posteriormente substituída por seu derivado imidazólico a Azatioprina; b) transfusões de sangue ou de derivados; c) drogas alternativas como a Ciclofosfamida; d) Ciclosporina A desde o final da década de 70; e) preparações anti-linfocitárias policlonais como a globulina anti-linfocitária (GAL) e a globulina anti-timocitária (GAT). Mais recentemente dispõe-se de anticorpos monoclonais dirigidos a antígenos de superfície, presentes em células envolvidas na reação de rejeição aos órgãos transplantados; f) transfusão de células de medula óssea do doador em receptores de órgãos vascularizados como rim e fígado <sup>11</sup>; g) irradiação linfóide total <sup>172</sup>; e h) drogas atualmente consideradas como experimentais, algumas já em uso clínico restrito, como o FK- 506, Rapamicina e a 15-Deoxipergualina <sup>203,130</sup>. O uso adequado destes métodos, acompanhado de uma boa compatibilidade no sistema HLA entre doador e receptor e um melhor entendimento da resposta imunológica, permitindo a sua manipulação de uma maneira mais racional, tem levado a excelentes sobrevidas, a curto prazo, de pacientes e enxertos em diversos centros de transplante <sup>92,184</sup>. Atualmente, três drogas "convencionais" são aceitas e utilizadas em diferentes associações como imunossupressores

no transplante renal: corticoesteróides, azatioprina e ciclosporina A.

Através de diferentes mecanismos, os corticoesteróides, a azatioprina e a ciclosporina A bloqueiam a proliferação das células T. Os corticoesteróides utilizados são a prednisona e a metilprednisolona e são empregados tanto na profilaxia, como no tratamento da rejeição aos enxertos. Seus mecanismos de ação não estão claramente estabelecidos; no entanto, parecem dever-se às suas propriedades imunossupressoras e à atividade antiinflamatória, esta mais evidente quando doses elevadas são utilizadas. As ações antiinflamatórias descritas são a estabilização da parede vascular, com diminuição do extravazamento plasmático, diminuição na liberação de enzimas dos lisossomos e na resposta dos neutrófilos e monócitos aos estímulos quimiotáticos. As ações imunossupressoras incluem: (a) produção de linfopenia, possivelmente por seqüestração, que é mais importante para os linfócitos T auxiliares do que para os supressores; (b) produção de monocitopenia e eosinopenia, também por sequestração; (c) interferência com o reconhecimento e processamento do antígeno; (d) redução na ligação dos anticorpos às células alogênicas; (e) e principalmente bloqueio da transcrição e da secreção de IL-1, IL-6 e de fator de necrose tumoral pelas células apresentadoras do antígeno. Estas monocinas são essenciais para a ativação da cascata imune. Sem níveis adequados de IL-1, a ativação do linfócito CD4 é ineficiente e a resposta

imune é fraca. Em nível intracelular, os esteróides exercem seus efeitos ao interagirem com receptores citosólicos e interferirem com a síntese de proteínas **67,64,233**. A ciclosporina A, a exemplo dos esteróides, pode ser usada tanto na profilaxia como no tratamento das rejeições celulares agudas. Os mecanismos celulares responsáveis por seu efeito imunossupressor são: (a) inibição da ativação dos linfócitos T auxiliares e citotóxicos, permitindo a ativação dos supressores **115,143**; (b) inibição da função de apresentação do antígeno pelas células apresentadoras de antígeno **187,80,15**; (c) diminuição na produção de IL-1 **114**; (d) inibição na produção de anticorpos por determinadas subpopulações de linfócitos B **182**; (e) e inibição na produção de IL-2 e outras linfocinas, como o interferon gama, IL-4, fator de diferenciação das células citotóxicas e fator de diferenciação das células B, entre outras **116,19**. Dentre todos os mecanismos citados, a capacidade de inibir a produção de IL-2 é o mecanismo mais importante pelo qual a ciclosporina exerce o seu efeito imunossupressor. Este efeito ocorre através da inibição da transcrição do RNA mensageiro da IL-2 **70,152,131**. Os mecanismos moleculares de ação da ciclosporina ainda não foram completamente elucidados; no entanto, o mecanismo subcelular mais aceito atualmente é a inibição produzida em uma enzima citoplasmática denominada ciclofilina ou peptidil-prolil cis-trans isomerase, responsável pelo "dobramento" das proteínas citoplasmáticas que funcionam como fatores de

ativação de transcrição e que normalmente expõe os domínios de ligação do DNA . Desta maneira, a ciclosporina A bloquearia a indução das proteínas necessárias à regulação positiva da transcrição dos genes das linfocinas **100,216**. A azatioprina é empregada exclusivamente na profilaxia da rejeição. Produz diminuição da proliferação de células T citotóxicas, auxiliares e de linfócitos B formadores de anticorpos citotóxicos. A Azatioprina é efetiva em estágios precoces da expansão clonal de células já ativadas. Seus metabólitos, 6-mercaptopurina e ácido tioinosínico, incorporam-se ao DNA celular inibindo a síntese e o metabolismo dos nucleotídeos da purina e alterando a formação e a função do RNA **67,241,212**.

Os anticorpos policlonais são produzidos em espécies heterólogas (geralmente coelho ou cavalo) contra linfócitos ou timócitos humanos. Podem se apresentar sob a forma de soro ou de imunoglobulinas purificadas. O exato mecanismo de ação é complexo e desconhecido. Linfopenia imediata e profunda usualmente ocorre após a administração endovenosa **165**, provavelmente ocasionada pela interação do anticorpo antilinfocítico com múltiplos epítopos na superfície da membrana dos linfócitos e conseqüente lise, mediada por complemento ou opsonização e destruição pelo sistema monocítico-macrofágico. Estudos experimentais têm demonstrado que, após a administração de anticorpos antilinfocíticos em camundongos **150** e em macacos **222**, o número de linfócitos T aumenta gradualmente enquanto a

resposta proliferativa permanece comprometida. Considerando estas observações, sugeriu-se que o bloqueio da imunidade celular contra o enxerto resulta inicialmente da destruição de linfócitos T pelas preparações policlonais e que uma imunossupressão mais prolongada seria mantida pela inibição da resposta proliferativa através de células supressoras inespecíficas <sup>50</sup>. Outro aspecto a considerar é a composição dos anticorpos policlonais que, provavelmente, contém anticorpos contra todos os tipos de linfócitos e macrófagos. Assim, estas preparações atuariam em vários elementos celulares envolvidos na resposta imune contra o enxerto <sup>140</sup>. Bonneville e col. <sup>24</sup>, em estudo no qual descrevem o desenvolvimento de uma preparação policlonal contra um clone alorreativo humano CD4+, sugerem que a modulação de diversas moléculas na superfície dos linfócitos T poderia contribuir no efeito imunossupressor. Apesar disso, estes potentes imunossupressores têm a sua aplicação clínica limitada por dois fatores. O primeiro problema é a dificuldade em obter preparações padronizadas e reproduzíveis, que possam estabelecer a sua eficácia. Isto ocorre devido a características de variabilidade de antígenos empregados na imunização (ex. timócitos, linfócitos obtidos por drenagem de ducto torácico, do baço ou de culturas de células), de classe e afinidade de anticorpos produzidos e de diferenças entre lotes. O outro problema é a dificuldade em utilizar doses mais elevadas devido à presença de anticorpos contaminantes, especialmente contra hemácias e plaquetas.

As três drogas convencionais (prednisona, azatioprina e ciclosporina A) são amplamente utilizadas de forma associada em receptores de rins cadavéricos e de doadores vivos relacionados (esquema tríplice). A estratégia empregada é utilizá-las em doses maiores nos primeiros três meses com reduções subsequentes de acordo com a evolução, buscando as menores doses possíveis ou a retirada de uma ou duas das drogas a longo prazo. Os anticorpos antilinfocíticos são utilizados principalmente no tratamento de rejeição aguda **174,210** ou em alguns esquemas profiláticos em que são empregados nas duas primeiras semanas pós-transplante, associados à prednisona e à azatioprina com posterior introdução da ciclosporina quando da sua retirada, com dois dias de superposição (esquema quádruplo seqüencial) **164**. Foi demonstrado in vitro que o efeito aditivo da combinação de drogas em doses baixas produz maior inibição da resposta a aloantígenos e mitógenos do que doses até mesmo tóxicas isoladamente **153**. Entretanto, estas vantagens potenciais demonstradas em laboratório não são sempre corroboradas pelos estudos clínicos **193,25**. Além dos efeitos colaterais próprios de cada droga, a imunossupressão adiciona riscos aumentados de infecção e neoplasias. Acima de 80% dos pacientes transplantados têm, no mínimo, um episódio de infecção pós-transplante e 40% dos óbitos estão relacionados com infecções **231**. O desenvolvimento de neoplasias pós-transplante ocorre em freqüências que variam de 1% a 16%, particularmente carcinomas de pele, linfomas, sarcoma de



Kaposi, carcinomas de colo uterino e carcinomas de vulva e períneo **192**. O uso combinado destas drogas oferece uma estratégia terapêutica racional para a imunossupressão na situação clínica do transplante de órgãos. Mas, apesar do elevado sucesso a curto prazo, a taxa exponencial de perda de enxertos nos pacientes com má compatibilidade no sistema HLA não tem mudado nas duas últimas décadas **218,144**. Portanto, métodos alternativos que levem a uma imunossupressão mais específica ou que induzam um estado de tolerância com pouca ou nenhuma imunossupressão permanecem um alvo a ser atingido.

### **1.3. Anticorpos Monoclonais**

O anticorpo monoclonal (AM) é uma imunoglobulina produzida por uma célula individual secretora de anticorpos específicos para um determinante antigênico. Sua produção foi viabilizada a partir do trabalho de Kohler e Milstein **136**, que desenvolveram um método de fundir células de mieloma com linfócitos de camundongos imunizados para um antígeno específico. Os hibridomas resultantes mantêm as características de secretar anticorpos do linfócito e a imortalidade das células de mieloma, podendo ser mantidos em cultura. Sua primeira aplicação prática foi na área de imunopatologia, com as técnicas de imunofluorescência e imunoperoxidase, que permitiram classificar e descrever

espécimes fenotipicamente e não simplesmente sob aspectos citoestruturais, com repercussões importantes no diagnóstico e caracterização de doenças neoplásicas e infecciosas <sup>10</sup>. A utilização de AM em transplantes de órgãos segue o mesmo raciocínio do uso de anticorpos antilinfocíticos policlonais. Porém, diferentes destes, os AM apresentam as seguintes vantagens: reatividade específica contra a molécula ou célula alvo, menor variabilidade entre diferentes lotes do mesmo produto, suprimento ilimitado e, menor dose de proteína estranha administrada. Apesar dos diversos AM experimentados nos últimos 10 anos como agentes imunossupressores em transplantes de órgãos, o único que é disponível comercialmente e aprovado para uso clínico é o anticorpo anti-CD3, OKT3<sup>R</sup>.

### **1.3.1. Anticorpo Monoclonal Anti-CD3**

Em 1979 Kung e col <sup>141</sup> descreveram os primeiros anticorpos monoclonais desenvolvidos contra antígenos de superfície das células T. Uma série destes anticorpos foi desenvolvida, permitindo a definição de subpopulações linfocitárias e a elucidação da estrutura e função do receptor de células T. O AM anti-CD3 OKT3 é uma imunoglobulina IgG2a, composta por uma cadeia pesada de 50kD e outra leve de 25kD, direcionada contra o complexo CD3 da superfície dos linfócitos T. Sua purificação através de

métodos rígidos e testes rigorosos com técnicas sensíveis, como o sulfato dodecil sódico/gel de poliacrilamida, focalização isoeétrica, imunoeletroforese, imunodifusão e imunofluorescência, resulta em um produto homogêneo, cujo grau de pureza (>95%) aproxima-se daquele encontrado nas drogas convencionais, sendo livre de pirógenos e materiais estranhos <sup>83</sup>. O complexo CD3 contém pelo menos 5 cadeias peptídicas e está ligado não-covalentemente ao receptor de células T (RcT). Quando ocorre o acoplamento do antígeno ao RcT, os sinais de ativação provavelmente são mediados pelo complexo CD3 <sup>136</sup>. O OKT3 reconhece e liga-se à cadeia epsilon de 20kD do complexo CD3, bloqueando a sua função e atuando indiretamente como um anti-RcT, interferindo com a função imunológica dos linfócitos T. Inicialmente, acreditava-se que o uso experimental do OKT3 nos transplantes resultaria em mais informações sobre os anticorpos monoclonais e que seus efeitos terapêuticos adicionariam conhecimentos sobre a função das células T. Porém, os resultados preliminares excederam todas as expectativas, levando rapidamente à sua aprovação para uso clínico.

#### **1.3.1.1. Mecanismo de Ação**

Estudos in vitro demonstraram que o OKT3 bloqueia as fases de indução e efetora da linfólise mediada por células,

inibe as respostas proliferativas dos linfócitos T contra antígenos de classe I e II e pode ser mitogênico para as células T <sup>230</sup>. Minutos após a administração de OKT3 em receptores de aloenxertos ocorre uma profunda depleção de linfócitos CD3+ do sangue periférico <sup>52</sup>. Evidências de que estas células são realmente removidas da circulação são encontradas pelas seguintes observações: a) diminuição do número total de linfócitos no sangue ; b) perda de reatividade dos linfócitos remanescentes com outros marcadores de células T como CD4, CD8 e CD11; c) e ausência de células ligadas ao OKT3. Após alguns dias de administração, observa-se o reaparecimento de significativas proporções de linfócitos CD4+ e CD8+ na circulação sem, contudo, expressarem CD3 ou Rct em sua superfície <sup>44</sup>. Estas observações sugerem que o OKT3 exerce suas ações imunossupressivas mediante dois mecanismos principais: 1) destruição inicial de linfócitos, que pode ocorrer via linfocitotoxicidade humoral, com auxílio de complemento ou citotoxicidade celular anticorpo-dependente (células K) ou por opsonização com destruição pelo sistema monocítico-macrofágico; 2) inativação subsequente das células T por bloqueio do complexo CD3 pelo OKT3 ou por modulação antigênica, isto é, redistribuição e desaparecimento reversível da molécula antigênica alvo da superfície da membrana celular, através de internalização ou desprendimento <sup>42</sup>. Como o Rct está ligado na superfície celular ao complexo CD3, ele sofre comodulação quando ocorre

o acoplamento do OKT3 com o complexo CD3. Assim, o desaparecimento do receptor de células T da superfície celular explica por que os linfócitos T modulados são imunoincompetentes **196**.

Pouco é conhecido sobre os efeitos do OKT3 nas células que infiltram o enxerto, e os raros estudos, até o momento, revelam resultados controversos. Kerr e Atkins **132** estudaram o infiltrado intra-enxerto realizando biópsias renais antes e no quinto dia de tratamento com OKT3 para rejeição aguda e, embora tenham observado diminuição significativa do infiltrado celular, não encontraram modulação dos linfócitos intra-enxerto, sugerindo que o OKT3 simplesmente bloqueia a capacidade dos linfócitos T periféricos de responder aos antígenos estranhos impedindo-os de atacarem o órgão transplantado. Entretanto, em outro estudo, observou-se modulação antigênica do complexo CD3 da superfície de todos os linfócitos que infiltravam o enxerto após 7 a 14 dias de uso do anticorpo **28**. Nossos resultados preliminares **86**, estudando o infiltrado intra-renal de pacientes submetidos à terapêutica profilática com OKT3 mediante biópsia aspirativa com agulha fina, concordam com aqueles observados por Caillat-Zucman e col.**28**, mostrando importante redução do infiltrado mononuclear intra-enxerto e modulação antigênica do complexo CD3 que persistiu até 2 semanas após a descontinuação do OKT3. Portanto, torna-se difícil estabelecer, até o momento, os precisos mecanismos de ação responsáveis pela eficácia imunossupressora do OKT3,

pois grande parte dos estudos são realizados com fenotipagem de células circulantes. Estes resultados não refletem necessariamente aquilo que está ocorrendo nos órgãos linfóides ou, mais importantemente, dentro do enxerto. Adicionalmente, outros fenômenos, como a ativação de linfócitos T induzida pelo OKT3, que será comentada na seção 1.3.1.3, pode ter implicações na sua ação imunossupressora. O melhor entendimento destes mecanismos de ação é importante para a monitorização e otimização de sua aplicação clínica.

#### 1.3.1.2. Uso Clínico

Em 1981, apenas dois anos após a caracterização dos primeiros AM anti-células T, iniciaram-se os estudos preliminares do uso clínico do OKT3 no tratamento de rejeição aguda em transplantados renais <sup>53</sup>. Os excelentes resultados observados, com reversão de todos os episódios de rejeição aguda, levaram à realização de um estudo multicêntrico randomizado para a sua avaliação no tratamento de rejeição aguda <sup>185</sup>. Os resultados deste estudo foram submetidos ao "Food and Drug Administration" em 1984, e o OKT3 foi aprovado para uso comercial nos Estados Unidos da América em 1986. O AM OKT3 tem sido testado em três situações clínicas: tratamento inicial de rejeição aguda, tratamento de rejeições resistentes aos corticoesteróides ou globulinas antilinfocíticas (terapia de resgate) e, no

período pós-transplante imediato, até duas semanas após, na prevenção da rejeição (tratamento profilático).

A maioria dos estudos iniciais de avaliação do OKT3 compara a sua eficácia no tratamento da rejeição aguda com o uso de corticoesteróides (Tabela 1) <sup>59,121,181,185</sup>. O ensaio clínico randomizado publicado em 1985 <sup>185</sup> selecionou dois grupos de pacientes que receberam tratamento anti-rejeição aguda com OKT3 (63 pacientes) ou corticoesteróides (60 pacientes). O grupo OKT3 teve 94% de reversão das rejeições contra 75% no outro grupo (p=0,009). A sobrevida do enxerto em um ano também foi significativamente maior no grupo OKT3 (62% x 45%, p=0,029). Não observou-se diferença estatisticamente significativa na sobrevida dos pacientes e na prevalência de infecções entre os dois grupos.

**Tabela 1. OKT3 no Tratamento Inicial de Rejeição Aguda**

Autor (referência)	Nº Pacientes	Reversão da Rejeição
Deierhoi (59)	34	82%
Hirsch (121)	163	88%
Norman (181)	31	100%
Ortho (185)	63	94%

Um efeito interessante observado foi um aumento inicial da creatinina sérica nos primeiros dias de tratamento. Atualmente, este efeito é considerado como de bom

prognóstico e, mais provavelmente, representa um efeito direto do OKT3 nas células que infiltram o enxerto **162**. Apesar dos ótimos resultados obtidos, o OKT3 não pode ser considerado a droga de primeira escolha para o tratamento inicial da rejeição aguda em face dos bons resultados também conseguidos com os corticoesteróides e os menores efeitos colaterais e custos destes. Portanto, seu uso como primeira droga no tratamento da rejeição aguda seria mais indicado em subgrupos de pacientes com maior risco, como retransplantes, hipersensibilizados contra painel e rejeições severas. Outra indicação possível seria no tratamento de rejeição em pacientes que têm contra-indicação ao aumento nas doses de corticoesteróides, como portadores de doença péptica ou diabéticos. O OKT3 também tem sido utilizado com sucesso no tratamento de rejeições predominantemente vasculares, com um componente celular mediando o dano vascular **60,200**. Atualmente, a principal situação clínica em que o AM OKT3 é utilizado é no tratamento de rejeições resistentes aos corticoesteróides ou globulinas antilinfocíticas (terapia de resgate). Apesar das discrepâncias entre alguns estudos a respeito da definição de rejeição córtico-resistente, a sua análise evidencia claramente que o OKT3 representa uma opção eficaz e segura para reverter rejeições e preservar a função renal quando não houve resposta a outras terapias (Tabela 2) **54,87,129,178,183,194,220,234**.



**Tabela 2. OKT3 como Terapia de Resgate.**

Autor(referência)	nº pacientes	Imunossupressão	Reversão
D'Alessandro (54)	41	C, P, Aza, GAL	83%
Gordon (87)	36	C, P	64%
Kahana (129)	16	C, P, Aza, GAT	81%
Norman (178)	31	C, P, Aza	74%
Oh (183)	23	C, P, Aza, GAL	83%
Ponticelli (194)	15	C, P	80%
Thistlethwaite (220)	40	C, P, Aza	95%
Tvedegaard (234)	21	C, P, Aza	85%

C=Ciclosporina A, P=Prednisona, Aza=Azatioprina  
 GAL=Globulina antilinfocítica, GAT=Globulina Antitimocítica

O uso de AM OKT3 na profilaxia da rejeição consiste, basicamente, em sua inclusão em esquemas quádruplos seqüenciais. Nesta situação, ele é utilizado nas primeiras duas semanas pós-transplante em associação com prednisona e azatioprina, com posterior introdução de ciclosporina quando da retirada do OKT3 com superposição de ambos por dois dias. As razões para a adoção deste esquema imunossupressor são as seguintes: a) retardar o uso de ciclosporina, evitando a nefrotoxicidade a ela associada; b) bloquear a função das células T desde o início do transplante; c) prevenir ou retardar a rejeição ; d) e melhorar a função e a sobrevida do enxerto. Os estudos realizados comparam este esquema com

terapia tríplice ou com terapia quádrupla seqüencial com GAL  
(Tabela 3) **1,139,146,163,176,**.

**Tabela 3. Estudos de Avaliação de OKT3 Profilático**

Autor(ref.)	Grupo	nº pacientes	Rejeição	Sobrevida do Rim em um ano
Ackerman (1)	OKT3	33	15%	100%
	C,A,P	33	61%	100%
Kreis (139)	OKT3	28		89%
	P,A	27		67%
Light (146)	OKT3	43	26%	91%
	GAL	67	57%	92%
Monaco (163)	OKT3	57	44%	93%
	C,A,P	55	62%	91%
Norman (176)	OKT3	105	51%	90%
	C,A,P	102	66%	82%

C=Ciclosporina A, A=Azatioprina, P=Prednisona,  
GAL=Globulina antilinfocítica.

Apesar das diferenças entre estes estudos em relação a diversos aspectos metodológicos - como delineamento, randomização, métodos de análise de dados clínicos e de rejeição, poder estatístico e descrição de complicações - os resultados demonstram que o OKT3 profilático retarda o aparecimento e diminui a incidência de rejeição. Mas, mesmo nos estudos randomizados multicêntricos, como o de Norman e col. **176**, não observa-se diferença estatisticamente significativa na sobrevida do enxerto entre os pacientes que utilizaram OKT3 e o grupo controle. Outra grande dificuldade

na avaliação da eficácia do OKT3 nesta situação é o inevitável cruzamento que ocorre entre os grupos , pois considerável parcela dos pacientes do grupo controle recebem OKT3 para o tratamento de rejeições agudas. O estudo de Norman e col <sup>176</sup> comprova a maior eficácia do OKT3 em três subgrupos de pacientes: pacientes com função renal imediata pós-transplante, com pior compatibilidade HLA e com tempo de isquemia fria maior do que 24 horas. Estudo recente de meta-análise da literatura publicada em língua inglesa ou francesa, entre 1985 e 1991, sobre os efeitos do OKT3 no tratamento e profilaxia da rejeição também não foi capaz de detectar melhora significativa na sobrevida dos enxertos ou de pacientes submetidos a OKT3 profilático <sup>36</sup>. Portanto, estudos adicionais são necessários para determinar o papel do OKT3 na prevenção da rejeição e em que grupos de pacientes ele seria mais benéfico. Uma estratégia alternativa, com os objetivos de redução de custos e de efeitos colaterais, é a utilização de OKT3 profilático em doses menores do que as habitualmente empregadas <sup>177</sup>.

#### **1.3.1.3. Monitorização e Complicações**

A necessidade de monitorização e as complicações relacionadas com o uso do AM OKT3 decorrem de três tipos de efeitos por eles ocasionados: a) sensibilização; b) efeitos diretos sobre as células alvos ; c) e imunossupressão

excessiva. Como o OKT3 é um anticorpo produzido em camundongos, a sua administração em humanos induz ao desenvolvimento de anticorpos que podem neutralizar o seu efeito terapêutico. Esta sensibilização é reduzida pelo uso concomitante de outros imunossuppressores, como os corticoesteróides, a azatioprina e a ciclosporina <sup>43</sup>. Mesmo assim, uma significativa proporção de pacientes (40-50%) desenvolve anticorpos, principalmente de classe IgG e direcionados contra idiotipos do OKT3 <sup>73</sup>. Por isso, recomenda-se a monitorização clínica através da realização de contagens de linfócitos CD3+ no sangue periférico por imunofluorescência ou através de citometria de fluxo. O objetivo é manter as contagens de linfócitos CD3+ inferiores a 50/microlitro e idealmente abaixo de 10/microlitro. Outro método recomendado, de especial utilidade na situação do reuso de OKT3, é a determinação de anticorpos antiidiotípicos por ELISA ou por ensaio biológico. A detecção de anticorpos em diluições do soro maiores do que 1/100 estão associados à má resposta terapêutica. Relatos de boas respostas em pacientes submetidos a retratamento com OKT3 sugerem que títulos de anticorpos anti-OKT3 inferiores a 1/1000 são preditivos de eficácia terapêutica <sup>179,18</sup>.

As principais complicações relatadas com o uso de OKT3 são provavelmente resultantes de alterações induzidas na função das células T, principalmente a síndrome de liberação de citocinas, secundária a ativação de linfócitos T. Este quadro aparece freqüentemente nas primeiras doses e inclui

os seguintes sintomas: febre, calafrios, mialgias, cefaléia, náuseas, vômitos e diarreia. Complicações mais sérias podem ocorrer raramente, como o edema pulmonar que, geralmente, está associado à congestão circulatória, ou alterações do SNC (convulsões e meningite asséptica) <sup>126</sup>. Menos frequentemente, são citadas outras complicações, como taquicardia ventricular associada à hiperpirexia <sup>97</sup>, nefrotoxicidade <sup>232</sup>, pancitopenia <sup>27</sup> e síndrome hemolítico-urêmico <sup>66</sup>. A síndrome de liberação de citocinas, atribuída inicialmente à lise linfocitária, tem sido extensamente investigada, encontrando-se associada a níveis séricos elevados de fator de necrose tumoral e gama interferon, que são reduzidos pela administração prévia de corticoesteróides <sup>41</sup>. Existem evidências de que a ativação linfocitária induzida pelo OKT3 é dependente de ligação cruzada com células portadoras de receptores Fc (como os monócitos). Fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de OKT3, que não possuem porção Fc, induzem mínima ativação linfocitária e análises de diferentes isotipos de anticorpos anti-CD3 demonstram que a potência de ativação linfocitária é maior com alguns anticorpos, como os isotipos IgG2a em relação aos IgG1 ou IgG2b <sup>248,78</sup>. Entretanto, outros anticorpos monoclonais, como o BMA031 dirigido contra o receptor de células T, também causam liberação de citocinas na circulação, sem induzir os efeitos produzidos pelo OKT3. Portanto, outros mecanismos adicionais, como a ativação de polimorfonucleares via receptores Fc, poderiam contribuir para o aparecimento

das complicações induzidas pelas primeiras doses de OKT3 **199**. Por outro lado, especula-se que o desenvolvimento de rejeições recorrentes pós-OKT3 poderia ser uma consequência tardia da ativação linfocitária inicial **71**. Algumas abordagens têm sido tentadas para prevenir as manifestações clínicas atribuídas à síndrome de liberação de citocinas e incluem: agentes farmacológicos, como a indometacina **76** e a pentoxifilina **2**, ou anticorpos monoclonais anti-fator de necrose tumoral **73,40**.

O uso de agentes imunossupressores potentes leva à intensa redução da função imune, propiciando o surgimento de infecções oportunistas. Em relação ao OKT3, o principal problema é o desenvolvimento de infecção viral. Incidências aumentadas de infecção por citomegalovírus **117** e de doenças linfoproliferativas induzidas por vírus Epstein-Barr **62,215** têm sido relatadas. A estratégia recomendada para prevenir estas complicações é não administrar OKT3 por mais do que 15 dias ou em doses diárias superiores a 5 mg e reduzir a imunossupressão concomitante, especialmente a dose de ciclosporina.

### **1.3.2. Outros Anticorpos Monoclonais**

O sucesso obtido com a aplicação clínica do AM OKT3, principalmente no tratamento de rejeições agudas severas, estimulou a investigação de numerosos outros AM que fossem

capazes de suprimir a resposta imune aos aloenxertos de forma mais eficaz e específica. Na Tabela 4 estão relacionados os ensaios clínicos com os outros AM, com as suas respectivas especificidades e grau de eficácia.

**Tab. 4. Experiências Clínicas com Outros Anticorpos Monoclonais**

AM(referência)	Especificidade	Isotipo	Alvo	Eficácia
Huly-1 (223)	CD2	IgG2b	Pan-T	-
BMA031 (118)	RcT	IgG2b	Pan-T	+
T10B9.1A-31 (240)	RcT	IgM	Pan-T	+
MT412 (159)	CD4	IgG1	T4	+
Leu2a (243)	CD8	IgG1	T8	-
Anti-T12 (135)	CD6	IgM	Pan-T	-
SDZCHH380 (109)	CD7	IgG1	T-Blastos	+
Campath-1 (79)	CDW52	IgM	Mononucleares	-
25-3 (145)	CD11a	IgG1	Leucócitos	-
33B3.1 (208)	CD25	IgG2a	T ativadas	+
BIRR1 (104)	CD54	IgG2a	ICAM-1	+

Adaptado de Cosimi, A.B.<sup>49</sup>

Dentre todos estes AM testados, alguns têm especificidades semelhantes ao OKT3, como os anti-RcT, sendo mais promissor o T10B9.1A-3, que parece ter uma potência comparável ao OKT3 e, como é dirigido contra um epítipo diferente, pode representar uma alternativa ao OKT3 nas

situações em que este não for eficaz. Os anticorpos anti-CD25 dirigidos ao receptor de interleucina 2 seriam mais específicos, pois atuariam somente nas células T ativadas. Porém, os estudos clínicos até agora realizados mostram que é ineficaz no tratamento de rejeição aguda <sup>33</sup> e não foram observados resultados significativamente melhores na profilaxia da rejeição quando comparado com GAT <sup>208</sup>. Os anticorpos anti-CD7 e anti-ICAM-1 apresentam resultados promissores, mas os estudos clínicos são ainda muito preliminares. O anticorpo anti-CD4 tem demonstrado, em modelos experimentais, a capacidade de induzir tolerância específica <sup>191</sup>. Entretanto, os estudos clínicos também estão em fases iniciais, sendo necessário verificar se tal propriedade será manifesta em transplantes humanos.

A terapêutica com AM encontra-se nos estágios iniciais. Os resultados até agora obtidos são promissores, porém distantes de esgotar o seu potencial como imunossuppressores. Espera-se que, no futuro, com o desenvolvimento de novos anticorpos e alterações na sua estrutura molecular através de tecnologia de DNA recombinante, eles contribuam decisivamente para uma melhor sobrevida dos enxertos e auxiliem a atingir o objetivo maior da imunossupressão que é a tolerância específica aos antígenos do doador.



#### 1.4. A Punção Aspirativa Renal (PAR)

Hayry e Von Willebrand relatam que punções aspirativas eram feitas em tireóides no ano 1000 DC em Córdova <sup>108</sup>. O mesmo procedimento foi utilizado no século passado e até meados do presente século em várias circunstâncias com vistas aos mais diferentes diagnósticos. Mais recentemente, em 1960, critérios diagnósticos mais precisos foram instituídos por Franzén e colaboradores <sup>77</sup>.

A aplicação da PAR ao transplante renal data de 1968 quando, em Helsinque, utilizou-se esse procedimento em aloenxertos renais humanos, descrevendo as populações de células que infiltravam o enxerto no momento da rejeição aguda <sup>190</sup>. Estudos subseqüentes, procedidos em um momento em que a resposta imune aos aloenxertos já era melhor entendida, serviram para a padronização técnica do procedimento e do método. Nesta época, foram definidos parâmetros de representatividade da amostra, como o número mínimo de 7 células parenquimatosas por 100 leucócitos, e foi introduzida a metodologia de interpretação da amostra conhecida como "incremento corrigido total" (ICT). Neste método tenta-se quantificar o infiltrado inflamatório intra-enxerto e minimizar os problemas de contaminação da amostra com células inflamatórias provindas de sangue aspirado do interior de vasos durante a realização da punção. Assim, das células contadas no infiltrado renal são deduzidas aquelas observadas em lâminas de sangue

periférico, obtidas por punção de polpa digital concomitantemente à punção aspirativa do enxerto. A diferença resultante é denominada de "incremento", e aos diferentes tipos celulares é atribuído um fator de correção de acordo com a sua relevância no processo imunológico **106, 108**. A soma dos "incrementos corrigidos" resulta no ICT. Esta técnica é rápida, segura e pode ser realizada repetidamente sem riscos significativos, permitindo a monitorização seriada dos eventos intra-enxerto, especialmente a detecção e o seguimento dos infiltrados inflamatórios que acompanham o processo de rejeição aguda. Ao mesmo tempo, algumas das limitações do método foram estabelecidas como aquelas que ocorrem para os diagnósticos de rejeição crônica **30**, rejeições vasculares, glomerulonefrites, edema e fibrose intersticiais **61**. A validação da acuidade diagnóstica da PAR na disfunção renal aguda do enxerto foi estabelecida em estudos que comparam estes diagnósticos com os obtidos através da biópsia renal percutânea (BRP). Nesses estudos um grau de concordância satisfatório tem sido encontrado para os diagnósticos de rejeição aguda, necrose tubular aguda e nefrotoxicidade aguda da Ciclosporina **61, 74, 207, 85, 195**. Adicionalmente, a utilidade da PAR no diagnóstico das infecções bacterianas ou fúngicas intra-enxerto renal foi estabelecida por diversos grupos **195, 113, 188, 84**.

No Brasil, trabalhos feitos por 4 grupos de transplante confirmam os resultados da experiência internacional com PAR

e essa se tornou uma rotina no atendimento dos pacientes transplantados em alguns desses serviços **38,57,85,169,170**.

Estudos imunocitoquímicos, em material obtido por PAR, têm sido relatados e têm auxiliado no entendimento da reação de rejeição aguda aos aloenxertos, através da análise de subpopulações linfocitárias e através do estudo da expressão de moléculas HLA, receptores de interleucina-2 e moléculas de adesão do sistema imune em células linfóides e parenquimatosas **5, 20, 105, 111, 247**. As características do infiltrado inflamatório intra-enxerto depende do processo de rejeição e do tratamento imunossupressor utilizado. Em alguns estudos, a PAR tem sido utilizada para esclarecer o impacto de algumas drogas imunossupressoras, especialmente os seus efeitos nos infiltrados renais **68**. Em particular, os efeitos do anticorpo monoclonal OKT3 sobre a composição do infiltrado intra-enxerto, estudados por PAR, encontram-se entre os poucos estudos que auxiliam no entendimento do mecanismo de ação destas preparações **101,127,86**. Da mesma maneira, técnicas de imunoperoxidase foram empregadas com o objetivo de detectar depósitos de ciclosporina em células parenquimatosas renais **238**.

Técnicas de hibridização in situ de material obtido por aspirado renal foram utilizadas para o diagnóstico de infecções virais. Estas técnicas permitem a identificação do DNA viral nas células, aumentando a acuidade diagnóstica para este tipo de infecção **6,103**. Células cultivadas a partir de aspirados renais poderão facilitar o entendimento

da resposta imune aos aloenxertos, tanto no que diz respeito às células alvo, quanto no que importa aos mecanismos efetores **123,151**.

A análise, por citometria de fluxo, do material obtido por PAR tem sido sugerida na literatura como alternativa à avaliação citológica convencional **37,217,221**. Esta abordagem, apesar de promissora, pode produzir resultados conflitantes provavelmente em função do pequeno número de células para análise no citômetro de fluxo, não padronização das "janelas" do mesmo e diferentes protocolos de imunossupressão **221,161**.

Mais recentemente a expressão de genes das citocinas, mais especificamente o RNA mensageiro da IL-2, foi estudado seqüencialmente pela reação em cadeia da polimerase (PCR) feita a partir de material obtido por PAR **56**. A aplicação de técnicas de biologia molecular ao material obtido por PAR pode vir a representar a oportunidade única de se empregar conjuntamente uma técnica altamente sensível em um material que pode ser obtido intra-enxerto diariamente. Isso poderá permitir um melhor entendimento da montagem da resposta imune e dos eventos que mediam a rejeição e aceitação dos órgãos transplantados, assim como dos mecanismos de ação das drogas utilizadas na profilaxia e tratamento das rejeições dos transplantes.

A partir da experiência com PAR, punções aspirativas de outros órgãos transplantados, tais como fígado **134, 252** e pâncreas **89,154**, têm sido relatadas na literatura.

## 1.5. Objetivos

1.5.1. Verificar os efeitos do AM OKT3 sobre a magnitude do infiltrado intra-enxerto.

1.5.2. Verificar a ação do AM OKT3 sobre a expressão de moléculas CD3 na superfície dos linfócitos intra-enxerto e do sangue periférico.

1.5.3. Correlacionar os efeitos observados do AM OKT3 sobre o infiltrado intra-enxerto com os possíveis mecanismos de ação do mesmo.

## 2. PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Pacientes

Foram incluídos no estudo todos os pacientes transplantados no período de janeiro de 1989 a junho de 1992 na Unidade de Transplante Renal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que tenham recebido AM OKT3. Os pacientes incluídos foram alocados em três grupos de acordo com os seguintes critérios: a)Grupo OKT3 profilático: constituído por 16 pacientes receptores de transplantes renais cadavéricos que receberam OKT3 em esquema de imunossupressão quádrupla seqüencial; b)Grupo controle: formado por 16 pacientes receptores de transplantes renais cadavéricos, transplantados no mesmo período que os pacientes do Grupo OKT3 profilático e que foram randomizados por ordem de entrada no estudo, ou seja, os pacientes ímpares receberam OKT3 em esquema quádruplo seqüencial e os pares receberam imunossupressão tríplice convencional e constituíram os controles em relação ao grupo OKT3 profilático; c)Grupo OKT3 terapêutico: constituído pelos 17 pacientes que receberam OKT3 para tratamento de rejeição aguda córtico-resistente. Todos os pacientes apresentavam prova cruzada negativa contra os linfócitos do doador (linfócitos totais) e iniciaram a medicação imunossupressora no pré-transplante imediato (receptores de rins de doadores

cadavéricos) ou dois dias antes da cirurgia do transplante (receptores de rins de doador vivo).

A avaliação clínica e o acompanhamento laboratorial pós-transplante foram feitas diariamente, ocasionalmente 2 vezes ao dia, durante a internação; duas vezes por semana por 1 mês após a alta hospitalar; 1 vez por semana até o fim do segundo mês; uma vez por quinzena por 4 meses adicionais; e 1 vez por mês daí por diante até completar 1 ano. O acompanhamento laboratorial básico constou de exames bioquímicos (glicose, uréia, creatinina e eletrólitos) e exames hematológicos (hemograma e plaquetas). Exames adicionais foram solicitados por indicação clínica. No pós-operatório imediato foi obtido rotineiramente um ultrassom e uma cintilografia de fluxo renal com  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA. Dosagens de Ciclosporina (Abbott laboratories, EUA. Valores normais: 250 a 1000 ng/ml), em sangue total utilizando anticorpo policlonal, foram obtidas duas vezes por semana durante a internação e por indicação clínica posteriormente. Estes exames (cintilografia de fluxo, ecografia e dosagem de Ciclosporina) foram repetidos sempre que os pacientes apresentaram disfunção do enxerto.

Estes pacientes foram submetidos a 3 protocolos de imunossupressão conforme descrito no ANEXO 1.

As disfunções agudas do enxerto - aqui conceituadas como aumento confirmado, significativo ( $\geq 0,3$  mg/dl) da creatinina sérica, ou a ausência de queda aos níveis esperados no pós-operatório - acompanhadas ou não de febre,

aumento do volume do enxerto, hipertensão arterial, edema e oligúria foram investigadas com cintilografia de fluxo, ecografia, dosagem de ciclosporina sérica, punção aspirativa renal, exame do sedimento urinário e exame cultural da urina. As rejeições agudas foram diagnosticadas com base no aumento da creatinina sérica, acompanhado ou não de quadro clínico típico, acima descrito, e levando-se em conta os exames cintilográficos, ecográficos e os demais citados na avaliação de disfunção renal aguda do enxerto. A punção biópsia renal (PBR) foi feita sempre que necessário para esclarecer o diagnóstico nos episódios de disfunção do enxerto. O tratamento de rejeição aguda e o esquema de utilização do OKT3 para tratamento de rejeição córtico-resistente encontram-se descritos no ANEXO 1. Sempre que não houve resposta ao tratamento inicial da rejeição foi realizada a PBR e caso esta demonstrasse persistência da rejeição aguda, com componente celular predominante, estava caracterizada a situação de rejeição córtico-resistente, sendo administrado o anticorpo monoclonal OKT3.

As punções aspirativas renais (PAR) foram procedidas, desde que não houvessem contra-indicações, duas a três vezes por semana, durante a internação, e uma vez por semana, após a alta, até o fim do primeiro mês pós-transplante. Tanto as PAR quanto as PBR foram feitas com o consentimento informado do paciente após o esclarecimento do procedimento, seus riscos e potenciais benefícios.



Cinco pacientes pertencentes inicialmente ao Grupo controle receberam OKT3 para tratamento de rejeição aguda córtico -resistente. Os dados referentes às PAR realizadas nestes pacientes, após o dia em que iniciaram o uso de OKT3, foram excluídos na análise dos resultados do grupo controle para a avaliação do infiltrado intra-enxerto. Como estes pacientes receberam OKT3 para tratamento de rejeição, eles também foram incluídos na análise do Grupo OKT3 terapêutico, pois neste grupo a avaliação do infiltrado foi realizada dentro do grupo, sendo as PAR analisadas nos períodos de 15 dias pré-OKT3, durante OKT3 e 15 dias pós-OKT3.

## **2.2. Material e Métodos**

### **2.2.1. Punção Aspirativa Renal (PAR)**

As punções aspirativas renais foram realizadas conforme descrito na Seção 2.1, sendo utilizados os materiais e procedimentos a seguir relacionados.

#### **2.2.1.1. PAR - Material Utilizado**

- Pistola de Punção Aspirativa
- Agulha 25G 3<sup>1</sup>/<sub>2</sub>
- Seringas de 20 ml e 5 ml
- Agulha hipodérmica 21G
- Campo fenestrado
- Alcool Iodado
- Meio de Cultura para células (RPMI 1640 + heparina 25 U/ml + Hepes 1 ml + albumina bovina 30% 10 ml)

#### **2.2.1.2. PAR - Técnica**

- Paciente deitado em decúbito dorsal;
- Localização do rim por palpação ou eventualmente por ultrassonografia;

- Antissepsia com álcool iodado;
- Colocação de campo fenestrado;
- Na direção de um dos pólos renais introduzir agulha 25G 3<sup>1/2</sup> (agulha de punção espinhal infantil) com colo transparente até sentir a ultrapassagem da cápsula renal. Após, a agulha é avançada mais 0,5 cm. Observar a vibração da agulha que acompanha o pulso sistólico.
- Retirar o mandril da agulha certificando-se da ausência de sangue no seu colo;
- Acoplar o conjunto seringa plástica de 20 ml e pistola de punção à agulha;
- Sob aspiração, proceder um movimento rápido de rotação de 180° e de entra e sai de, aproximadamente 1 cm, retirando-se o conjunto agulha-seringa-pistola ainda sob aspiração;
- Colocar o material aspirado, aproximadamente 10 a 20 ul, em 3 ml de RPMI;
- Aspirar uma gota de sangue, obtida por punção digital, e colocar em 2 ml de RPMI.
- Processar em citocentrífuga e corar por May-Grünwald-Giemsa (MGG). Lâminas adicionais foram preparadas para estudo imunocitoquímico nas PAR de 6 pacientes de cada um dos grupos em estudo.

### **2.2.1.3. Processamento do Material**

O processamento dos aspirados renais e de sangue periférico até a coloração por MGG e a técnica de imunoperoxidase indireta em 3 camadas empregada estão descritas respectivamente nos ANEXOS 2 e 3.

Na técnica de imunoperoxidase foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-CD3, produzido em camundongo (Dakopatts, Dinamarca).

### **2.2.1.4. Avaliação da Adequação, Leitura e Interpretação**

Foram consideradas adequadas para diagnóstico as lâminas em que se cumprisse o critério da presença de pelo menos 7 células parenquimatosas (tubulares ou endoteliais) para cada 100 leucócitos. Caso isso não ocorresse a amostra era considerada não-representativa, não sendo incluída na análise dos resultados. A padronização das interpretações seguiu o protocolo de leitura conforme sugerido por Hayry e Von Willebrand <sup>106</sup> (ANEXO 4). Além da identificação e contagem, as células parenquimatosas são avaliadas quanto à sua integridade morfológica, atribuindo-se um escore de acordo com as alterações encontradas: 0 = células sem alteração, 1 = edema, 2 = edema e vacuolização, 3 = edema, vacuolização e inclusões, 4 = necrose

Desta forma é possível avaliar a presença de alterações parenquimatosas secundárias aos processos de rejeição ou a outros eventos como NTA, necrose cortical e nefrotoxicidade por Ciclosporina, essa em geral caracterizada pela presença de microvacuolização isométrica peri-nuclear das células tubulares renais **173,160,238**.

O infiltrado intra-enxerto foi avaliado pela contagem diferencial das células inflamatórias presentes nas lâminas de punção aspirativa do enxerto, utilizando-se os critérios hematológicos clássicos para a identificação das células. Estas eram contadas em número mínimo de 100, e máximo de 300 sempre que possível, determinando-se o seu percentual em cada amostra. As células presentes em lâminas do sangue periférico foram avaliadas e contadas da mesma forma. A magnitude do infiltrado foi avaliada pelo método do incremento corrigido total (ICT), conforme padronizado por Hayry e von Willebrand **106**. Este método visa reduzir o possível componente de contaminação de sangue durante a realização da punção que pudesse interferir na avaliação do infiltrado intra-enxerto. Assim, as células contadas no sangue periférico são subtraídas daquelas contadas nas lâminas do enxerto, resultando em um valor, chamado de incremento, que representa as células do infiltrado intra-enxerto. Cada valor de incremento obtido é multiplicado por um fator de correção que atribui maior peso às células mais importantes no processo imunológico, e a soma destes incrementos corrigidos resulta em um número que é o

incremento corrigido total (ICT). Desta maneira, o valor do ICT tende a ser mais elevado em situações nas quais as células inflamatórias que infiltram o enxerto encontram-se em maior quantidade e/ou são de maior relevância imunológica (ANEXO 4). Para o diagnóstico citológico de rejeição aguda utilizou-se o escore do ICT maior ou igual a 3,7, acompanhado de "sinais de imunoativação" assim definidos: imunoativação= células imunoativadas (plasmócitos, linfoblastos, monoblastos ou linfócitos ativados) representando 1% ou mais do total de leucócitos presentes na lâmina. A presença ou ausência de imunoativação de cada PAR foi registrada, independente do valor de ICT obtido. Na avaliação imunocitoquímica, buscou-se determinar a expressão dos antígenos CD3 na superfície dos linfócitos de lâminas da punção do enxerto e do sangue periférico. Para isto, contou-se o número mínimo de 100 linfócitos determinando-se a porcentagem de células que inequivocamente expressavam estas estruturas na reação de imunoperoxidase, com microscopia óptica convencional e magnificação de 400 vezes. Os detalhes da técnica de imunoperoxidase se encontram no ANEXO 3 .

A leitura e interpretação dos aspirados renais corados por MGG ou submetidos a técnicas de imunoperoxidase para a avaliação da expressão de antígenos CD3 nos linfócitos foram feitas por um observador "cego", no caso o autor do trabalho, que desconhecia a identidade do paciente, o tipo de imunossupressão e o quadro clínico. As leituras das

lâminas em cada técnica (MGG ou imunoperoxidase) foram feitas de maneira independente, ou seja, o observador não conhecia os resultados das demais técnicas ao fazer a leitura das lâminas de uma técnica em particular. O modelo de ficha de leitura das imunoperoxidasas usado para determinar a expressão de CD3 nos linfócitos encontra-se no ANEXO 5 .

### **2.3. Análises Estatísticas**

#### **2.3.1. Banco de Dados**

Os dados correspondentes aos pacientes e às punções aspirativas realizadas foram colocados em um banco de dados computadorizado, construído no programa Epi Info, Versão 5.0 <sup>58</sup> (ANEXOS 6 e 7). Utilizou-se o programa denominado SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versão 4.0 de 1984, para as análises estatísticas.

#### **2.3.2. Testes Estatísticos**

Os dados demográficos gerais e das características dos pacientes nos diferentes grupos em estudo foram comparados pelo teste t de Student, Mann-Whitney, distribuição Qui-quadrado e o teste exato de Fischer. A avaliação do tipo de

distribuição dos dados foi realizada através do teste de Kolgomorov-Smirnov.

Empregou-se análise de variância (ANOVA) para verificar a presença de diferença significativa entre o número de PAR representativas nos três grupos de pacientes em estudo. Em 10 pacientes, 76 PAR foram interpretadas em duplicata, em momentos diferentes, de maneira independente. Avaliou-se a variação intra-observador na realização das contagens das células inflamatórias e do cálculo do ICT mediante a comparação entre os valores de ICT das duas leituras (teste de Mann-Whitney) e o cálculo do coeficiente de variação (cv) do ICT de cada punção ( $cv = \text{desvio padrão}/\text{média} \times 100$ ).

A magnitude do infiltrado intra-enxerto foi avaliada através do ICT e da frequência de imunoativação nas PAR. A expressão de antígenos CD3 na superfície dos linfócitos foi estudada mediante a determinação de valores percentuais de linfócitos CD3 positivos. Os grupos OKT3 profilático e controle foram comparados, alocando-se o resultado das PAR nos períodos durante a administração de OKT3 e após o uso do mesmo. As punções dos pacientes do grupo controle foram alocadas nos períodos médios correspondentes aos períodos de administração de OKT3 e pós-OKT3 do grupo OKT3 profilático. Utilizou-se o teste de Mann-Whitney ou a distribuição Qui-quadrado para a verificação de diferença significativa nos valores de ICT, na frequência de PAR com imunoativação e nos percentuais de linfócitos CD3 positivos entre estes grupos. Em relação ao grupo OKT3 terapêutico, a análise foi



realizada através da alocação dos resultados das PAR em três períodos: 15 dias pré-OKT3, durante o uso de OKT3 e, 15 dias pós-OKT3. Assim, foram realizadas comparações entre os valores de ICT, entre as frequências de episódios de imunoativação e entre os percentuais de linfócitos CD3 positivos nestes 3 períodos, empregando-se os testes de Kruskal-Wallis, teste de comparações múltiplas (diferença mínima significativa) e a distribuição Qui-quadrado. Utilizou-se o teste de Wilcoxon para a comparação entre dois grupos emparelhados. O nível de significância adotado foi o de  $p < 0,05$ . **253**

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Características da Amostra.

Os pacientes incluídos no estudo foram divididos em 3 grupos. A análise dos efeitos do AM OKT3 sobre o infiltrado intra-enxerto foi realizada nas duas situações clínicas em que foi utilizado: a) na prevenção da rejeição, mediante o estudo de pacientes que receberam OKT3 no esquema quádruplo seqüencial, constituindo o grupo OKT3 profilático (OKT3p); b) e no tratamento de pacientes com rejeição aguda severa que não respondeu ao tratamento inicial com metilprednisolona, constituindo o grupo OKT3 terapêutico (OKT3t). Estudou-se também um grupo Controle, randomizado, que não recebeu OKT3 inicialmente, para comparar as características do infiltrado neste grupo com aquelas observadas no grupo que recebeu OKT3 profilático. Os dados demográficos e gerais dos pacientes dos grupos OKT3 profilático e Controle encontram-se sumarizados na Tabela 5.

**Tab. 5. Dados Demográficos e Gerais dos Pacientes nos Grupos OKT3 Profilático e Controle**

	OKT3 Profilático	Controle	p
N <sup>o</sup> de pacientes	16	16	
Idade (anos) §	44,3 ± 13,0	40,2 ± 7,1	0,27*
Sexo (M/F)	12/4	9/7	0,26&
Diálise pós-Tx(S/N)	10/6	9/7	0,72&
Tempo em diálise § (meses)	47,1 ± 37,7	39,2 ± 22,9	0,51*
N <sup>o</sup> de transfusões mediana(mín;máx)	2(0;21)	3,5(0;21)	0,85@
Isquemia quente § (minutos)	54,1 ± 20,4	51,2 ± 26,1	0,75*
Isquemia fria § (horas)	20,2 ± 5,7	20,1 ± 6,7	0,96*
* teste t de Student	§ Valores expressos em média ± desvio		
@ Mann-Whitney	padrão da média		
& Qui-Quadrado	S/N=Sim/Não M/F=Masculino/Feminino		

Verifica-se que não houveram diferenças estatisticamente significativas entre os dados que caracterizam os grupos OKT3 profilático e Controle ( $p > 0,05$ ).

Os pacientes do grupo OKT3 profilático receberam OKT3 por períodos que variaram de 3 a 14 dias, com média de 10,4 ± 3,96 dias.

Os dados referentes aos pacientes do grupo OKT3 terapêutico são apresentados na Tabela 6.

**Tab. 6. Dados Demográficos e Gerais dos Pacientes no Grupo OKT3 Terapêutico**

	OKT3 Terapêutico
N <sup>o</sup> de pacientes	17
Sexo (M/F)	6/11
Idade (anos) *	35,2 ± 11,5
Tempo em diálise (meses) *	30,5 ± 15,2
n <sup>o</sup> de transfusões *	4,8 ± 1,8
isquemia quente (minutos) *	50,2 ± 23,5
isquemia fria (horas) *	20,0 ± 4,6
n <sup>o</sup> de rejeições em um ano *	1,6 ± 0,6
tempo de OKT3 (dias) *	10,8 ± 1,8

\* Valores expressos em média ± desvio padrão da média

Os dados referentes aos resultados obtidos no acompanhamento destes pacientes em um ano pós-transplante são mostrados na Tabela 7.

Tab. 7. Resultados em um Ano de Acompanhamento

	OKT3p	Controle	OKT3t
Creatinina sérica \$	1,6 ± 0,5*	1,9 ± 0,5*	2,0 ± 0,8
Sem rejeição aguda n (%)	9 (56%)#	1 (6%)#	0 (0%)
N <sup>o</sup> de rejeições \$\$	0 (0;2)@	1 (0;3)@	2 (1;3)
Sobrevida rim n (%)	13(81%)#	12(75%)#	13(76%)
Sobrevida paciente n (%)	15(94%)#	15(94%)#	17(100%)

\* teste t de Student

# teste exato de Fischer

@ Mann-Whitney

\$ Valores expressos em média ± desvio padrão da média

\$\$ Valores expressos em mediana (valor mínimo;valor máximo)

n(%)=n<sup>o</sup> absoluto(porcentagem)

A comparação entre os grupos OKT3 profilático e Controle mostra uma redução estatisticamente significativa na incidência de rejeição aguda nos pacientes que receberam OKT3 profilático (p=0,004 teste de Mann-Whitney), enquanto a porcentagem de pacientes sem rejeição aguda foi significativamente maior neste grupo (p=0,007 teste exato de Fischer).

### 3.2. Número de Punções Aspirativas Renais (PAR) Representatividade e Variação.

Na Tabela 8 são relacionados o número de PAR realizadas nos três grupos em estudo e aquelas consideradas representativas para análise.

**Tab. 8. Número de PAR e Representatividade por Grupo**

	OKT3p	Controle	OKT3t
PAR (n)	123	107	136
Representativas	110(89,4%)	94(87,8%)	124(91,2%)
PAR/Paciente \$	6,9 ± 2,5*	5,8 ± 2,1*	7,3 ± 2,2*

\* p=0,19 ANOVA, \$ Valores expressos em média ± desvio padrão da média

Não encontrou-se diferença estatisticamente significativa no número de PAR representativas entre os três grupos (p>0,05 ANOVA).

Nas 76 PAR analisadas em duplicata não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de ICT nas duas leituras independentes (p>0,05 Mann-Whitney). O coeficiente de variação nestas PAR foi de 0% a 79,5%, com média de 16,1% ± 16,7%. Apenas 10 (13,2%) apresentaram coeficiente de variação maior do que 30%.

Cinco pacientes do grupo Controle receberam OKT3 para tratamento de rejeições córtico-resistentes. As PAR realizadas a partir do momento que iniciaram com OKT3, em número de 17, foram desconsideradas na análise do grupo quando efetuadas as comparações com o grupo OKT3p. Estes pacientes foram incluídos no grupo OKT3t e as PAR neles realizadas foram estudadas como as demais deste grupo.

### **3.3. Avaliação do Infiltrado Inflamatório Intra-Enxerto.**

A avaliação foi realizada mediante a análise das PAR realizadas durante o período de estudo. Nos pacientes dos Grupo OKT3p as PAR foram alocadas nos períodos de administração do OKT3 (durante OKT3) e após o seu uso até 35 dias pós-transplante (pós-OKT3), enquanto nos pacientes do Grupo Controle as PAR foram alocadas em períodos correspondentes àqueles dos pacientes do Grupo OKT3p, com os quais foram comparados. Assim, neste Grupo, o período durante OKT3 corresponde ao período médio de uso de OKT3 (10,4 dias), compreendendo os dias 1 a 10 pós-transplante e o período pós-OKT3 corresponde aos dias 11 a 35 pós-transplante. Nos pacientes do Grupo OKT3 terapêutico as comparações foram realizadas dentro do grupo, alocando-se as PAR nos períodos de 15 dias antes do uso de OKT3 (pré-OKT3), durante a administração de OKT3 (durante OKT3) e até 15 dias após o uso de OKT3 (pós-OKT3).

### 3.3.1. PAR e Imunoativação.

A avaliação da magnitude e importância do infiltrado intra-enxerto foi realizada pelo cálculo do ICT e a contagem das células imunoativadas.

Na Tabela 9 são expostos os achados relativos à observação de imunoativação nas PAR (1% ou mais de células imunoativadas) dos três grupos de pacientes.

**Tab. 9. Imunoativação nas PAR.**

	OKT3p	Grupo Controle	OKT3t
Imunoativação +	31	27	67
Imunoativação -	79	50	57
TOTAL	110	77	124

Qui-quadrado = 17,32      p = 0,0002

Observa-se maior frequência de punções com imunoativação nos pacientes do grupo OKT3 terapêutico, relacionado provavelmente a maior incidência e a maior severidade das rejeições agudas neste grupo.

Comparando os grupos OKT3 profilático e Controle como um todo, não encontrou-se diferença estatisticamente significativa entre as frequências de PAR com imunoativação (Qui-quadrado= 1,0; p= 0,310). Na observação das frequências



de PAR com imunoativação ao longo do tempo, também não encontrou-se diferença estatisticamente significativa entre estes grupos em nenhum momento (Tabela 10).

**Tab. 10. Imunoativação nos Grupos OKT3 Profilático e Controle**

Dias	Controle		OKT3p		p
	N	IA+(%)	N	IA+(%)	
1-5	18	2(11,1)	19	0	0,230#
6-10	19	11(57,9)	24	8(33,3)	0,107*
11-15	17	7(41,2)	20	3(15)	0,136#
16-20	9	3(33,3)	16	5(31,2)	1,000#
> 20	14	4(28,6)	31	15(48,4)	0,213*

# teste exato de Fischer

\* Qui-quadrado

Entretanto, quando estudou-se a presença de imunoativação alocando as PAR nos períodos durante OKT3 e pós-OKT3, observou-se uma frequência significativamente menor de imunoativação no Grupo OKT3 profilático no período durante OKT3 quando comparado ao grupo Controle no mesmo período,  $p=0,009$  (Tabela 11).

Tab. 11. Imunoativação Durante e Pós-OKT3 Profilático

	Grupo OKT3p		Grupo Controle	
	*Durante	@Após	*Dias 1-10	@Dias 11-35
+	5	26	13	14
Imunoativação				
-	43	36	26	24

\* Qui-quadrado = 6,89    p = 0,009

@ Qui-quadrado = 0,25    p = 0,614

Das 27 PAR com sinais de imunoativação do Grupo Controle, 25 ocorreram em vigência de episódios de rejeição aguda, enquanto, no Grupo OKT3 profilático, 19 das 31 PAR com imunoativação não estavam associadas a episódios de rejeição aguda (Qui-quadrado=18,1;  $p < 0,001$ ). Analisando-se a evolução dos 13 pacientes do Grupo OKT3p com presença de imunoativação observou-se que:

- dois pacientes iniciaram a imunoativação no final da administração de OKT3 e desenvolveram rejeição aguda alguns dias após;

- um paciente desenvolveu imunoativação pós-OKT3 relacionada à infecção por citomegalovírus;

- cinco pacientes apresentaram imunoativação pós-OKT3 associada a episódios de rejeição aguda neste período;

- cinco pacientes iniciaram com imunoativação no final ou logo após o uso de OKT3 e não desenvolveram rejeição aguda posteriormente.

A distribuição das frequências de PAR com imunoativação nos pacientes do Grupo OKT3 terapêutico, ao longo dos períodos analisados, pode ser observada na Tabela 12.

**Tab. 12. Imunoativação Pré, Durante e Pós OKT3 Terapêutico.**

	Grupo OKT3 Terapêutico		
	Pré	Durante	Pós
+	31	16	20
Imunoativação			
-	15	30	12

Encontrou-se frequência significativamente menor de imunoativação durante OKT3 quando comparado ao período pré-OKT3 (Qui-quadrado=9,79;  $p=0,002$ ) ou ao período pós-OKT3 (Qui-quadrado=5,83;  $p=0,016$ ).

As 31 PAR com imunoativação no período pré-OKT3 estiveram associadas a episódios de rejeição aguda; entretanto, 9/16 e 13/20 das imunoativações dos períodos durante e pós-OKT3 não estiveram relacionadas à rejeição aguda (Qui-quadrado=28,21;  $p<0,001$ ). Semelhante ao ocorrido com o Grupo OKT3 profilático, 7 dos 17 pacientes que receberam OKT3 terapêutico apresentaram imunoativação no final ou logo após o uso de OKT3 e não desenvolveram episódios posteriores de rejeição aguda.

### 3.3.2. Incremento Corrigido Total

A avaliação da magnitude do infiltrado intra-enxerto foi avaliada pelo cálculo do Incremento Corrigido Total (ICT) nas PAR. Os valores de ICT nos 3 grupos em estudo podem ser observados na Tabela 13.

**Tab. 13. Incremento Corrigido Total. Medianas, Valores Máximos e Mínimos**

	OKT3p	Grupo Controle	OKT3t
Nº PAR	110	77	124
ICT	2,4(0;12,2)	2,4(0;8,9)	3,8(0,1;12,5)

p<0,001 Kruskal-Wallis

A comparação entre os valores de ICT dos três grupos revelou uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$  Kruskal Wallis), observando-se valores mais elevados no grupo OKT3 terapêutico quando comparado ao grupo OKT3 profilático e ao grupo Controle. A análise pelo teste de comparações múltiplas mostrou uma diferença mínima significativa entre o grupo OKT3t e o grupo OKT3p, assim como entre OKT3t e o grupo Controle ( $p < 0,05$ ).

A comparação entre os grupos OKT3 profilático e o grupo Controle, tomando-os em conjunto, não mostrou diferença estatisticamente significativa nos valores de ICT entre ambos ( $p=0,979$  Mann-Whitney). A evolução dos valores mínimos, máximos e das medianas de ICT nas PAR destes pacientes, ao longo do tempo, pode ser observada na Tabela 14.

**Tab. 14. Incremento Corrigido Total nos Grupos OKT3 Profilático e Controle.**

Dias	Grupo OKT3p		Grupo Controle		p*
	ICT n	mediana(mín;máx)	ICT n	mediana(mín;máx)	
1-5	19	0,5(0;3,6)	18	1,5(0;6,6)	0,109
6-10	24	2,8(0;7,2)	19	3,8(0,6;8,9)	0,182
11-15	20	2,3(0,2;12,2)	17	2,4(0,6;5,2)	0,879
16-20	16	2,2(0,9;5,2)	9	2,5(0,8;4,1)	0,932
> 20	31	4,0(0,5;8,7)	14	2,5(0,9;7,6)	0,339

\* Teste de Mann-Whitney

Não houve diferença significativa nos valores dos ICT entre os grupos em qualquer dos intervalos de tempo. A comparação entre os valores dos ICT de acordo com o período, durante o uso de OKT3 ou após, no Grupo OKT3p e nos períodos correspondentes no Grupo Controle, pode ser observada na Tabela 15.

**Tab. 15. Incremento Corrigido Total Durante e Após OKT3 Profilático.**

Período	Grupo OKT3p		Grupo Controle	
	n <sup>o</sup> PAR	ICT*	n <sup>o</sup> PAR	ICT*
Durante OKT3	48	2,0(0;12,2)	39	1,9(0;8,9)
Pós-OKT3	62	3,2(0,5;8,8)	38	2,4(0,6;7,6)

\* valores expressos em mediana(valor mínimo;valor máximo)

A análise estatística mostrou que, no grupo OKT3p, ocorreram valores de ICT significativamente menores no período durante OKT3 quando comparado ao período pós-OKT3 ( $p < 0,001$  Mann-Whitney). Quando comparou-se os grupos entre si, encontrou-se valores menores de ICT no período durante OKT3 no Grupo OKT3 profilático, embora sem atingir significância estatística ( $p = 0,064$  Mann-Whitney). Neste caso o cálculo do poder do estudo foi de 45%; sugerindo que um aumento no tamanho da amostra poderia vir a demonstrar diferença estatisticamente significativa. Ao contrário, no período pós-OKT3 observou-se uma tendência a valores mais elevados de ICT no Grupo OKT3 profilático, também sem significância estatística ( $p = 0,119$  Mann-Whitney). De qualquer forma, estes resultados sugerem que o OKT3 utilizado profilaticamente reduz a magnitude do infiltrado intra-enxerto durante a sua administração.

Em relação ao grupo OKT3 terapêutico, a comparação entre os valores de ICT nos 3 períodos - pré, durante ou após OKT3 - pode ser observada na Tabela 16.

**Tab. 16. Incremento Corrigido Total Pré, Durante e Pós-OKT3 Terapêutico**

Período	n <sup>o</sup> PAR	ICT mediana (mín;máx)
Pré-OKT3	46	4,1 (1 ; 12,5)
Durante OKT3	46	3,1 (0,2 ; 6,9)
Pós-OKT3	32	5,1 (0,1 ; 10,2)

p=0,004 Kruskal Wallis

A análise estatística mostra uma diferença significativa entre os valores de ICT nos 3 períodos avaliados (p=0,004 Kruskal Wallis). A avaliação pelo teste de comparações múltiplas mostrou uma diferença mínima significativa entre os períodos durante e pós-OKT3 (p<0,05).

Semelhante ao ocorrido no grupo OKT3 profilático, evidenciou-se uma redução significativa do infiltrado intra-enxerto em vigência de OKT3. Estes dados, juntamente com aqueles referentes à presença de imunoativação, sugerem que a administração de OKT3, seja profilático ou para tratamento de rejeição aguda, é capaz de evitar ou reduzir, respectivamente, a infiltração celular no enxerto e os danos por ela mediados.

### 3.3.3. Expressão de Antígenos CD3 nos Linfócitos

Esta avaliação foi realizada mediante a contagem das porcentagens de linfócitos CD3+ nas lâminas de sangue periférico e das punções aspirativas renais em 6 pacientes de cada grupo, através da técnica de imunoperoxidase indireta em três camadas. Os resultados desta técnica estão sumarizados na Tabela 17, que apresenta o número de amostras estudadas e os valores percentuais de linfócitos CD3+ no sangue e no enxerto dos diferentes grupos em estudo.

**Tab. 17. Porcentagens de Linfócitos CD3+ no Sangue e no Enxerto**

Grupo	CD3+ no enxerto n <sup>o</sup>	mediana(mín;máx)	CD3+ no sangue n <sup>o</sup>	mediana(mín;máx)
Controle	36	75,0 (60;90,9)	36	76,2 (56,5;90)
OKT3p	47	34,2 (5,4;84,4)	46	35,9 (3,3;87,1)
OKT3t	49	53,0 (4,0;76)	47	35,6 (3,0;73)

Não houve diferença significativa entre as porcentagens de linfócitos CD3+ no sangue e no enxerto em qualquer um dos grupos de pacientes (Controle  $p=0,940$ ; OKT3p  $p=0,575$ ; OKT3t  $p=0,286$ ; Wilcoxon). A comparação entre os grupos OKT3p e Controle mostra valores percentuais de linfócitos CD3+ significativamente menores no grupo OKT3 profilático, tanto



intra-enxerto ( $p < 0,001$  Mann-Whitney) como no sangue periférico ( $p < 0,001$  Mann-Whitney).

A evolução dos valores mínimos, máximos e das medianas das porcentagens de linfócitos CD3+ intra-enxerto nos pacientes dos grupos OKT3 profilático e Controle, ao longo do tempo, pode ser observada na Tabela 18.

**Tab. 18. Evolução das Porcentagens de Linfócitos CD3+ Intra-enxerto nos Grupos OKT3 Profilático e Controle**

Dias	Linfócitos CD3+ Intra-Enxerto		Grupo Controle		p*
	Grupo OKT3p n	mediana(mín;máx)	n	mediana(mín;máx)	
1-5	11	19,4(5,4;33,3)	7	75(65;90,9)	<0,001
6-10	10	35,5(6,7;59,6)	9	77,7(60;86)	<0,001
11-15	8	27,1(9,9;61,3)	3	75(75/86,7)	0,014
16-20	8	55,2(34,2;75)	5	81(63;87)	0,019
>20	10	74,5(46,8;84,4)	12	70,6(60,3;83,3)	0,843

\* Teste de Mann-Whitney

Verificou-se que as porcentagens de linfócitos CD3+ intra-enxerto foram significativamente menores no grupo OKT3 profilático até o 20<sup>o</sup> dia pós-transplante ( $p < 0,05$  Mann-Whitney), o mesmo sendo constatado em relação aos linfócitos CD3+ no sangue periférico (Tabela 19).

**Tab. 19. Evolução das Porcentagens de Linfócitos CD3+ do Sangue nos Grupos OKT3 Profilático e Controle.**

Dias	Linfócitos CD3+ no Sangue				p*
	Grupo OKT3p		Grupo Controle		
	n	mediana(mín;máx)	n	mediana(mín;máx)	
1-5	11	8,3(3,3;17,1)	7	73,9(63;82)	<0,001
6-10	11	27,5(11,1;61,8)	9	75,9(56,5;89,3)	<0,001
11-15	6	35,5(14,8;41,1)	4	75,7(62;89)	0,01
16-20	8	52,2(35,6;75)	5	78(71;90)	0,012
>20	10	74,8(39,1;87,1)	11	76,9(57,8;84,3)	0,833

Teste de Mann-Whitney

A comparação entre as porcentagens de linfócitos CD3+ no sangue e no enxerto, de acordo com o período, durante ou após o uso de OKT3 profilático e nos períodos correspondentes para o grupo Controle, pode ser observada na Tabela 20.

**Tab. 20. Porcentagens de Linfócitos CD3+ Durante e Após OKT3 Profilático**

	Durante OKT3		Pós-OKT3	
	n	mediana(mín;máx)	n	mediana(mín;máx)
CD3+ Intra-enxerto				
Grupo OKT3p	25	20,0(5,4;51,7)	22	60,7(21,1;84,4)
Grupo Controle	16	76,3(60,0;90,9)	20	73,5(60,3;87,0)
CD3+ no Sangue				
GRUPO OKT3p	25	18,9(3,3;48,0)	21	63,6(14,8;87,1)
Grupo Controle	16	75,4(56,5;89,3)	20	76,7(57,8;90,0)

A análise estatística demonstrou uma redução significativa das porcentagens de linfócitos CD3+ no grupo OKT3p no período durante OKT3 quando comparado ao período pós-OKT3 no mesmo grupo, tanto intra-enxerto ( $p < 0,001$  Mann-Whitney) como no sangue ( $p < 0,001$  Mann-Whitney). Quando comparado ao grupo Controle, no período correspondente, encontrou-se percentuais significativamente menores no grupo OKT3p de linfócitos CD3+ intra-enxerto ( $p < 0,001$  Mann-Whitney) e no sangue periférico ( $p < 0,001$  Mann-Whitney). Mesmo no período pós-OKT3, mantém-se uma redução significativa no percentual de linfócitos CD3+ no grupo OKT3p em relação ao Controle, embora não tão marcada, tanto intra-enxerto ( $p = 0,006$  Mann-Whitney) quanto no sangue periférico ( $p = 0,01$  Mann-Whitney).

Na Tabela 21 encontram-se os dados referentes aos percentuais de linfócitos CD3+ no grupo OKT3 Terapêutico, de acordo com o período de administração de OKT3.

**Tab. 21. Porcentagens de Linfócitos CD3+ no Grupo OKT3 Terapêutico**

	Pré-OKT3	Durante OKT3	Pós-OKT3
CD3+ Intra-enxerto			
n	13	22	14
mediana(mín;máx)	64,4(54,5;69,6)	13,4(4;29)	59,5(35,1;76)
CD3+ no Sangue			
n	11	23	13
mediana(mín;máx)	60,0(54;67,5)	12,2(3;19)	61,8(35,6;73)

A análise estatística revela uma diferença significativa entre as porcentagens de linfócitos CD3+ nos diferentes períodos do grupo OKT3t tanto intra-enxerto ( $p < 0,001$  Kruskal-Wallis) como no sangue ( $p < 0,001$  Kruskal-Wallis). Observa-se uma diminuição significativa nas porcentagens desses linfócitos no período durante OKT3 quando comparado aos períodos pré-OKT3 ou pós-OKT3, tanto intra-enxerto como no sangue periférico ( $p < 0,05$  teste de comparações múltiplas para Kruskal-Wallis).

Estes resultados demonstram que, durante a administração de OKT3 - seja profilático ou para tratamento de rejeição aguda - ocorre uma redução na expressão de antígenos CD3 nos linfócitos, tanto no sangue periférico como nos linfócitos presentes no infiltrado inflamatório intra-enxerto.

#### 4. DISCUSSÃO

O objetivo central do presente estudo foi analisar as características do infiltrado inflamatório intra-enxerto em pacientes submetidos à imunossupressão com anticorpo monoclonal OKT3. O estudo dos efeitos do OKT3 sobre as células que participam do processo de rejeição dentro do enxerto é essencial para o entendimento do seu mecanismo de ação. Para este fim, empregou-se a técnica de punção aspirativa renal. Esta técnica foi utilizada neste trabalho do mesmo modo como tem sido empregada em vários centros de transplante para a monitorização dos fenômenos intra-enxerto pós-transplante, e os achados foram relatados de forma padronizada (ANEXO 4), conforme estabelecido no Primeiro Workshop Internacional de Citologia Aspirativa de Transplantes, realizado em Munique em 1982. A premissa de que a punção aspirativa é adequada para descrever o infiltrado intra-enxerto apoia-se nas seguintes observações: há uma clara correlação entre a intensidade e características da inflamação observada em espécimes concomitantes de PAR e de biópsia renal **107,90** ; e concordância entre os achados da PAR e a composição citológica do infiltrado em enxertos renais rejeitados e submetidos a nefrectomia e digestão enzimática **106**.

#### 4.1. Características da Amostra

Os pacientes selecionados para o estudo foram aqueles que durante o período de coleta de dados receberam anticorpo monoclonal OKT3. Um grupo adicional de pacientes receptores de transplantes cadavéricos foram incluídos como grupo Controle dos pacientes que receberam OKT3 profilático. A comparação das características destes dois grupos (Tabela 5) demonstra que não há diferenças estatisticamente significativas entre ambos. Portanto, estes grupos são semelhantes, apenas diferindo quanto ao uso de OKT3. Os cinco pacientes do grupo controle que receberam OKT3 para tratamento de rejeição córtico-resistente também foram analisados dentro do grupo OKT3 terapêutico, e os dados das PAR realizadas após o início do OKT3 não foram consideradas na análise do grupo Controle; não ocorrendo, portanto, cruzamento entre os grupos. A exclusão destes pacientes do grupo controle não foi realizada porque entendeu-se que tal procedimento representaria uma seleção dos melhores, uma vez que estes casos foram os que tiveram rejeições mais severas. A análise do grupo OKT3 terapêutico foi realizada dentro do próprio grupo, cada paciente sendo o seu controle, verificando-se a influência do OKT3 sobre o infiltrado inflamatório intra-enxerto, comparando-se os dados das punções aspirativas renais realizadas antes, durante e após o mesmo.

#### 4.2. Número de PAR, Representatividade e Variação.

Empregou-se como critério de representatividade da PAR a presença de número igual ou superior a 7 células parenquimatosas para cada 100 células inflamatórias. Este critério foi definido por von Willebrand e Hayry <sup>239</sup>, que obtiveram correlação de 0,95 entre punções duplas simultâneas que continham esta relação entre células parenquimatosas e inflamatórias.

Os métodos de estudo foram os mesmos para os três grupos de pacientes. Não observou-se diferença estatística no número de PAR representativas entre os três grupos de pacientes. A representatividade das PAR (Tabela 8) situou-se em torno de 90% e está de acordo com as taxas relatadas na literatura <sup>61, 195, 110</sup>, refletindo a experiência adquirida pela equipe com este método. A análise em duplicata de 76 PAR mostrou que não houve diferença significativa entre os valores de ICT nas duas leituras independentes. O coeficiente de variação médio foi de 16% e apenas em 10 PAR a variação entre as leituras foi maior do que 30%. Estes dados demonstram a pequena variação intra-observador na avaliação do infiltrado intra-enxerto. Não encontrou-se na revisão da literatura relato de avaliação da variação intra-observador no cálculo do incremento corrigido total.

#### 4.3. Avaliação do Infiltrado Inflamatório Intra-Enxerto.

A biópsia renal, através de análise histopatológica e imunopatológica, permite avaliar a composição do infiltrado inflamatório dentro do enxerto. Além disso, tem a vantagem de possibilitar a avaliação dos efeitos do infiltrado sobre os componente teciduais. A grande limitação desta técnica é a dificuldade e o risco de obter tecido para estudo de forma sistemática, a fim de poder avaliar dinamicamente a evolução do infiltrado. A PAR oferece a vantagem de ser um método praticamente isento de riscos, podendo ser realizada freqüentemente. O componente inflamatório é analisado na punção aspirativa através do cálculo do ICT. Assim, o valor do ICT, quando examinado junto com o tipo de células que compõem o infiltrado, reflete a composição, a magnitude e a relevância imunológica do mesmo. Portanto, o ICT é um modelo matemático que busca quantificar a composição e a intensidade do infiltrado, mas pode ser influenciado pelo grau de contaminação de sangue da amostra e a contagem diferencial dos leucócitos do sangue periférico<sup>32</sup>. Algumas tentativas foram realizadas para melhorar a análise do infiltrado, como fórmulas que procuram reduzir os efeitos da contaminação sanguínea da amostra <sup>137</sup>, a alteração dos valores do fator de correção dos incrementos <sup>128</sup>, a contagem do número de células imunoativadas por lâmina <sup>110</sup> ou a relação entre o número de células imunoativadas e o número de células tubulares <sup>12</sup>. Entretanto, estas tentativas não



foram capazes de aumentar a acuidade dignóstica da PAR. Certamente, métodos de análise mais complexos e sofisticados poderão ser desenvolvidos, mas, no momento, o método simples de cálculo do ICT tem demonstrado relevância na prática e por isto é ainda o mais utilizado, sendo então escolhido para a avaliação do infiltrado intra-enxerto neste estudo.

O conhecimento a respeito da evolução do processo inflamatório da rejeição decorre da análise de rins transplantados retirados por rejeição irreversível ou pelo seguimento com biópsia renal e PAR de modelos experimentais <sup>90</sup>. Inicialmente, durante os dois primeiros dias pós-transplante, o infiltrado é mínimo ou inexistente. Após, observa-se um aumento na presença de mononucleares e especialmente de células imunoativadas, conforme o infiltrado da rejeição evolui. A presença de infiltrado com sinais de imunoativação pode preceder à deterioração da função renal em horas ou até 2 a 3 dias. A imunoativação observada nos aspirados renais, nos casos de rejeição, está raramente presente no sangue periférico e é representada morfológicamente por células linfocitárias ou monocitárias, com aumento de volume, desenvolvimento de citoplasma basofílico com grande quantidade de ribossomos e hipertrofia do aparelho de Golgi e núcleo com nucléolos proeminentes. Na situação clínica do transplante renal, a composição e a densidade do infiltrado dependerá de vários fatores, como a intensidade da rejeição, a proeminência de componentes celulares ou vasculares, o estágio de evolução do processo,

a qualidade da amostra puncionada e o tipo de tratamento imunossupressor utilizado.

O principal fator que determina o padrão de evolução do infiltrado inflamatório intra-enxerto é o tipo de imunossupressão utilizado. Em pacientes que recebem prednisona e azatioprina, a inflamação é mais precoce e acompanhada de forte componente de células imunoativadas. Apesar do uso isolado da ciclosporina estar associado a infiltrados precoces e presença de linfócitos ativados, a sua associação com prednisona e azatioprina leva à redução na magnitude do infiltrado e na presença de sinais de imunoativação <sup>68</sup>.

#### **4.3.1. PAR e Imunoativação**

O aumento na intensidade do infiltrado intra-enxerto, caracterizado pela elevação do valor do ICT, quando acompanhado do aparecimento de células imunoativadas (linfoblastos, plasmócitos, linfócitos ativados ou monoblastos), correlaciona-se com o diagnóstico clínico ou histológico de rejeição aguda <sup>30, 61, 85, 110, 90</sup>. Assim, é necessário considerar, na avaliação do infiltrado pela PAR, não somente os valores do ICT como a presença de células imunoativadas.

No presente estudo, encontrou-se mais imunoativação intra-enxerto no grupo OKT3t na comparação com os demais

grupos em estudo. Entretanto, quando analisamos a frequência de PAR com imunoativação antes, durante ou após o uso de OKT3 para o tratamento de rejeição aguda, verificamos frequências significativamente menores de PAR com imunoativação durante e após o uso de OKT3. Por outro lado, 56% e 65% das PAR com imunoativação dos períodos durante e após OKT3, respectivamente, não estavam associadas à rejeição aguda. Estes dados sugerem que a maior frequência de imunoativação ocorreu antes do OKT3 e que foi decorrência de episódios de rejeição aguda mais severos. A utilização de OKT3 foi eficaz, reduzindo a imunoativação intra-enxerto, embora esta fosse detectada no final e após o uso de OKT3, na maioria das vezes, na ausência de rejeição aguda. Estes episódios de imunoativação sem rejeição serão discutidos mais adiante.

Em relação à análise dos grupos OKT3p e Controle, verificou-se que, comparados como um todo, não houve diferença significativa na frequência de PAR com imunoativação. No entanto, a comparação entre ambos nos períodos durante e após OKT3 revela uma frequência significativamente menor de imunoativação no grupo OKT3 profilático durante a administração do OKT3. Semelhante ao ocorrido no grupo OKT3 terapêutico, 61% dos episódios de imunoativação ocorridos durante e após o uso do OKT3 profilático não estavam associados à rejeição aguda, assim como 46% destes pacientes não desenvolveram rejeição aguda após a administração de OKT3 profilático. Estes dados

demonstram que o OKT3 evita ou retarda a imunoativação e a rejeição aguda quando usado profilaticamente e reduz a imunoativação e controla o processo de rejeição quando utilizado no tratamento de rejeições severas. Achados similares são relatados por Jorgensen e col. em estudo no qual acompanharam com PAR pacientes transplantados renais cujas rejeições agudas foram tratadas com OKT3 **127**. Estes autores verificaram uma redução do ICT durante a administração de OKT3 com uma tendência à elevação do mesmo, ainda durante a utilização de OKT3, com uma elevação máxima cerca de 10 a 15 dias após o OKT3. Estas alterações eram causadas, principalmente, pelo aumento do número de células imunoativadas. Como não ocorresse rejeição associada, estes autores especulam que o OKT3 é capaz de destruir os clones de células envolvidas no processo de rejeição dentro do enxerto e que outros clones de células imunoativadas, não direcionadas contra os antígenos do enxerto, aparecem no mesmo, talvez contribuindo para um estado de tolerância do receptor em relação ao enxerto. Estes episódios de infiltrado com sinais de imunoativação, ocorrendo 5 a 9 dias após o início de OKT3 para tratamento de rejeição aguda, em um momento em que a função renal está melhorando, também foram observados por Hansen e col. **101**. Não há uma explicação clara para este fenômeno. Hansen e col. sugerem que possam representar um reaparecimento de linfócitos T como consequência de modificações dinâmicas a partir de compartimentos localizados dentro do enxerto. Belitsky e

Gupta também observaram este fenômeno na sua série de pacientes que receberam OKT3 para tratamento de rejeição córtico-resistente e sugerem que a persistência de infiltrado com sinais de imunoativação pós-OKT3 significaria uma pobre resposta ao tratamento ou uma indicação de que estes pacientes rapidamente apresentarão outro episódio de rejeição aguda <sup>13</sup>.

#### **4.3.2. Incremento Corrigido Total**

Neste estudo, a avaliação da intensidade do infiltrado intra-enxerto foi realizada através do cálculo do incremento corrigido total nas PAR. Demonstrou-se que o ICT foi significativamente mais elevado no grupo OKT3t do que nos demais grupos. Semelhante ao ocorrido em relação à frequência de PAR com imunoativação, este aumento na magnitude do infiltrado, neste grupo, reflete a maior incidência e severidade das rejeições agudas presentes no mesmo. Quando compara-se os valores dos ICT, neste grupo, nos períodos pré, durante e após OKT3, observa-se uma diferença estatisticamente significativa entre eles, havendo uma redução significativa do ICT durante OKT3 quando comparado ao período após OKT3. Os dois estudos encontrados na literatura, que utilizam a PAR para analisar o infiltrado em pacientes submetidos a tratamento de rejeição aguda com OKT3, apresentam resultados similares aos deste trabalho,

mostrando uma redução significativa do ICT durante a administração de OKT3 **101, 127**.

A comparação entre os grupos OKT3p e Controle não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os valores dos ICT de todas as PAR representativas. Mesmo a comparação entre os valores de ICT, durante OKT3 e após OKT3, também não revelou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, embora tenha sido verificada uma tendência à redução do ICT no grupo OKT3p durante o uso de OKT3 ( $p=0,064$ ). Possivelmente a amostra em estudo não foi suficiente para evidenciar diferença estatisticamente significativa (poder do estudo nesse particular foi de 45%). Entretanto, a comparação entre os valores de ICT, durante e após o uso de OKT3 dentro do grupo OKT3p, demonstrou uma redução estatisticamente significativa durante a administração de OKT3 ( $p<0,001$ ). Estes dados sugerem que o OKT3, também quando usado profilaticamente, reduz a intensidade do infiltrado intra-enxerto durante a sua vigência.

A análise dos valores do ICT, nos diferentes grupos e períodos em estudo, concordam com aqueles observados na análise da frequência de PAR com imunoativação, sugerindo que o OKT3 é capaz de evitar ou reduzir a infiltração de células imunologicamente competentes e os danos por elas mediados. Esta observação está de acordo com aquelas referidas na literatura. Além dos dois estudos acima relacionados, que utilizaram PAR para estudar o infiltrado

em pacientes usando OKT3 **101, 127**, esta metodologia também foi empregada por Birkeland e col. com resultados semelhantes, ou seja, redução do ICT em vigência de OKT3 com elevação no final do tratamento (atribuída à infiltração do enxerto por linfócitos não relacionados com novo processo de rejeição) **17**. Outros estudos foram realizados para avaliar os efeitos do OKT3 sobre o infiltrado intra-enxerto, empregando a biópsia renal com análise histopatológica e imunopatológica **132, 28**. Nestes estudos a biópsia renal foi realizada 5 a 7 dias após o início de OKT3 para tratamento de rejeição ou profilaticamente, e também encontrou-se redução significativa do infiltrado durante a administração de OKT3.

#### **4.3.3. Expressão de Antígenos CD3 nos Linfócitos**

A análise dos linfócitos CD3+ pela técnica de imunoperoxidase indireta demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os percentuais de linfócitos CD3+ nas lâminas de sangue e de aspirado do enxerto em qualquer um dos grupos em estudo. A comparação entre os grupos OKT3p e Controle mostra uma redução significativa dos linfócitos CD3+, intra-enxerto e no sangue, no grupo OKT3p, até o 20<sup>o</sup> dia pós-transplante. Na comparação dos períodos, durante e após OKT3 entre os dois grupos, observa-se uma redução estatisticamente

significativa dos linfócitos CD3+ no grupo OKT3p, intra-enxerto e no sangue, tanto durante OKT3 ( $p < 0,001$ ) como após ( $p = 0,01$ ). Comparando-se os linfócitos CD3+ dentro do grupo OKT3p também observa-se uma redução significativa no período durante OKT3 em relação ao período após OKT3 ( $p < 0,001$ ). Assim, fica evidente que durante a administração de OKT3 profilático há uma redução na expressão de antígenos CD3 nos linfócitos, tanto intra-enxerto como no sangue periférico. Esta imunomodulação dos antígenos CD3 permanece significativa, embora não tão intensa, até alguns dias após a administração do OKT3.

No grupo OKT3 terapêutico, também encontrou-se redução significativa de linfócitos CD3+, tanto intra-enxerto como no sangue periférico, no período durante a administração de OKT3 em relação aos períodos pré e pós-OKT3. Os resultados do presente estudo sugerem que o OKT3, utilizado profilaticamente ou no tratamento da rejeição aguda, ocasiona uma imunomodulação dos antígenos CD3 nos linfócitos do sangue periférico e intra-enxerto.

Vários estudos têm sido realizados avaliando o comportamento de subpopulações linfocitárias no sangue durante a administração de OKT3. A maioria avalia a evolução dos linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+, ao longo do tratamento com OKT3, observando-se redução importante de todos os linfócitos imediatamente após o início do OKT3, com reaparecimento progressivo de linfócitos CD4+ ou CD8+ alguns dias após e de linfócitos CD3+ no final do tratamento <sup>44</sup>,



17, 102, 180. Análises de subpopulações linfocitárias no sangue periférico com citometria de fluxo têm permitido verificar que, durante a administração de OKT3, ocorre comodulação de outros antígenos além de CD3, como o receptor de células T <sup>82</sup>. Adicionalmente verificou-se uma redução na densidade da expressão de antígenos CD4 e CD8 na superfície dos linfócitos <sup>202</sup>. Outra observação interessante foi a detecção de linfócitos expressando antígenos CD3, porém com redução importante na densidade desta expressão <sup>112, 46</sup>. A presença destes linfócitos, fracamente CD3+, poderia estar implicada no desenvolvimento dos raros episódios de rejeição aguda durante a imunossupressão profilática com OKT3 <sup>46</sup>.

Os estudos que avaliam os efeitos do OKT3 sobre o infiltrado intra-enxerto são escassos e apresentam resultados controversos no que se refere à ação de modulação dos antígenos CD3 da superfície dos linfócitos. Kerr e Atkins estudaram 10 pacientes que receberam OKT3 por 10 dias para tratamento de rejeições agudas córtico-resistentes <sup>132, 133</sup>. Estes pacientes foram submetidos à punção biópsia renal antes e no quinto dia após o início do OKT3, com análise quantitativa do infiltrado e determinação da proporção entre linfócitos CD3+ e CD2+. Seus resultados não evidenciaram modulação de antígenos CD3 nos linfócitos intra-enxerto, pois não houve diferença estatisticamente significativa entre a relação de linfócitos CD3+/CD2+ intra-enxerto antes e durante a administração de OKT3. Por outro lado, Caillat-Zucman e col. estudaram 7 pacientes que receberam OKT3 por

10 a 30 dias, cinco para tratamento de rejeição aguda e dois em esquema profilático <sup>28, 29</sup>. Em três dos pacientes tratados para rejeição aguda, a biópsia renal foi realizada antes do início do OKT3 e a biópsia de acompanhamento foi realizada em todos os cinco pacientes no 7<sup>o</sup> dia de terapêutica com OKT3. Os dois pacientes que receberam OKT3 profilático foram biopsiados no 14<sup>o</sup> dia de OKT3 e 40 dias após a retirada do OKT3. Ao contrário dos resultados de Kerr e Atkins, neste estudo todas as biópsias realizadas em vigência de OKT3 mostraram imunomodulação de CD3 nos linfócitos, ou seja, os linfócitos intra-enxerto apresentavam os fenótipos CD3-CD4+ ou CD3-CD8+. Haak e col. relatam um caso de rejeição aguda de transplante renal no 9<sup>o</sup> dia de tratamento profilático com OKT3, documentado por biópsia renal <sup>91</sup>. O estudo imunocitoquímico desta biópsia mostrava que os linfócitos no interstício do enxerto apresentavam fraca positividade para CD3, enquanto os antígenos CD4 ou CD8 eram francamente evidentes. Não encontrou-se relato na literatura de estudos imunocitoquímicos com PAR para a avaliação dos efeitos do OKT3 sobre o infiltrado intra-enxerto, mas os resultados do presente trabalho em relação a este aspecto concordam com aqueles de Cailat-Zucman e de Haak, evidenciando uma imunomodulação dos antígenos CD3 nos linfócitos intra-enxerto. Caillat-Zucman sugere que a discrepância com os resultados obtidos por Kerr e Atkins pudesse ser explicada pelo tempo em que foi realizada a biópsia, pois no 5<sup>o</sup> dia de

OKT3 a concentração de OKT3 intra-enxerto seria insuficiente para induzir a total modulação dos antígenos CD3 <sup>28</sup>. Um outro aspecto que pode ter influência nesta discordância é o método de avaliação da expressão de CD3. Como no trabalho de Kerr e Atkins foi avaliada a relação entre linfócitos CD3+ e CD2+, esta pode ter sido afetada pela depleção do infiltrado intra-enxerto no momento da biópsia e não pela ausência de efeito imunomodulador sobre os linfócitos.

#### **4.4 Significado do Infiltrado Inflamatório Intra-Enxerto.**

A rejeição aguda é uma consequência da resposta imune ao aloenxerto e pode ser mediada através de imunidade celular e/ou humoral <sup>8</sup>. Usualmente predomina o componente celular mediante a ação de vários tipos de células inflamatórias, como os macrófagos, linfócitos T auxiliares (CD4+) e citotóxicos (CD8+) e plasmócitos, que envolvem-se em uma cascata de eventos, cujo objetivo final é a produção e expansão de células efetoras e anticorpos destinados a destruir o enxerto. A expressão histopatológica deste processo é o edema e a infiltração do interstício renal por estas células, particularmente em situação perivascular e peritubular. Assim, o diagnóstico de rejeição aguda celular é classicamente estabelecido pela detecção, através da biópsia renal, ou mais recentemente pela PAR, de infiltrado inflamatório intersticial. Entretanto, estudos

experimentais<sup>4</sup> e clínicos com biópsias seriadas **158** têm demonstrado que, freqüentemente, observa-se a presença de infiltrado intra-enxerto sem qualquer manifestação clínica de rejeição aguda. As tentativas de fenotipar mais especificamente o infiltrado têm mostrado o predomínio de linfócitos T CD4+ ou CD8+ e macrófagos na sua composição. Na rejeição primária, quando não houve exposição prévia ao aloantígeno, é fundamental a participação dos linfócitos CD4+ **72, 124, 155, 251**, enquanto na situação de rejeição secundária ocorre uma produção muito mais rápida de linfócitos CD8+, e estes podem ser gerados sem o auxílio dos linfócitos CD4+ **3, 156, 157**. Por outro lado, nem todos os linfócitos citotóxicos que infiltram os enxertos são especificamente direcionados contra estes aloantígenos, confirmando a existência de um componente inespecífico no infiltrado **211**. Estes aspectos dificultam, mesmo com a utilização de estudos imunocitoquímicos, a caracterização do infiltrado intra-enxerto e a sua relação com a rejeição aguda. Estudos que analisam a proporção entre linfócitos CD4+/CD8+ no infiltrado intra-enxerto não têm conseguido estabelecer um padrão que se correlacione com o diagnóstico de rejeição aguda **26, 48**. A tendência atual é identificar a rejeição pela presença de sinais de danos teciduais associados ao infiltrado, como tubulite ou endoteliolite (evidências de invasão tubular ou endotelial por linfócitos) **205**.

Entre os achados deste trabalho, um dos mais interessantes, que está de acordo com as observações relatadas na literatura <sup>101, 127, 13, 17</sup>, foi a presença de infiltrado inflamatório com sinais de imunoativação no final e após a administração de OKT3, sem evidências clínicas e laboratoriais de rejeição aguda na maioria dos casos. Esta questão é muito importante, pois a sua resolução pode contribuir decisivamente para o entendimento do mecanismo de ação do OKT3 e outros anticorpos monoclonais, além de remeter para uma controvérsia mais genérica, que é o significado a curto e longo prazo da presença de infiltrados inflamatórios dissociados da rejeição aguda. Belitsky e Gupta, pela análise da sua experiência, sugerem que os pacientes que persistem com infiltrado e imunoativação pós-OKT3 seriam aqueles que desenvolveriam novos episódios de rejeição aguda <sup>13</sup>. Os dados do presente trabalho mostram que a maioria dos pacientes nos quais foi detectado infiltrado com imunoativação no final e após o uso de OKT3 não desenvolveram rejeição aguda, assim como nas séries de Jorgensen <sup>127</sup>, Hansen <sup>101</sup> e Birkeland <sup>17</sup>. Entretanto, como alguns destes pacientes tiveram rejeições subseqüentes, é provável que estes infiltrados estejam eventualmente relacionados ao processo de rejeição. Permanece sem resposta conclusiva quais seriam as características do infiltrado que estão relacionadas à rejeição e, na ausência de rejeição, qual seria o significado do infiltrado. A presença de sinais de imunoativação não é suficiente para responder tais

questões, pois estudos experimentais de indução de tolerância têm mostrado que a aceitação do enxerto está associada com um infiltrado mononuclear, que inclui linfócitos T ativados <sup>180</sup>. Portanto, a presença de infiltrado com imunoativação não correlaciona-se necessariamente com o processo de rejeição e pode até, ao contrário, desempenhar funções imunossupressoras. Apesar de suas reconhecidas propriedades imunossupressoras, o OKT3, paradoxalmente, é capaz de induzir proliferação linfocitária e estimular a produção de linfocinas, sendo este efeito apontado como o responsável pelos efeitos colaterais que ocorrem após a administração das primeiras doses de OKT3. Ellenhorn e col.<sup>71</sup> comprovaram estes efeitos in vivo quando estudaram linfócitos de linfonodos removidos de transplantados renais após a administração de OKT3 e demonstraram que estes linfócitos apresentam OKT3 na sua superfície e que são ativados pelo OKT3, pois expressam receptor de interleucina 2. A partir destas informações, não seria absurdo especular que os infiltrados ora discutidos representem manifestações tardias dos efeitos ativadores do OKT3. A presença de infecção viral pode ser acompanhada na PAR de um intenso infiltrado inflamatório com sinais proeminentes de imunoativação e, mais especificamente, por linfócitos grandes granulares <sup>103</sup>. Nesta situação, outras manifestações clínicas sugerem o diagnóstico de infecção viral. No presente trabalho, um dos pacientes que recebeu OKT3 profilático teve infecção por citomegalovírus, com a

presença de intenso infiltrado com sinais de imunoativação. Resumindo, a presença de infiltrado intra-enxerto no final e após o uso de OKT3 poderia estar associado às seguintes situações: rejeição aguda persistente ou atenuada com evolução do processo para um novo episódio de rejeição, reinfilhação do enxerto por células não direcionadas contra os aloantígenos ou por células supressoras que contribuiriam no processo de aceitação do enxerto, infiltração do enxerto por células imunoativadas pelos efeitos do OKT3 sobre os linfócitos ou imunoativação secundária à infecção viral.

O reconhecimento de que a presença de infiltrado inflamatório nem sempre indica um episódio de rejeição aguda e pode até estar associado ao processo oposto de tolerância ao enxerto adiciona maiores dificuldades à interpretação dos exames histopatológicos e citológicos. Além da avaliação da magnitude do infiltrado, que é mais intenso durante a rejeição aguda, procura-se determinar quais as possíveis características que estariam associadas a pior prognóstico. Parfrey e col. em um estudo de 132 transplantados renais submetidos a biópsia renal para avaliação de disfunção renal, durante os primeiros 3 meses pós-transplante, buscaram detectar os achados histopatológicos que adicionassem informações sobre o prognóstico <sup>189</sup>. Seus resultados indicam que os dados morfológicos de pior prognóstico na rejeição aguda são: alterações glomerulares, hemorragia intersticial, proliferação endotelial e necrose tubular. Nesse estudo, a presença de infiltrado linfocitário

não teve influência sobre o prognóstico. Com objetivos semelhantes, Bohman e col. <sup>23</sup> estudaram 48 pacientes 12 a 158 meses pós-transplante por biópsia renal com análise histopatológica e imunohistoquímica e por punção aspirativa renal concomitante. Os achados foram comparados, dividindo os pacientes em 2 grupos: função renal excelente ou reduzida. Todos os pacientes com função renal excelente tinham quadros histopatológicos, imunohistoquímicos e citológicos normais, o mesmo ocorrendo na maioria dos pacientes com função renal reduzida. Entretanto, 5/36 pacientes com diminuição da função renal tinham infiltrado celular detectado pela PAR e imunohistoquímica, indicando a presença de um processo patológico clinicamente relevante. Serón e col. realizaram um estudo com biópsia renal em pacientes com enxertos renais com função estável, 6 semanas pós-transplante, com o objetivo de caracterizar o infiltrado intersticial <sup>201</sup>. Seus dados confirmam a presença de infiltrado intersticial na maioria dos pacientes, havendo uma correlação entre o número de células infiltrantes, particularmente células "naive" (CD45RA positivas), com a função renal 6 meses após o transplante. Estes achados suportam a idéia de que a presença de infiltrado inflamatório em pacientes com função estável possa representar uma forma de rejeição celular atenuada que tem efeitos deletérios sobre o enxerto em curto prazo de tempo. Permanecem controvérsias quanto à composição do infiltrado inflamatório na rejeição aguda. No entanto, estudos



imunohistológicos <sup>242</sup> e com punção aspirativa renal <sup>161</sup> sugerem que as células predominantes na rejeição aguda são os linfócitos e as células do sistema monocítico-macrofágico. A correta interpretação sobre o significado do infiltrado inflamatório depende do conhecimento a respeito dos mecanismos efetores da rejeição. Como nem todos os infiltrados em órgãos transplantados estão mediando dano tecidual e alguns podem estar envolvidos na indução de tolerância, é possível que análises detalhadas dos perfis de citocinas e de moléculas efetoras, como a granzima e a perforina, venham auxiliar na correta interpretação do infiltrado.

#### **4.5. Mecanismo de Ação do Anticorpo Monoclonal OKT3.**

Os anticorpos monoclonais podem atuar neutralizando toxinas, bloqueando a interação de fatores de crescimento, hormônios, moléculas de adesão intercelular ou vírus com os seus receptores celulares, e recobrando bactérias, vírus ou células, marcando-os para a destruição mediada por complemento, por fagocitose ou por citotoxicidade celular dependente de anticorpos <sup>197</sup>. A sua ação vai depender de determinadas características físico-químicas e farmacocinéticas. Assim, o tipo de antígeno reconhecido e o estado de ativação do sistema imunológico sob tratamento, juntamente com as características do anticorpo utilizado

(isotipo, afinidade de ligação e a estrutura - imunoglobulina integral ou fragmentos de locais de ligação com o antígeno), é que determinarão a capacidade de um dado anticorpo adequadamente opsonizar o alvo desejado e promover bloqueio, destruição ou modulação antigênica <sup>42</sup>. Por exemplo, anticorpos integrais de classe IgG têm peso molecular de aproximadamente 150 KDa e difundem-se do plasma para os tecidos muito lentamente em relação aos fragmentos de cerca de 25 KDa. Por outro lado, a fração Fc (fragmento cristalizável) e a classe do anticorpo (isotipo) são importantes caso o objetivo seja eliminar a fonte do antígeno alvejado pelo anticorpo. Anticorpos de classe IgG1 e IgG3 mediam citotoxicidade dependente de anticorpo e fixam complemento, enquanto que IgG2 e IgG4 são menos eficientes neste aspecto <sup>148</sup>. A seguir, de acordo com a literatura revisada e os resultados obtidos neste trabalho, serão discutidos os principais mecanismos pelos quais o anticorpo monoclonal OKT3 exerce a sua atividade terapêutica.

#### **4.5.1. Depleção de Linfócitos.**

O OKT3 é um anticorpo monoclonal IgG<sub>2a</sub> que reage contra um determinante antigênico da cadeia epsilon do complexo CD3, presente em todos os linfócitos T maduros. O complexo CD3 está intimamente ligado ao receptor das células T, embora não covalentemente, e desempenha importantes funções na transdução de sinais de ativação. Minutos após a

administração intravenosa de OKT3 ocorre depleção no sangue periférico dos linfócitos T <sup>52</sup>. A depleção celular ocorre principalmente por linfotoxicidade humoral, mediada por complemento ou por células K (citotoxicidade celular dependente de anticorpo) ou opsonização e fagocitose. As condições necessárias para que o OKT3 funcione como uma opsonina para promover a destruição dos linfócitos T na circulação dependem da sua capacidade em fixar complemento e interagir com receptores Fc que induzem à destruição pelo sistema monocítico-macrofágico. Este não parece ser o principal mecanismo linfocitotóxico do OKT3, pois ele é um anticorpo IgG<sub>2a</sub> que não fixa bem o complemento. Além disso, a depleção linfocitária não deve ser a única responsável pela ação terapêutica do OKT3, porque estudo recente demonstra que a utilização de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> não são depletoras, mas retém atividade imunossupressora <sup>249</sup>. A manutenção de ação imunossupressora, após o rápido reaparecimento de linfócitos T na circulação, alguns dias desde o início do OKT3, embora sem expressarem moléculas CD3 na sua superfície, reforça esta conclusão. De fato, a depleção linfocitária parece ser fugaz e o seu preciso mecanismo não é conhecido. Mais recentemente, foi verificado que, *in vitro*, o OKT3 pode induzir morte celular programada (apoptose) em células T humanas ativadas <sup>125</sup>. Este tipo de morte celular caracteriza-se morfológicamente pela redução de volume celular por ruptura do citoesqueleto e colapso do núcleo, com cromatina extremamente condensada e concentrada

em volta do envelope nuclear <sup>47</sup>. A apoptose ocorre com frequência na situação de renovação tecidual ou reposição de células senescentes. No sistema imune, parece produzir a deleção intra-tímica de células auto-reativas contribuindo para a auto tolerância <sup>206</sup>. Em estudo experimental, foi demonstrado que a administração de um anticorpo monoclonal anti-CD3, in vivo, foi capaz de induzir morte com características de apoptose em timócitos de camundongo <sup>204</sup>. Estas observações sugerem que o acoplamento do OKT3 com a molécula CD3 pode, via sinais de ativação, induzir apoptose de linfócitos ativados, contribuindo no efeito imunossupressor do OKT3, mais particularmente na rápida depleção linfocitária que segue o uso deste anticorpo monoclonal <sup>125</sup>.

Por outro lado, a análise do infiltrado intra-enxerto, durante o uso de OKT3, revela uma importante redução na sua intensidade. Esta observação é confirmada pelos resultados do presente trabalho, pois observou-se significativa redução do incremento corrigido total nas PAR realizadas durante a administração de OKT3, tanto profilático como terapêutico. Outros estudos histopatológicos <sup>132, 28, 133, 29</sup> ou com PAR <sup>101, 127, 17</sup> confirmam este achado. Uma evidência adicional da ação intra-enxerto é o aumento da creatinina sérica no início do tratamento com OKT3, que é atribuído a um efeito direto do mesmo sobre os linfócitos que infiltram o enxerto <sup>162</sup>. Embora o alto peso molecular do OKT3, que dificultaria a sua difusão para os tecidos, outras características como a

classe IgG, o estado inflamatório do enxerto e conseqüente aumento da permeabilidade vascular e as evidências de sua ação em linfonodos <sup>71</sup> sugerem que ele é capaz de penetrar nos tecidos, reforçando a hipótese de que um dos mecanismos de ação seria a depleção linfocitária intra-enxerto. Outro mecanismo proposto para explicar a destruição dos linfócitos T na circulação pelo OKT3 é a sua capacidade de estabelecer uma ponte entre diferentes células T (citólise por ligação cruzada entre células T dependente de anticorpo) <sup>246</sup>. Como o OKT3 é um anticorpo bivalente, teoricamente poderia estabelecer uma ligação cruzada com moléculas CD3 de dois linfócitos diferentes, induzindo à lise de um linfócito pelo outro. Esta hipótese teórica foi claramente demonstrada, in vitro, através da incubação de linfócitos T com anticorpos OKT3 integrais bivalentes CD3-CD3 ou CD3-CD4 e monovalentes CD3, bem como fragmentos Fab bivalentes ou monovalentes. Houve lise celular nos experimentos em que incubou-se linfócitos T com anticorpos bivalentes integrais ou fragmentos, indicando que a lise dos linfócitos T induzida pelo OKT3 pode ocorrer independente da fixação de complemento e de mediação de receptores Fc <sup>246</sup>. A eficácia deste mecanismo teórico depende de uma alta concentração de linfócitos T citolíticos e de apropriadas concentrações de OKT3. Estes fatores ocorrem particularmente na situação da rejeição aguda, onde há infiltrado linfocitário denso e maior probabilidade de difusão e aumento da concentração de OKT3 pelas características inflamatórias no enxerto.

Portanto, é possível que este mecanismo de lise linfocitária seja o principal responsável pela redução do infiltrado intra-enxerto observado durante a administração de OKT3.

Em resumo, o efeito de depleção linfocitária ocorre de maneira fugaz na circulação, mediado por linfotoxicidade humoral, opsonização e/ou apoptose e não parece ser importante na geração do efeito imunossupressor do OKT3. Este efeito possivelmente seja mais relevante no controle da rejeição via redução da população de linfócitos intra-enxerto, talvez mediado via citólise por ligação cruzada entre células T dependente do anticorpo OKT3.

#### **4.5.2. Bloqueio do Complexo CD3**

Um dos possíveis mecanismos imunossupressores do OKT3, quando liga-se ao complexo CD3, seria o bloqueio da transdução dos sinais de ativação. A ausência da expressão de moléculas CD3 na superfície dos linfócitos T, observada durante a administração de OKT3, poderia estar relacionada à ocupação destas moléculas pelo anticorpo OKT3, tornando as células T incapazes de reconhecer os aloantígenos, conforme sugerido por Carreno e col.<sup>35</sup>. Esta hipótese, no entanto, não foi confirmada, não havendo outros estudos que evidenciem a permanência de CD3 acoplado ao anticorpo OKT3 na superfície dos linfócitos. A explicação para a ausência deste fenômeno é que, diferente de outras moléculas como CD4

ou ICAM-I, que são moléculas de adesão, o complexo CD3 está envolvido na ativação. Por isto, quando ele é alvejado pelo OKT3 induz ativação e alterações nas funções dos linfócitos. A ativação linfocitária induzida pelo OKT3 está bem demonstrada, e é responsável pelos efeitos colaterais associados às primeiras doses. A ausência de linfócitos CD3+ durante o uso de OKT3 é conseqüência da imunomodulação do complexo CD3, que consiste na sua internalização ou desprendimento da membrana celular, conforme será discutido a seguir.

#### **4.5.3. Imunomodulação do Complexo CD3**

O fenômeno de imunomodulação do complexo CD3 é reconhecido como um dos principais mecanismos de ação do OKT3 <sup>9</sup>. Esta conclusão apóia-se no estudo das subpopulações linfocitárias do sangue periférico durante a administração de OKT3. As células com fenótipo CD3- e CD4+ ou CD8+ que reaparecem 2 a 5 dias após o início do OKT3 ocorrem devido ao desaparecimento específico e reversível da molécula CD3 da membrana linfocitária induzido pelo OKT3. Quando acontece o acoplamento entre o anticorpo OKT3 e a molécula CD3, os complexos antígeno-anticorpo (CD3-OKT3) movem-se lateralmente, formando malhas que agrupam-se e são internalizadas pelo linfócito ou despreendidas de sua membrana <sup>28</sup>. Como o receptor de células T (fundamental para

o reconhecimento de antígenos) está intimamente ligado ao complexo CD3, ocorre comodulação do mesmo, tornando os linfócitos desprovidos de CD3 e receptor de células T e, por este motivo, incapazes de responder a outros antígenos **196**. Os resultados do presente trabalho concordam com estas observações, pois encontrou-se redução estatisticamente significativa de linfócitos CD3+ na circulação durante o período de administração de OKT3, tanto profilático como terapêutico. Em estudo experimental, Hirsch e col. **120** avaliaram os efeitos de um anticorpo monoclonal anti-CD3, semelhante ao OKT3, administrado a camundongos timectomizados que receberam um aloenxerto de pele. Seus resultados indicam que o anticorpo utilizado teve atividade imunossupressora, pois prolongou a sobrevivência do enxerto em relação a animais controles não imunossuprimidos e que os efeitos iniciais seriam consequência de modulação do receptor de células T. Como o fenômeno de imunomodulação é reversível, ocorreu reexpressão de CD3 e receptor de células T após o uso de anticorpo, porém a imunocompetência só foi recuperada cerca de dois meses após o tratamento. Estudos com citometria de fluxo têm sugerido que, mesmo após o uso de OKT3, permanecem alterações na densidade da expressão de CD3 e de outras moléculas como CD4 e CD8 **202**. Estes resultados preliminares sugerem que outras alterações na função das células T, induzidas pelo OKT3, poderiam estar envolvidas em seu mecanismo imunossupressor.



Os estudos que avaliam os efeitos do OKT3 sobre o infiltrado intra-enxerto são importantes, já que permitem obter informações relacionadas às suas ações diretamente sobre o enxerto. Embora Kerr e Atkins **132, 133** não tenham observado imunomodulação de CD3 nos linfócitos in situ, os resultados do presente trabalho e outros estudos clínicos **28, 29, 91** relatados na literatura sugerem que a imunomodulação também ocorre intra-enxerto, possivelmente contribuindo para a ação imunossupressiva do OKT3.

Chauahan e col. **45** avaliaram os efeitos in situ, após o uso de OKT3 em 9 pacientes com estudo histopatológico e imunohistológico, antes e depois da administração de OKT3. Seus resultados indicam que não houve variação significativa da expressão de CD3 nos linfócitos intra-enxerto antes e após o OKT3. Não houve avaliação dos efeitos durante o OKT3, mas estes resultados concordam com os do presente trabalho, sugerindo que a imunomodulação intra-enxerto do complexo CD3 também é transitória. Adicionalmente, este trabalho não foi capaz de detectar receptores de células T e encontrou um aumento significativo na expressão de CD8 e CD45R nos linfócitos intra-enxerto, sugerindo que as alterações nas subpopulações linfocitárias dentro do enxerto possam representar uma seleção de certos clones de linfócitos T induzidos pelo OKT3.

Portanto, o efeito de imunomodulação do complexo CD3 parece ser um dos principais mecanismos de ação do OKT3, mas como é transitório e reversível, outros mecanismos, talvez desencadeados pela imunomodulação, parecem estar presentes.

#### 4.5.4. Outros Mecanismos de Ação

A ativação linfocitária com liberação de citocinas é responsável pelos efeitos colaterais observados nas primeiras doses de OKT3. Este fenômeno de ativação poderia estar relacionado à ação imunossupressora do OKT3, pois parece preceder a imunomodulação do complexo CD3. Adicionalmente, a ativação poderia induzir à proliferação de clones de linfócitos supressores <sup>142</sup>. Tais efeitos, no entanto, não parecem ser importantes, porque fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de OKT3, que não são capazes de induzir ativação, mantém atividade imunossupressora.

Diversos trabalhos clínicos e experimentais têm sugerido que um dos principais efeitos observados pós-OKT3 é a indução de diminuição da responsividade de linfócitos T através da seleção de determinadas subpopulações linfocitárias, como os linfócitos CD8-CD45R <sup>45</sup>, ou de alterações na densidade de moléculas da superfície dos linfócitos, como as moléculas CD3, CD4 e CD8 <sup>202</sup>. Assim, o OKT3 teria propriedades imunoregulatórias, alterando a função dos linfócitos. Em estudo recente, avaliou-se a

resposta de linfócitos obtidos por biópsias endomiocárdicas de transplantados cardíacos, submetidos à imunossupressão profilática com OKT3 ou globulina anti-linfocítica <sup>186</sup>. Os resultados mostram que ambas as preparações reduziram a resposta citolítica dos linfócitos que infiltravam o enxerto contra antígenos HLA de classe II, expressos no coração transplantado, com efeitos reduzidos em relação à citotoxicidade direcionada a antígenos de classe I. Estes achados sugerem uma ação imunoreguladora mais importante sobre linfócitos CD4+, alterando a especificidade da resposta imune. Hirsch e col., em seu modelo experimental de camundongos timectomizados imunossuprimidos com anticorpo monoclonal anti-CD3, avaliaram a relação entre a indução de hiporesponsividade de linfócitos T e a capacidade de produzir ativação linfocitária <sup>119</sup>. Para tal fim, estudaram os efeitos de anticorpos anti-CD3 integrais e de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> e observaram que ambos os anticorpos foram capazes de reduzir a secreção de IL-2 em resposta a estímulos in vitro, mediados pelo receptor de células T independente de efeitos ativadores iniciais. Outro achado interessante foi que o fragmento F(ab')<sub>2</sub> induziu hiporesponsividade apenas em células CD4+ com redução na expressão, a longo prazo, do receptor de células T apenas em linfócitos CD4+, enquanto o anticorpo integral afetou principalmente linfócitos CD8+ e reduziu a expressão de receptor de células T nas duas populações de linfócitos. Estes achados podem sugerir que os anticorpos ativadores, como o OKT3, levam a uma

hiporesponsividade de linfócitos CD8+, enquanto aqueles cujos sinais não resultam em ativação causam hiporesponsividade de linfócitos CD4+ e que alterações na estrutura e na função dos receptores de células T teriam um papel no desenvolvimento da hiporesponsividade.

Um dos problemas com a utilização clínica de anticorpos monoclonais produzidos em camundongos é a formação de anticorpos contra estas proteínas estranhas e seu possível efeito inativador. Por outro lado, é reconhecido que alguns destes anti-anticorpos podem ser anti-idiotípicos e poderiam desempenhar algum papel na continuidade da imunossupressão pós-OKT3. Alguns estudos têm sido realizados com o objetivo de investigar se os efeitos regulatórios da rede idiotipo-anti-idiotipo são favoráveis ou não à ação imunossupressora do OKT3 <sup>34, 250</sup>. Embora não encontre-se conclusão definitiva, esta hipótese é atraente e pode representar uma abordagem diferente no desenvolvimento de novos anticorpos monoclonais que resultem em uma produção endógena permanente de anticorpos.

Em trabalho recente, Nicolls e col. <sup>175</sup> descrevem os efeitos de um anticorpo monoclonal in vitro e in vivo com características sugestivas de um anticorpo anti-CD3. Seu comportamento in vitro foi semelhante ao OKT3, sendo capaz de bloquear a proliferação de células T induzida por aloantígenos em culturas de linfócitos, bem como produzir efeitos mitogênicos. Quando administrado em 10 ratos receptores de aloenxertos cardíacos, em 4 doses de 7 mg/Kg

intra-peritoneal, induziu sobrevida indefinida (> 100 dias) e ausência de rejeição em todos os animais. Os ratos que receberam enxertos de pele do mesmo doador, 100 dias após o transplante cardíaco, também tiveram sobrevida > 75 dias destes enxertos, enquanto aqueles que receberam enxertos de pele de outros doadores tiveram rejeição precoce dos mesmos. Estas observações sugerem que este anticorpo foi capaz de produzir tolerância específica, provavelmente por indução de anergia, uma vez que este anticorpo IgG3 não liga-se a receptores Fc de rato e, portanto, não é capaz de estimular mitogênese in vivo e a possível indução da proliferação de células supressoras.

Em resumo, existem evidências de que o OKT3 ou outros anticorpos monoclonais anti-CD3 podem determinar efeitos imunossupressores a longo prazo por mecanismos como estimulação da proliferação de linfócitos supressores, indução de alterações funcionais dos linfócitos T ou indução de tolerância por anergia.

## 5. CONCLUSÕES

5.1. Encontrou-se diminuição estatisticamente significativa na magnitude do infiltrado inflamatório intra-enxerto, avaliado pelo ICT e pela frequência de episódios de imunoativação nas punções aspirativas renais, durante os períodos de administração de OKT3, tanto profilático como terapêutico.

5.2. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os percentuais de linfócitos CD3+ nas lâminas de sangue periférico e de aspirados renais em qualquer dos grupos de pacientes em estudo.

5.3. Encontrou-se uma diminuição estatisticamente significativa nos percentuais de linfócitos CD3+, tanto no sangue periférico como nos aspirados renais, durante os períodos de administração de OKT3, dos grupos OKT3 profilático e OKT3 terapêutico, em relação aos demais períodos.

5.4. Os efeitos do anticorpo monoclonal OKT3 observados no presente trabalho sugerem que suas ações imunossupressoras são mediadas por depleção linfocitária periférica e intra-enxerto temporárias e imunomodulação do complexo CD3 na circulação e nos linfócitos intra-enxerto.

## 6. SUMMARY

The effects of the OKT3 monoclonal antibody in the intra-graft inflammatory infiltrate were evaluated in 3 groups of kidney transplant recipients: 17 patients who received OKT3 aimed to treat steroid-resistant acute rejection (OKT3t group), 16 patients who received OKT3 prophylactically as a sequential quadruple immunosuppression schedule (OKT3p group) and another 16 patients who did not receive OKT3 and were studied as a control group to the OKT3p. The intra-graft events were studied by fine-needle aspiration biopsy (FNAB) employing the total corrected increment method (TCI) and counts of immunoactivated cells. The expression of CD3 antigens on peripheral and intra-graft lymphocytes were analysed by a three-step immunoperoxidase technique in 6 patients of each group. The comparison between the OKT3p and Control groups showed a decrease of immunoactivated cells in the OKT3p group and the TCI was significantly reduced during the period of OKT3 administration when compared to the pos-OKT3 period in the OKT3p group. Similarly, it was observed a decrease of immunoactivated cells and TCI during OKT3 treatment as compared to the periods before and after OKT3 in the OKT3t group. There was no statistically significant difference in the expression of CD3 antigens on peripheral and intra-graft lymphocytes. However, it was observed a significant decrease of CD3+ lymphocytes during OKT3 administration, both on

peripheral blood and intra-graft, of OKT3p and OKT3t patients, as compared to the periods without OKT3. In conclusion, it was observed a decrease of the intra-graft inflammatory infiltrate with reduction of peripheral and intra-graft CD3+ lymphocytes, both in OKT3p and OKT3t groups, during the OKT3 administration, suggesting that the OKT3 monoclonal antibody immunosuppressive actions are mediated by temporary lymphocyte depletion followed by immunomodulation of CD3 antigens, both on peripheral and intra-graft lymphocytes.



## 7. RESUMO

Com o objetivo de avaliar os efeitos do OKT3 no infiltrado intra-enxerto estudou-se 3 grupos de pacientes transplantados renais: Grupo OKT3 Terapêutico (OKT3t), n=17; Grupo OKT3 Profilático (OKT3p), n=16 e um Grupo Controle (n=16) para o Grupo OKT3 Profilático, randomizado por ordem de entrada no estudo. A avaliação do infiltrado intra-enxerto foi realizada mediante a técnica de Punção Aspirativa Renal (PAR), com cálculo do ICT e contagem de células imunoativadas. Em seis pacientes de cada grupo, avaliou-se as porcentagens de linfócitos CD3 positivos do sangue e do aspirado renal, com técnica de imunoperoxidase indireta em 3 camadas. Encontrou-se uma frequência significativamente menor de episódios de imunoativação nas PAR do Grupo OKT3p, no período durante OKT3, em relação ao mesmo período no grupo Controle ( $p=0,009$ ). Houve também uma tendência para menores valores de ICT durante OKT3 em relação ao período correspondente do Grupo Controle, embora sem atingir significância estatística ( $p=0,064$ ). A comparação dentro do Grupo OKT3p mostrou valores significativamente menores de ICT durante OKT3 quando comparado ao período pós-OKT3 ( $p<0,001$ ). No Grupo OKT3t, observou-se uma redução significativa na frequência dos episódios de imunoativação durante a administração de OKT3, tanto em relação ao período pré-OKT3 ( $p=0,002$ ) como na comparação com o período pós-OKT3 ( $p=0,016$ ). A comparação

dos valores de ICT nos 3 períodos revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os mesmos ( $p=0,004$ ), observando-se redução significativa do ICT, no período durante OKT3, quando comparado ao período pós-OKT3.

A avaliação da expressão de antígenos CD3 não revelou diferença significativa entre as porcentagens de linfócitos CD3+ intra-enxerto e no sangue em qualquer um dos grupos. Houve uma redução significativa nas porcentagens de linfócitos CD3+ no grupo OKT3p, tanto intra-enxerto como no sangue, até o 20<sup>o</sup> dia pós-transplante, quando comparado ao grupo Controle. No grupo OKT3t, encontrou-se uma redução significativa nas porcentagens de linfócitos CD3+ intra-enxerto e no sangue, durante OKT3, quando comparado aos períodos pré-OKT3 ou pós-OKT3.

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que ocorre uma redução significativa na magnitude do infiltrado inflamatório intra-enxerto durante a administração de OKT3, tanto profilático como terapêutico, conforme demonstrado pela redução do ICT e dos episódios de imunoativação. Verificou-se também uma redução significativa dos linfócitos CD3+ intra-enxerto e no sangue durante o uso de OKT3, seja de forma profilática ou terapêutica. Os efeitos observados sugerem que o anticorpo monoclonal OKT3 exerce as suas ações imunossupressoras através de depleção linfocitária intra-enxerto e periférica temporárias e imunomodulação dos antígenos CD3 na circulação e nos linfócitos intra-enxerto.

## 8. ANEXOS

### 8.1. ANEXO 1. Protocolos de Imunossupressão.

#### 1. Primeiro mês:

##### A. DOADOR VIVO HLA IDENTICO:

###### a. Dias -2 e -1:

Prednisona 2 mg/kg (dose máxima 120 mg)

Azatioprina 2 mg/kg

###### b. Dia da cirurgia:

Metilprednisolona 250 mg no trans-operatório

Azatioprina 4 mg/kg - 6 horas antes da cirurgia

###### c. Pós-operatório:

Prednisona: Dia 1: 2 mg/kg (dose máxima 120 mg)

Dia 2: 1 mg/kg

Dia 3: 0,5 mg/kg até o 30<sup>o</sup> PO.

(Máximo: 30 mg/dia após o 15<sup>o</sup> PO).

Azatioprina: 2 mg/kg/dia

##### B. DOADOR VIVO HLA NÃO IDÓNTICO:

###### a. Dias -2 e -1:

Prednisona 2 mg/kg (dose máxima 120 mg)

Azatioprina 2 mg/kg

###### b. Dia da cirurgia:

Metilprednisolona 250 mg no trans-operatório

Azatioprina 4 mg/kg - 6 h. antes da cirurgia

Ciclosporina 8 mg/kg - 6 h. antes da cirurgia

###### c. Pós-operatório:

Prednisona: Iniciar com 2 mg/kg no 1<sup>o</sup> PO e diminuir 20 mg a cada 2 dias até 0,5 mg/kg/dia a serem mantidos até o 30<sup>o</sup> PO.

Azatioprina: 2 mg/kg/dia

Ciclosporina: 8 mg/kg/dia em dose fracionada, a cada 12horas, até o 14<sup>o</sup>PO, diminuir para 6mg/kg/dia (fracionados) no 15<sup>o</sup> PO. Se necessário ajustar de acordo com níveis

séricos. Atenção para possíveis interações medicamentosas.

d. Pacientes sem função renal:

Diminuir a dose de CyA para 6mg/kg/dia (fracionado). Monitorizar níveis séricos a partir do 5<sup>o</sup> PO. Suspender a CyA de acordo com critérios clínicos e/ou laboratoriais.

C. DOADOR CADAVERÍCO:

Grupo Controle

a. Dia da Cirurgia:

Metilprednisolona 500 mg no trans-operatório;  
Azatioprina 4,0 mg/kg - 4 a 6 h. antes da cirurgia;  
Ciclosporina 8,0 mg/kg - 4 a 6 h. antes da cirurgia;

b. Pós-operatório:

Igual ao do doador vivo HLA não idêntico.

Grupo OKT3 Profilático

a. Dia da Cirurgia:

Metilprednisolona 500 mg no trans-operatório;  
Azatioprina 4,0 mg/kg - 4 a 6 h. antes da cirurgia;  
Orthoclone OKT3:5 mg EV em bolo no trans-operatório,  
1 hora após a administração da metilprednisolona.

b. Pós-operatório:

Azatioprina 1,0 mg/kg/dia

Corticosteróide: Dia 1: 250 mg de metilprednisolona EV  
1 hora antes da administração do OKT3. A partir  
do 2<sup>o</sup> PO, inicia-se com Prednisona 0,5 mg/kg/dia  
até o fim do 1<sup>o</sup> mes.

Orthoclone - OKT3: 5 mg EV em bolo, mantido por no  
mínimo 3 dias e no máximo por 14 dias. Quando  
o paciente estiver com creatinina sérica  
menor ou igual a 2,5 mg% são feitos 2 dias de  
sobreposição com ciclosporina (6 mg/kg/dia em dose  
fracionada) e suspende-se o OKT3. Se ao cabo  
de 14 dias de administração de OKT3, o paciente  
não atingir uma creatinina sérica menor ou igual  
a 2,5 mg%, deve ser mantido com terapia

convencional (prednisona + azatioprina) acrescida ou não de doses baixas de CyA(3 a 4 mg/kg/dia fracionados), com controle dos níveis séricos.

Ciclosporina: Inicia com 6,0 mg/kg/dia em doses fracionadas quando a creatinina sérica for menor ou igual a 2,5 mg%.

#### D. TRATAMENTO DAS CRISES DE REJEIÇÃO:

##### a. Primeira crise de rejeição:

Metilprednisolona 7 mg/kg por 3 dias. Após iniciar com prednisona 2 mg/kg/dia (máximo 120 mg) e diminuir 20 mg a cada 2 dias até 0,5 mg/kg/dia. A segunda crise pode ser tratada da mesma maneira desde que a primeira não tenha sido córtico-resistente ou córtico-dependente.

##### b. Rejeição córtico-resistente:

Deve ser tratada com ORTHOCLONE - OKT3, 5 mg endovenoso em bolo por dia, de 10 a 14 dias.

Usar como medicação concomitante:

-Metilprednisolona 250 mg IV nos dois primeiros dias de tratamento, precedendo por 1 hora a administração do OKT3

-Prednisona 0,5 mg/kg/dia durante o resto do período de administração do OKT3;

-Acetaminofen 500 mg 30 minutos antes do OKT3;

-Difenidramida 1 cp 30 minutos antes do OKT3.

c. Precauções adicionais na administração do OKT3: Não administrar o OKT3 se o paciente estiver 3% acima do peso da semana anterior. Neste caso diuréticos e/ou diálise devem ser empregados. O Rx de tórax pré-medicação não deve ter sinais de congestão circulatória. As três primeiras doses do OKT3 devem ser administradas na presença de um médico. Material para tratamento de edema pulmonar agudo e anafilaxia, assim como material para entubação traqueal deve estar disponível rapidamente. O médico deve permanecer junto ao paciente por no mínimo 60 minutos. Suspender ou diminuir a dose da CyA pela metade da dose anterior, voltar a dose de manutenção 2 a 3 dias antes do término da terapia com o

anticorpo monoclonal. Manter a Azatioprina em 1,0 mg/kg/dia e a Prednisona em 0,5 mg/kg/dia.

2. Do segundo ao décimo-segundo mês:

A diminuição da imunossupressão deverá seguir as linhas gerais abaixo, no entanto, eventos imunológicos ou infecciosos podem alterar substancialmente a estratégia imunossupressiva.

A. DOADOR VIVO HLA IDÓNTICO:

Prednisona: Dosagem inicial de 0,5 mg/kg no primeiro mês pós-transplante (máximo 30 mg/dia a partir do 15<sup>o</sup> PO), com diminuição progressiva até 0,2 mg/kg/dia ao fim do 4<sup>o</sup> mês. Esta dose deve ser mantida até o 9<sup>o</sup> mes quando será diminuída para 0,15 mg/kg/dia e mantida até o fim do primeiro ano pós-transplante.

Azatioprina: Dosagem inicial de 2,0 mg/kg/dia. Diminuir para 1,5 mg/kg/dia no segundo e terceiro meses pós-transplante e então para 1,0 mg/kg/dia até o término do primeiro ano.

B. DOADOR VIVO HLA NÃO IDÓNTICO E CADAVERÍCO:

Prednisona: Primeiro mês 0,5 mg/kg/dia, após reduzir para 0,4 mg/kg/dia no segundo mês, 0,3 mg/kg/dia no 3<sup>o</sup> mês e 0,2 mg/kg/dia do 4<sup>o</sup> ao 9<sup>o</sup> mês, após a dose poderá ser reduzida para 0,15 mg/kg/dia.

Azatioprina: Diminuir para 1,5 mg/kg/dia no 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> meses, 1,0 mg/kg/dia a partir de então e até o fim do 1<sup>o</sup> ano quando a dose poderá ser diminuída até 0,5 mg/kg/dia ou aumentada novamente para 2,0 mg/kg/dia caso se decida retirar a CyA da estratégia imunossupressiva. Os ajustes da dose de Azatioprina deverão levar em conta os efeitos colaterais da droga (leucopenia, anemia megaloblástica, trombocitopenia) e o uso eventual de medicação concomitante.

Ciclosporina: Diminuir a dosagem para 5 mg/kg/dia no 2<sup>o</sup> mês para 4 mg/kg/dia até o fim do 6<sup>o</sup> mês. Após a dosagem poderá ser diminuída para uma manutenção de 3 a 4 mg/kg/dia de acordo com a função renal e os eventos clínicos

intercorrentes. OBS. Após o 3<sup>o</sup> mes, ou decorridos 3 meses do último episódio de rejeição, deverá ser administrada em dose única diária.

3. Após o primeiro ano:

Neste momento a imunossupressão deverá estar grandemente reduzida. Na maior parte dos pacientes isto ocorre de uma maneira individualizada levando-se em conta: (1) os eventos imunológicos, infecciosos e nefrotóxicos que tenham ocorrido no período precedente; (2) os diferentes efeitos colaterais das drogas utilizadas determinando dosagens muito baixas e até mesmo suspensão de uma ou mais drogas eventualmente.

## **8.2. ANEXO 2. Processamento do Aspirado Renal e de Sangue Periférico. Avaliação Citológica.**

1. Processamento do material aspirado e diluído em RPMI\* por citocentrifugação (Citoentrífuga Incibrás, Brasil), 500 rotações por minuto, durante 7 minutos;
2. Secagem dos citoesfregaços resultantes ao ar;
3. Fixação de 2 lâminas de aspirado renal e 2 de sangue periférico em metanol por 10 minutos;
4. Coloração por May-Grünwald-Giemsa;
5. Diafanização com Xilol;
6. Montagem entre lâmina e lamínula com meio de montagem (Entelan).

\* RPMI adicionado de 25 U de heparina/ml, Hapes 1M 1 ml e albumina bovina 30% 10 ml.



### 8.3. ANEXO 3. Processamento do Aspirado Renal e de Sangue Periférico. Imunoperoxidase.

#### A. Coleta, preparo e armazenamento do material.

1. Processamento do material aspirado e diluído em RPMI por citocentrifugação (Citoentrífuga Incibrás, Brasil) 500 rotações por minuto durante 7 minutos;
2. Secagem dos citoesfregaços resultantes ao ar;
3. Fixação de 6 lâminas de aspirado renal e 6 de sangue periférico com acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante 15 minutos, e estocagem em "freezer" a  $-40^{\circ}\text{C}$  para posterior processamento.

#### B. Técnica de Imunoperoxidase.

1. Hidratação das lâminas em solução de lavagem (solução B) por 5 minutos;
2. Bloqueio da peroxidase endógena com  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3% -  $\text{NaN}_3$  0,1% em solução de lavagem por 15 minutos;
3. Anticorpo monoclonal anti-CD3 humano produzido em camundongo: (anti-CD3):
  - Diluir anticorpo (1:30) em solução B contendo 1% de albumina bovina 30%;
  - Colocar 50 a 100  $\mu\text{l}$  sobre as lâminas em câmara úmida por 30 minutos;
  - Lavar 2 vezes, por 10 minutos, na solução B;
4. Imunoglobulina anti-camundongo, desenvolvida em coelho, conjugada à peroxidase:
  - Diluir anticorpo (1:50) em solução B : soro humano normal (3:1);
  - Colocar 50 a 100  $\mu\text{l}$  sobre as lâminas em câmara úmida por 30 minutos;
  - Lavar duas vezes, por 10 minutos, na solução B;
5. Imunoglobulina anti-coelho, desenvolvida em cabra, conjugada à peroxidase:
  - Diluir anticorpo (1:50) em solução B : soro humano normal (3:1);
  - Colocar 50 a 100  $\mu\text{l}$  sobre as lâminas em câmara úmida por 30 minutos;

- Lavar duas vezes, por 10 minutos, na solução B;
- 6. AEC (ácido 3-amino, 9-etilcarbazol):
  - Adicionar 7 ul de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30% à alíquota de 1,5 ml;
  - Colocar 50 a 100 ul sobre as lâminas em câmara úmida por 30 minutos;
  - Lavar duas vezes por 10 minutos na solução B;
- 7. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 5 minutos:
  - Lavar em água corrente por 2 minutos;
  - Montar entre lâmina e lamínula com Glicerol-Gelatina.

#### C. Reativos para a Imunoperoxidase

Solução Estoque (Solução A)		Solução de Lavagem (B)	
Tris	6,0 g	Solução A	1 vol.
NaCl	5,8 g	NaCl 0,9%	4 vol.
H <sub>2</sub> O Destilada	1,0 l	Ajustar pH	7,4 - 7,6

#### AEC

Acido Acético 0,2 M      14,8 ml      Completar até 100 ml  
 Acetato de Sódio 0,2 M   35,2 ml      com H<sub>2</sub>O destilada  
 Ajustar o pH a 5,0

Dissolver 40 mg de AEC em 12 ml de N,N - Dimetilformamid.

Misturar as duas soluções e alíquotar em 1,5 ou 3,0 ml e guardar em freezer a - 20°C

**8.4. ANEXO 4. Punção Aspirativa Renal. Exemplo do Protocolo de Interpretação da Análise Citológica.**

Paciente Nº \_\_\_\_\_ Punção Nº \_\_\_\_\_

RESULTADOS (MGG):

	PAR	SANGUE	INCREM	FC	IC
1 <u>Linfoblastos</u>	1		1	1.0	1,0
0 <u>Plasmablastos</u>				1.0	
0 <u>Linfócitos Ativados</u>	1		1	0.5	0,5
<u>LGG (LGL)</u>				0.2	
<u>Linfócitos (outros)</u>	35	10	25	0.1	2,5
PMN <u>F. Juvenis</u>	3	4			
<u>Neutrófilos</u>	49	77			
<u>Basófilos</u>					
<u>Eosinófilos</u>	4	5			
<u>Monoblastos</u>				1.0	
<u>Monócitos</u>	7	4	3	0.2	0,6
<u>Macrófagos</u>				1.0	
<u>Outros</u>				0.0	
					ICT 4,6
Células <u>Endoteliais</u> 14					Escore Morfológico <u>EC 0-1</u>
Teciduais <u>Tubulares</u> 18					<u>TC 0-1</u>
<u>Outras</u>					

FC=Fator de correção, IC=Incremento Corrigido

COMENTARIOS: Punção representativa com células parenquimatosas bem preservadas. Presença de infiltrado linfo-monocitário moderado com sinais definidos de imunoativação. Os achados são sugestivos de rejeição aguda.

**8.5. ANEXO 5. Protocolo de Leitura das Imunoperoxidasas.**

Paciente # \_\_\_\_\_ Lâmina # \_\_\_\_\_

n (%) de células	Sangue		Rim	
	CD3+	CD3-	CD3+	CD3-
Linfócitos	_____	_____	_____	_____

**8.6. ANEXO 6. Banco de Dados. Características dos Pacientes**

Nome:

Idade:

Sexo: M/F

Grupo: C/P/T

OKT3 Profilático: S/N

Tempo OKT3:

Diálise Pós-transplante: S/N

Tempo em Diálise:

Nº de Transfusões de Sangue Pré-Tx:

Tempo de Isquemia fria:

Tempo de Isquemia Quente:

Nº de Rejeições Agudas em Um Ano:

Tempo Para 1ª Rejeição:

OKT3 Terapêutico: S/N

Resposta ao OKT3 Terapêutico: S/N

Tempo de OKT3 Terapêutico:

Creatinina Sérica em Um Ano:

Óbito: S/N

Retorno a Diálise: S/N

Sobrevida do Rim em Um Ano: S/N

Sobrevida do Paciente em Um Ano: S/N

Doador: CAD/Vivo Relacionado 1 Haplo/Vivo Relacionado

Idêntico/Vivo Não Relacionado

Imunossupressão: Tríplice/Quádrupla com OKT3/Aza+Pred

**8.7. ANEXO 7. Banco de Dados. Parâmetros das PAR**

Nome do Paciente:

Grupo: Controle/Profilático/Terapêutico

Dia Pós-Transplante:

ICT:

ICT2:

Coefficiente de Variação:

Linfócitos CD3+ Intra-enxerto:

Linfócitos CD3+ no Sangue:

Imunoativação: S/N

Rejeição: S/N

Infecção por Citomegalovírus: S/N

Periodo: OKT3p Durante/OKT3p Pós

Controle Durante/Controle Pós

OKT3t Pré/OKT3t Durante/OKT3t Pós

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACKERMANN, J. R.; LEFOR, W. M.; KAHANA, L. et alii.: Prophylactic use of OKT3 in renal transplantation part of a prospective randomized multicenter trial. **Transplant Proc** 20 (Suppl. 1):242-244, 1988.
2. ALEGRE, M.L.; GASTALDELLO, K.; ABRAMOWICZ, D. et alii.: Evidence that pentoxifylline reduces anti-CD3 monoclonal antibody-induced cytokine release syndrome. **Transplantation** 52:674-679, 1991.
3. ANDERSON, L.C.; HAYRY, P.: Clonal isolation of alloantigen-reactive T cells and characterization of their memory functions. **Transplant Rev** 25:211-262, 1975.
4. ARMSTRONG, H.E.; BOLTON, E.M.; MCMILLAN, I. et alii.: Prolonged survival of actively enhanced rat renal allografts despite accelerated cellular infiltration and rapid induction of both class I and class II MHC antigens. **J Exp Med** 164:891-907, 1987.
5. ARNDT, R.; WEISS, M.; HAMMERER, P. et alii.: Expression of immunoregulatory molecules on tubular cells and lymphocytes in fine-needle aspiration biopsy: early diagnostic marker for renal allograft rejection. **Transplant Proc** 20:614-616, 1988.
6. ARNDT, R.; HEINZER, H.; HAMMERER, P. et alii.: Identification of virus DNA in kidney transplants by fine needle aspiration biopsy. **Transplant Proc** 20:581 - 583, 1988.
7. ASCHER, N.L.; SIMMONS, R.L.: Immunobiology of transplant rejection. In: CERILLI G.J.: **Organ Transplantation and replacement**. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1988. p 67-82.
8. BACH, F.H.; SACHS, D.H.: Current Concepts: Immunology. Transplantation Immunology. **New Engl J Med** 317:489 - 492, 1987.
9. BACH, J.F.; CHATENOUD, L.: Immunological monitoring of orthoclone OKT3 treated patients: the problem of antimonoclonal immune response. **Transplant Proc** 19-2 (Suppl 1):17-20, 1987.
10. BANDER, N.H.: Monoclonal antibodies: state of the art. **J Urol** 137:603-612, 1987.
11. BARBER, W.H.; MANKIN, D.A.; LASKOW, M.H. et alii.: Long-term results of a controlled prospective study with

- transfusion of donor-specific bone marrow in 57 cadaveric renal allograft recipients. **Transplantation** 51:70-76, 1991.
12. BELITSKY, P.: Practical and technical aspects of fine-needle aspiration cytology. **Transplant Proc** 20:699, 1988.
  13. BELITSKY, P.; GUPTA, R.: Fine Needle Aspiration Biopsy. in: BURDICK, J.F.; RACUSEN, L.C.; SOLEZ, K., WILLIAMS, G.M.: **Kidney transplant rejection**. Marcel Dekker Inc., New York, 2<sup>nd</sup> ed., 1992, p. 419-436.
  14. BERKE, G.: The cytolytic T lymphocyte and its mode of action. **Immunol Lett** 20:169-178, 1989.
  15. BENSON, A.; ZIEGLER, H.K.: Macrophages as targets for inhibition by cyclosporine. **Transplantation** 47:696 - 703, 1989.
  16. BENSUSSAN, A.; ACUTO, O.; HUSSEY, R.E. et alii.: T3-Ti receptor triggering of T8+ suppressors cells leads to unresponsiveness to interleukin-2. **Nature** 311:565-567, 1984.
  17. BIRKELAND, S.A.; SVENDSEN, V.; ROHR, N. et alii.: Use of monoclonal antibodies to T cells (OKT3) for treatment of acute cellular rejection after renal transplantation. **Transplant Proc** 20:451-454, 1988.
  18. BIRKELAND, S.A.; BACH, J.F.; CHATENOU, L. et alii.: First and second course of OKT3 monoclonal anti-T cell antibody for treatment of renal allograft rejection followed by testing for anti-OKT3 IgM and/or IgG immunization. **Transplant Proc** 22:221-222, 1990.
  19. BISHOP, G.A.; HALL, B.M.: Effects of immunosuppressive drugs on functions of activated T lymphocytes. **Transplantation** 45:967-972, 1988.
  20. BISHOP, G.A.; WAUGH, J.; HORVATH, J.S. et alii.: Diagnosis of renal allograft rejection by analysis of fine-needle aspiration biopsy specimens with immunostains and simple cytology. **Lancet** 2:647-650, 1986
  21. BISHOP, G.A.; HALL, B.M.; SURANYI, M.G. et alii.: Expression of HLA antigens on renal tubular cells in culture. I. Evidence that mixed lymphocyte culture supernatants and gamma interferon increase both class I and Class II HLA antigens. **Transplantation** 42:671-679, 1986.



22. BISHOP, G.A.; HALL, B.M.: Expression of leucocyte and lymphocyte adhesion molecules in the normal and transplanted kidney. **Kidney Int** 36:1078-1085, 1989.
23. BOHMAN, S.O.; WILCZEK, H.E.; REINHOLT, F.P. et alii.: Immunopathological patterns in long-term renal allografts. **Transplantation** 51:610-613, 1991.
24. BONNEVILLE, M.; CARCAGNE, J.; VIE, H. et alii.: Polyclonal rabbit gamma globulins against a human cytotoxic CD4+ T cellclone. I. Clone characteristics and antibrast globulin preparation. **Transplantation** 48:253-260, 1989.
25. BRINKER, K.R.; DICKERMAN, R.M.; GONWA, T.A. et alii.: A randomized trial comparing double-drug and triple-drug therapy in primary cadaveric renal transplants. **Transplantation** 40:43-50, 1990.
26. BURDICK, J.F.; BESCHORNER, W.E.; SMITH, W.J. et alii.: Characteristics of early routine renal allograft biopsies. **Transplantation** 38:679-684, 1984.
27. BURKE III, G.W.; VERCELLOTTI, G.M.; SIMMONS, R.L. et alii.: Reversible pancytopenia following OKT3. **Transplantation** 48:403-408, 1989.
28. CAILLAT-ZUCMAN, S.; BLUMENFELD, N.; LEGENDRE, C. et alii.: The OKT3 immunosuppressive effect: in situ antigenic modulation of human graft-infiltrating T cells. **Transplantation** 49:156-160, 1990.
29. CAILLAT-ZUCMAN, S.; LEGENDRE, C.; NOEL, L.H. et alii.: In situ antigenic modulation of human graft-infiltrating T cells is induced by OKT3 treatment. **Transplant Proc** 22:1782, 1990.
30. CAMPOS, H.; DROZ, D.; DEBURE, A. et alii.: Fine-needle aspiration biopsy in the monitoring of rejection episodes in kidney transplant recipients. **Transplant Proc** 17:2581-2582, 1985.
31. CAMPBELL, J.; BENEDIKTSSON, R.; GUPTA, R.; BELITSKY, P.: Analysis of the increment calculation in renal transplant aspiration biopsies. **Transplant Proc** 20: 692-693, 1988.
32. CANADIAN MULTICENTRE TRANSPLANT STUDY GROUP. A randomized clinical trial of cyclosporine in cadaveric renal transplantation: analysis at three years. **New Engl J Med** 314:1219-1225, 1986.
33. CANTAROVICH, D.; LE MAUFF, B.; HOURMANT, M. et alii.: Anti-interleukin 2 receptor monoclonal antibody in the

- treatment of ongoing acute rejection episodes of human kidney graft - a pilot study . **Transplantation** 46:454 - 457, 1989.
34. CARRENO, M.; YANG, W.C.; ESQUENAZI, V. et alii.: Further studies on human and murine idiotypic networks generated by OKT3. **VI International Workshop on Transplant Aspirative Cytology**, Oxford, 1991.
  35. CARRENO, M.; MILLER, J.; ESQUENAZI, V. et alii.: Are OKT3 binding sites on T cells modulated or merely converted (blindfolded) by OKT3 during therapy? **Transplant Proc** 21:987-988, 1989.
  36. CARRIER, M.; JENICEK, M.; PELLETIER, L.C.: Value of monoclonal antibody OKT3 in solid organ transplantation: a meta-analysis. **Transplant Proc** 24: 2586-2591, 1992.
  37. CARTER, N.P.; BEWICK, A.L.; BOLTON, E.M. et alii.: Flow cytometric analysis of fine needles aspiration biopsies of human renal allografts. In: KREIS, H., DROZ, D. (eds) **Renal Transplant Cytology** (Proc. 2<sup>nd</sup> Intern Workshop). Wichtig Editore, Milan, 1984:44-55.
  38. CASTRO, M.C.R.; MOURA, L.A.R.; RAMOS, O.L.; SABBAGA, E.: Citologia aspirativa no transplante renal: resultados da primeira experiência brasileira. **J Bras Nefrol** 11: 12-16, 1989.
  39. CHARMAINE, J.S.; WILSON, J.D.; CEREDIG, R.: Antibody-induced rejection of pig proislet xenografts in CD4<sup>+</sup> T cell-depleted diabetic mice. **Transplantation** 50:657 - 662, 1990.
  40. CHARPENTIER, B.; HIESSE, C.; LANTZ, O. et alii.: Evidence that antihuman tumor necrosis factor monoclonal antibody prevents OKT3-induced acute syndrome. **Transplantation** 54:997-1002, 1992.
  41. CHATENAUD, L.; FERRAN, C.; LEGENDRE, C. et alii.: In vivo cell activation following OKT3 administration - systemic cytokine release and modulation by corticosteroids. **Transplantation** 49:697-702, 1990.
  42. CHATENAUD, L.: Therapeutic use of the OKT3 anti-T cell monoclonal antibody: mode of action and side effects. **Transplant Proc** 20:79-83, 1988.
  43. CHATENAUD, L.; BAUDRIHAYE, M.F.; CHKOFF, N. et alii.: Restriction of the in vivo immune response against the mouse monoclonal antibody OKT3. **J Immunol** 137:830-838, 1986.

44. CHATENOUD, L.; BAUDRIHAYE, M.F.; KREIS, H. et alii.: Human in vivo antigenic modulation induced by the anti-T cell OKT3 monoclonal antibody. **Eur J Immunol** 12:979-982, 1982.
45. CHAUHAN, B.; MOHANAKUMAR, T.; FLYE, W.: Immunohistological analysis of T lymphocyte subpopulations in needle core biopsies from OKT3-treated renal allograft recipients. **Transplantation** 50:1058-1060, 1990.
46. CINTI, P.; BACHETONI, A.; PRETAGOSTINI, R. et alii.: Flow cytometric monitoring during OKT3 prophylaxis in kidney transplant recipients. **VI International Workshop on Transplant Aspirative Cytology**, Oxford, 1991.
47. COHEN, J.J.; DUKE, R.C.: Apoptosis and programmed cell death in immunity. **Annu Rev Immunol** 10:267-293, 1992.
48. COLVIN, R.B.: Clinical applications of monoclonal antibodies in renal allograft biopsies. **Am J Kidney Dis** 11:126-130, 1988.
49. COSIMI, A.B.: The future of monoclonal antibody immunosuppression in solid organ transplantation. **Transplantation Science** 2:28-34, 1992.
50. COSIMI, A.B.: Antilymphocyte globulin - a final(?) look. In: MORRIS, P.J.; TILNEY, N.L.: **Progress in Transplantation**, Churchill Livingstone Inc. Londres, 1985:167-188.
51. COSIMI, A.B.: The clinical value of antilymphocyte antibodies. **Transplant Proc** 13:462-468, 1981.
52. COSIMI, A.B.; COLVIN, R.B.; BURTON, R.C. et alii.: Use of monoclonal antibodies to T-cell subsets for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts. **New Engl J Med** 305:308-314, 1981.
53. COSIMI, A.B.; BURTON, R.C.; COLVIN, R.B. et alii.: Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. **Transplantation** 32:535-539, 1981.
54. D'ALLESSANDRO, A.M.; PIRSCH, J.D.; STRATTA, R.J. et alii.: OKT3 salvage therapy in a quadruple immunosuppressive protocol in cadaveric renal transplantation. **Transplantation** 47:297-300, 1989.
55. DALLMAN, M.J.; MORRIS, P.J.: The immunology of rejection. In: MORRIS, P.J. (ed) **Kidney Transplantation**. Philadelphia, W.B. Saunders, 1988, p 15-36.

56. DALLMAN, M.J.; ROAKE, J.; HUGHES, D. et alii.: Sequential analysis of IL-2 gene transcription in renal transplants. **Transplantation** 53:683-685, 1992.
57. DANTAS, M.; COSTA, R.S.; FERRAZ, A.S.: Monitorização do aloenxerto renal através da biópsia aspirativa por agulha fina: Relato de 218 punções realizadas na UTR do HCFMRP-USP. **Livro de Resumo do XVI Congresso Brasileiro de Nefrologia**. 1992. p 43.
58. DEAN, A.G.; DEAN, J.A.; BURTON, A.H.; DICKER, R.C.: **Epi Info, Version 5: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers**. USD, Inc, Stone Mountain. Georgia, 1990.
59. DEIERHOI, M.H.; BARBER, W.H.; CURTIS, J.J. et alii.: A comparison of OKT3 monoclonal antibody and corticosteroids in the treatment of acute renal allograft rejection. **Am J Kidney Dis** 21:86-89, 1988.
60. DELANEY, V.B.; CAMPBELL JR., W.G.; NASR, S.A. et alii.: Efficacy of OKT3 monoclonal antibody therapy in steroid-resistant, predominantly vascular acute rejection. **Transplantation** 45:743-748, 1988.
61. DENDORFER, U.; HAMMER, C.; SCHLEIBNER, S. et alii.: Comparison of renal transplant cytology with histological findings. **Transplant Proc** 17:2583-2584, 1985.
62. DENNING, D.W.; WEISS, L.M.; MARTINEZ, K.; FLECHNER, S.M.: Transmission of Epstein-Barr virus by a transplanted kidney, with activation by OKT3 antibody. **Transplantation** 48:141-144, 1989.
63. DENNIS, M.J.S.; FOSTER, M.C.; RYAN, J.J. et alii.: The increasing importance of chronic rejection as a cause of renal allograft failure. **Transplant Int** 2:214-217, 1989.
64. DINARELLO, C.A.: Biology of interleukin 1. **FASEB Journal** 2:108-115, 1988.
65. DINARELLO, C.A.; MIER, J.W.: Current Concepts - Lymphocytes. **New Engl J Med** 317:940-945, 1987.
66. DOUTRELEPONT, J.M.; ABRAMOWICZ, D.; FLORQUIN, S. et alii.: Early recurrence of hemolytic uremic syndrome in a renal transplant recipient during prophylactic OKT3 therapy. **Transplantation** 53:1378-1379, 1992.
67. DUPONT, E.; SCHANDENE, L.; DENYS, C.; WYBRAN, J.: Differential in vitro actions of Cyclosporin, methylprednisolone, and 6-Mercaptopurine: Implications for

- drugs' influence on lymphocyte activation mechanisms. **Clin Immunol Immunopathol** 40:422-428, 1986.
68. EGIDI, F.; STUCCHI, L.; CANTU, M.A.; PONTICELLI, C.: Cellular infiltrates during different immunosuppressive regimens in renal transplantation. **Transplant Proc** 23: 1115-1116, 1991.
  69. EIJSVOOGEL, V.P.; BUBOIS, R.; MELIEF, C.J.M.: Lymphocyte activation and destruction in vitro in relation to MLC and HLA. **Transplant Proc** 5:415-420, 1973.
  70. ELLIOTT, J.F.; LIN, Y.; MIZEL, S.B. et alii.: Inhibition of interleukin 2 messenger RNA inhibited by cyclosporin A. **Science** 226:1439-1442, 1984.
  71. ELLENHORN, J.D.I.; WOODLE, E.S.; GHOBREAL, I. et alii.: Activation of human T cells in vivo following treatment of transplant recipients with OKT3. **Transplantation** 50: 608-612, 1990.
  72. ENGLEMANN, E.G.; BENIKE, C.J.; GRUMET, F.C.; EVANS, R.L.: Activation of human T lymphocyte subsets: helper and suppressor/cytotoxic T cells recognize and respond to distinct histocompatibility antigens. **J Immunol** 127: 2124 - 2129, 1981.
  73. FERRAN, C.; SHEEHAN K.; SCHREIBER, R. et alii.: Anti-TNF abrogates the cytokine-related anti-CD3 induced syndrome. **Transplant Proc** 23:849-850, 1991.
  74. FINN, P.R.; BOHMAN, S.O.; WILCZEK, H. et alii.: Fine-needle aspiration cytology and conventional histology in 200 renal allografts. **Transplantation** 49:910-912, 1990.
  75. FIORENTINO, D.F.; BOND, M.W.; MOSSMANN, T.R.: Two types of mouse T helper cell: IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J Exp Med** 170:2081-2095, 1989.
  76. FIRST, M.R.; SCHROEDER, T.J.; HARIHARAN, S. et alii.: The effect of indomethacin on the febrile response following OKT3 therapy. **Transplantation** 53:91-94, 1992.
  77. FRANZÉN, S.; GIERTZ, G.; ZAJICEK, J.: Cytological diagnosis of prostatic tumors by transretal aspiration biopsy: a preliminary report. **Brit J Urol** 32:193-196, 1960.
  78. FRENKEN, L.A.M.; KOENE, R.A.P.; TAX, W.J.M.: The role of antibody isotype in IFN-gama and IL-2 production during anti-CD3-induced T cell proliferation. **Transplantation** 51:881-887, 1991.

79. FRIEND, P.J.; CALNE, R.Y.; HALE, G. et alii.: Prophylatic use of an antilymphocyte monoclonal antibody following renal transplantation: a randomized controlled trial. **Transplant Proc** 19:1898-1900, 1987.
80. FURUE, M.; KATZ, S.I.: The effect of cyclosporine on epidermal cells. I. Cyclosporine inhibits accessory cell function of epidermal Langerhans cells in vitro. **J Immunol** 140:4139-4143, 1988.
81. GAJEWSKI, T. F.; JOYCE, J.; FITCH, F. W. : Antiproliferative effect of INF-g in immune regulation. III. Differential selection of Th1 and Th2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IL-2 and recombinant IFN-g. **J Immunol** 143:15-22, 1989.
82. GEBEL, H.M.; LEBECK, L.L.; JENSIK, S.C. et alii.: Discordant expression of CD3 and T-cell receptor antigens on lymphocytes from patients treated with OKT3. **Transplant Proc** 21:1745-1746, 1989.
83. GOLDSTEIN, G.: Overview of the development of Orthoclone OKT3 monoclonal antibody for therapeutic use in transplantation. **Transplant Proc** 19(Suppl.):1-6, 1987.
84. GONÇALVES, L.F.; MANFRO, R.C.; PROMPT, C.A.: Biópsia aspirativa de agulha fina no diagnóstico de pielonefrite aguda em transplante renal. **First Latin-American Meeting on Urinary Tract Infection and Nephrolithiasis**. Recife, 1990.
85. GONÇALVES, L.F.; MANFRO, R.C.; RAUBER, L., et alii.: Evaluation of fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis of acute renal transplant dysfunction. **Transplant Proc** 24:3081-3082, 1992.
86. GONÇALVES, L.F.; RAUBER, M.L.; MANFRO, R.C.; PROMPT, C.A.: Fine needle aspiration biopsy in renal transplant patients on prophylatic OKT3 treatment. **Transplant Proc** 24:3083-3084, 1992.
87. GORDON, R.D.; STARZL, T.E.; FUNG, J.J. et alii.: Monoclonal antibody therapy with cyclosporine and steroids in nonmatched cadaveric renal transplants. **Nephron** 46 (Suppl. 1):56-59, 1987.
88. GOVERMAN, J.; PARNES, J.R.: The T Cell Receptor. In: STITES, D.P.; TERR, A.I.: **Basic and Clinical Immunology**, 7<sup>th</sup>, Appleton & Lange, Norwalk, 1991:73-77.
89. GREENBERG, M.L.; EARL, M.J.; GRIRSON, J.M. et alii.: Percutaneous fine needle aspiration biopsy in clinical

pancreas transplantation. **VI International Transplant Cytology Workshop**. Oxford, 1991.

90. GUPTA, R.; CAMPBELL, J.; OM, A.; BELITSKY, P.: Serial monitoring of cellular rejection by simultaneous histology and fine needle aspiration cytology. **Transplant Proc** 17:2123-2124, 1985.
91. HAAK, H.H.; WEENING, J.J.; RISCHEN-VOS, J. et alii.: Acute cellular rejection during effective early prophylactic OKT3 monoclonal antibody treatment after renal transplantation. **Transplantation** 48:352-354, 1989.
92. HALL, B.M.; TILLER, D.J.; WARDIE, I. et alii.: Comparison of three immunosuppressive regimens in cadaver renal transplantation; long-term cyclosporine, short-term cyclosporine followed by azathioprine and prednisolone, and azathioprine and prednisolone without cyclosporine. **N Eng J Med** 318:1499-1507, 1988.
93. HALL, B.M.; ROSER, B.J.; DORSCH, S.E.: Magnitude of memory to the major histocompatibility complex. **Nature** 268:532-534, 1977.
94. HALL, B.M.; DORSCH, S.E.; ROSER, B.J.: The complex basis of allograft rejection in vivo: II. The nature of memory cell mediating second-set heart graft rejection. **J Exp Med** 148:890-902, 1978.
95. HALL, B.M.: Cells mediating allograft rejection. **Transplantation** 51:1141-1151, 1991.
96. HALL, B.M.: Correlation of Effector Mechanisms and Immunopathology of rejection. **VI International Workshop on Transplant Aspirative Cytology**, Oxford, 1991.
97. HALL, K.A.; DOLE, E.J.; HUNTER, G.C. et alii.: Hyperpyrexia-related ventricular tachycardia during OKT3 induction therapy. **Transplantation** 54:1112-1113, 1992.
98. HALLORAN, P.F.; BROSKI, A.P.; BATIUK, T.D.; MADRENAS, J.: The molecular immunology of acute rejection: an overview. **Transplant Immunology** 1:3-27, 1993.
99. HALLORAN, P.F.; WADGYMAR, A.; AUTENREID, P.: The regulation of expression of major histocompatibility antigens (Overview). **Transplantation** 41:413-420, 1986.
100. HANDSCHUMACHER, R.E.; HARDING, M.W.; RICE, J. et alii.: Cyclophilin: A specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. **Science** 226:544-547, 1984.

101. HANSEN, B.L.; FOGED, N.; NIELSEN, E. et alii.: Fine-needle aspiration cytology during treatment with Orthoclone monoclonal antibody OKT3 for acute cellular rejection after renal transplantation. **Transplant Proc** 20:626 - 628, 1988.
102. HARFORD, A.M.; SHOPP, G.M.; ASHMORE, L.M. et alii.: OKT3-treated kidney transplant patients: monitoring of effects on peripheral blood mononuclear cells by using two-color flow cytometry. **Transplant Proc** 20 (Suppl 1):245-248, 1988.
103. HARFMANN, P.; DITTMER, R.; BUSCH, R. et alii.: Morphologic changes in the fine needle aspiration cytology of renal transplants during virus infection as detected by DNA in situ hybridization. **Transplant Proc** 21:3588-3590, 1989.
104. HAUG, C.E.; COLVIN, R.B.; DELMONICO, F.L. et alii.: A phase 1 trial of immunosuppression with anti-ICAM-1 (CD54) monoclonal antibody in renal allograft recipients. **Transplantation** 55:766 - 772, 1993.
105. HAYRY, P.; VON WILLEBRAND, E.; ANDERSON, L.C. : Expression of HLA-ABC and DR locus antigens on human kidney endothelial, tubular and glomerular cells. **Scand J Immunol** 11:303-310, 1980.
106. HÄYRY, P.; VON WILLEBRAND, E.: Practical guidelines for fine needle aspiration biopsy of human renal allografts. **Ann Clin Res** (Helsinki) 13:288-306, 1981.
107. HAYRY, P.; VON WILLEBRAND, E.: Monitoring of human renal allograft rejection with fine-needle aspiration cytology. **Scand J Immunol** 13:87-97, 1981.
108. HÄYRY, P.; VON WILLEBRAND, E.: Transplant Aspiration Cytology. **Transplantation** 38:7-12, 1984.
109. HEINRICH, G.; GRAM, H.; KOCHER, H.P. et alii. : Characterization of a human T-cell-specific chimeric antibody (CD7) with human constant and mouse variable regions. **J Immunol** 143:3589-3597, 1989.
110. HELDERMAN, J.H.; HERNANDEZ, J.; SAGALOWSKY, A. et alii.: Confirmation of the utility of fine needle aspiration biopsy of the renal allograft. **Kidney Int** 34:376-381, 1988.
111. HELDERMAN, J.H.; HERNANDEZ, J.; GLENNIE, J.; WOMBLE, D. Analysis of the IL-2 receptor by monoclonal antibody of fine needle aspiration specimens. **Transplant Proc** 21: 3574-3575, 1989.



112. HENELL, K.R.; BAKKE, A.; KENNY, T.A. et alii.: Degree of modulation of cell-surface CD3 by anti-lymphocyte therapies. **Transplant Proc** 23:1070-1071, 1991.
113. HERNANDEZ, J.A.; GLENNIE, J.; TOTO, R. et alii.: A novel use of fine needle aspiration biopsy: Documentation of acute pyelonephritis of the transplanted kidney. **Transplant Proc** 20:632-634, 1988.
114. HESS, A.D.; ESA, A.H.; COLOMBANI, P.M.: Mechanisms of action of cyclosporine: Effect on cells of the immune system on subcellular events in T cell activation. **Transplant Proc** 20:29-40, 1988.
115. HESS, A.D.; TUTSCHKA, P.J.: Effect of cyclosporin A on human lymphocyte responses in vitro. I. CsA allows for the expression of alloantigen-activated suppressor cells while preferentially inhibiting the induction of cytolytic effector lymphocytes in MLR. **J Immunol** 124: 2601-2608, 1980.
116. HESS, A.D.; TUTSCHKA, P.J.; SANTOS, G.W.: Effect of cyclosporine A on human lymphocyte responses in vitro. III. CsA inhibits the production of T lymphocyte growth factors in secondary mixed lymphocyte responses but does not inhibit the response of primed lymphocytes of TCGF. **J Immunol** 128:355-359, 1982.
117. HIBBERD, P.L.; TOLKOFF-RUBIN, N.E.; COSIMI, A.B. et alii.: Symptomatic cytomegalovirus disease in the cytomegalovirus antibody seropositive renal transplant recipient treated with OKT3. **Transplantation** 53:68-72, 1992.
118. HILLEBRAND, G.; ROTHGAUG, E.; HAMMER, C. et alii.: Experience with a new monoclonal antibody in clinical kidney transplantation. **Transplant Proc** 21:1776-1777, 1989.
119. HIRSCH, R.; ARCHIBALD, J.; GREES, R.E.: Differential T cell hyporesponsiveness induced by in vivo administration of intact or F(ab')<sub>2</sub> fragments of anti-CD3 monoclonal antibody. **J Immunol** 147:2088-2093, 1991.
120. HIRSCH, R.; ECKHAUS, M.; AUCHINCLOSS JR., H. et alii.: Effects of in vivo administration of anti-T3 monoclonal antibody on T cell function in mice. **J Immunol** 140: 3766-3772, 1988.
121. HIRSCH, R.L.; LAYTON, P.C.; BARNES, L.A. et alii.: Orthoclone OKT3 treatment of acute renal allograft rejection in patients receiving maintenance cyclosporine therapy. **Transplant Proc** 19 (Suppl. 1): 32-36, 1987.

122. HONG, S.C.; CHELOUCHE, A.; LIN, R.H. et alii.: An MHC interaction site maps to the amino-terminal half of the T cell receptor alpha chain variable domain. **Cell** **69**: 999-1009, 1992.
123. HORSBURG, T.; BROWN, S.; VEITCH, P.S.; BELL, P.R.F.: Cell culture of fine-needle aspirates and Tru-Cut biopsies. **Transplant Proc** **20**:679-680, 1988.
124. ILANO, A.L.; MCCONNELL, M.V.; GURLEY, K.E. et alii.: Cellular basis of allograft rejection in vivo. V. Examination of mechanisms responsible for the differing efficacy of monoclonal antibody to CD4<sup>+</sup> T cells subsets in low and high-responder rat strains. **J Immunol** **143**: 2828 - 2836, 1989.
125. JANSSEN, O.; WESSELBORG, S.; KABELITZ, D.: Immunosuppression by OKT3 - Induction of programmed cell death (apoptosis) as a possible mechanism of action. **Transplantation** **53**:233-234, 1992.
126. JEFFREY, R.F.; JOHNSON, M.H.; BAMFORD, J.M. et alii.: Prolonged neurological disability following OKT3 therapy for acute renal transplant rejection. **Transplantation** **55**:677-678, 1993.
127. JORGENSEN, K.A.; STRATE, M.; SVENDSEN, V. et alii.: Fine needle aspiration biopsy during and after OKT3. **Transplant Proc** **21**:3594-3595, 1989.
128. JORGENSEN, K.A.; STRATE, M.; SVENDSEN, V. et alii.: Are FNAB correction factors correct? **Transplant Proc** **21**: 3603-3604, 1989.
129. KAHANA, L.; BAXTER, J.A.: OKT3 rescue in refractory renal rejection. **Nephron** **46** (Suppl. 1):34-40, 1987.
130. KAHAN, B.D.: New pharmacologic agents (Editorial). **Transplant & Immunol Letter** **7**:2, 1990.
131. KAHAN, B.D.: Cyclosporine. **New Engl J Med** **321**:1725 - 1738, 1989.
132. KERR, P.G.; ATKINS, R.C.: The effects of OKT3 therapy on infiltrating lymphocytes in rejecting renal allografts. **Transplantation** **48**:33-36, 1989.
133. KERR, P.G.; ATKINS, R.C.: The effects of OKT3 anti-rejection therapy on in situ allograft infiltrating lymphocytes. **Transplant Proc** **21**:977-978, 1989.
134. KIRBY, R.M.; YOUNG, J.A.; HUBSCHER, S.G.; MCMASTER, P.: The total corrected increment in the diagnosis of

- hepatic dysfunction after orthotopic liver transplantation. **Transplant Proc** 20:642-643, 1988.
135. KIRKMAN, R.L.; ARAUJO, J.L.; BUSCH, G.J. et alii.: Treatment of acute renal allograft rejection with monoclonal T-12 antibody. **Transplantation** 36:620-626, 1983.
  136. KOHLER, G.; MILSTEIN, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature** 256:495-497, 1975.
  137. KORMENDI, F.; PERNER, F.; BEREJI, E. et alii.: New corrective calculation to compensate the error of blood contamination in aspiration cytology specimens of human renal allografts. **Transplant Proc** 17:2075-2076, 1985.
  138. KRAKAUER, H.; GRAUMAN, J.S.; MCMULLAN, M.R.; CREEDE, C.C.: The recent U.S. experience of end-stage renal disease by dialysis and transplantation. **New Engl J Med** 308:1558-1563, 1983.
  139. KREIS, H.; CHKOFF, N.; CHATENAUD, L. et alii.: A randomized trial comparing the efficacy of OKT3 used to prevent or to treat rejection. **Transplant Proc** 21 (Suppl. 2):3-6, 1989.
  140. KRENSKY, A.M.; WEISS, A.; CRABTREE, G. et alii.: T-lymphocyte-antigen interaction in transplant rejection. **New Engl J Med** 322:510-517, 1990.
  141. KUNG, P.C.; GOLDSTEIN, P.; REINHERZ, E.L. et alii.: Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. **Science** 206:347-349, 1979.
  142. KUNICKA J.E.; PLATSOUCAS, C.D.: Induction of suppressor cells to T- and B-cell proliferative responses and immunoglobulin production by monoclonal antibodies recognizing CD3 T-cell differentiation antigen. **Cell Immunol** 116:195-215, 1988.
  143. KUPIEC-WEGLINSKI, J.W.; FILHO, M.A.; STROM, T.B.; TILNEY, N.L.: Sparing of suppressor cells: A critical action of cyclosporine. **Transplantation** 38:97-101, 1984.
  144. LAND, W. : Cyclosporine in cadaveric renal transplantation: Five-year follow-up results of the European multicentre trial. **Transplant Proc** 20:73-77, 1988.
  145. LE MAUFF, B.; HOURMANT, M.; ROUGIER, J.P. et alii.: Effect of anti-LFA1 (CD11a) monoclonal antibodies in

- acute rejection in human kidney transplantation. **Transplantation** 52:291-296. 1991
146. LIGHT, J.A.; KHAWAND, N.; AQUINO, A. et alii.: Quadruple immunosuppression: comparison of OKT3 and Minnesota antilymphocyte globulin. **Am J Kidney Dis** 14 (Suppl. 2): 10-13, 1989.
  147. LEE, H.M.: Surgical Techniques of Renal Transplantation In: MORRIS, P.J. (ed); **Kidney Transplantation - Principles and Practice**, 3<sup>rd</sup> ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1988. p. 215-234.
  148. LLWELYN, M.B.; HAWKINS, R.E.; RUSSELL, S.J.: Monoclonal antibodies in medicine-discovery of antibodies. **Br Med J** 305:1269-1272, 1992.
  149. MAKGOBA, M.W.; SANDERS, M.E.; LUCE, G.E.G. et alii.: ICAM-1 a ligant for LFA-1-dependent adhesion of B, T and myeloid cells. **Nature** 331:86-88, 1988.
  150. MAKI, T.; SIMPSON, M.; MONACO, A.P.: Development of supressor T cells by antilymphocyte serum treatment in mice. **Transplantation** 34:376-381, 1982.
  151. MANCA, F.; VALLE, M.T.; PATRONE, P. et alii.: Generation of fibroblast and endothelial cell lines from kidney allograft fine-needle aspiration biopsy samples. **Transplant Proc** 20:677-678, 1988.
  152. MANFRO, R.C.; POHANKA, E.; GAROVOY, M.R.: Mecanismos de ação da ciclosporina A na prevenção da rejeição aguda do transplante de órgãos. **J Bras Nefrol** 12: 159-163, 1990.
  153. MANFRO, R.C.; POHANKA, E.; TOMLANOVICH, S.J. et alii.: Cyclosporine A and prednisolone: An additive inhibitory effect on cell proliferation and interleukin-2 production. **Transplant Proc** 21:1457-1459, 1989.
  154. MARTINENGI, S.; SECCHI, A.; DI CARLO, V.; POZZA, G.: Fine needle aspiration biopsy of a pancreatic graft. **Sixth International Transplant Cytology Workshop**, Oxford, 1991.
  155. MCCONNELL, M.; HALL, B.M.: Comparison of CD4 and CD8 cell reactivity in high and low responder combinations in the rat. **Transplant Proc** 21:3294-3295, 1989.
  156. MCDONALD, H.R.; ENGERS, H.D.; CEROTTINI, J.C.; BRUNNER, K.T.: Generation of cytotoxic T-lymphocytes in vitro: II. Effect of repeated exposure to alloantigens on the cytotoxic activity of long-term mixed lymphocyte cultures. **J Exp Med** 140:718-730. 1974.

157. MCDONALD, H.R.; SORDAET, B.; CEROTTINI, J.C.; Brunner, K.T.: Generation of cytotoxic T-lymphocytes in vitro: IV. Functional activation of memory cells in the absence of DNA synthesis. **J Exp Med** **142**:622-636, 1975.
158. MCWHINNIE, D.L.; THOMPSON, J.F.; TAYLOR, H.M. et alii.: Morphometric analysis of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labelling in sequential human renal allografts biopsies. **Transplantation** **42**:352-358, 1986.
159. MEISER, B.M.; REITER, C.; EBEL, M. et alii.: A new chimeric monoclonal CD4 antibody for prevention of rejection after heart transplantation. **Transplant Proc** **24**:1739, 1992.
160. MIHATSCH, M.J.; THIEL, G.; RYFFEL, B.: Histopathology of ciclosporine nephrotoxicity. **Transplant Proc** **20**(S3): 759-771, 1988.
161. MIZUIRI, S.; OHARA, T.; AIKAWA, A. et alii.: Analysis of renal transplant using fine needle aspiration biopsies with monoclonal antibodies. **Transplant Proc** **21**:3452 - 3454, 1989.
162. MONACO, A.P.: Clinical aspects of monoclonal antibody therapy in kidney transplantation. **Transplantation Science** **2** (Suppl.):9-13, 1992.
163. MONACO, A.P.: Renal Prophylaxis with Orthoclone OKT3 in the United States. **Transplant Proc** **21** (Suppl. 2):7-13, 1989.
164. MONACO, A.P.: Biological immunosuppression: polyclonal antilymphocyte sera, monoclonal antibody, and donor-specific antigen, In: CERILLI, G.J. : **Organ Transplantation and Replacement**; J.B. Lippincott Co.; Londres; 1988:83-117.
165. MONACO, A.P.; CAMPION, J.P.; KAPUICK, S.J.: Clinical use of antilymphocyte globulin. **Transplant Proc** **9**: 1007-1018, 1977.
166. MOORE, K.W.; VIEIRA, P.; FIORENTINO, D.F. et alii.: Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (Il-10) and the Epstein-Barr virus gene BCRF1. **Science** **248**: 1230-1234, 1990.
167. MORRIS, P.J.: Results of Renal Transplantation. In: MORRIS P.J.(ed): **Kidney Transplantation - Principles and Practice**, 3<sup>rd</sup> ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1988. p. 737-758

168. MOSSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W. et alii.: Two types of murine helper T clone: I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol** **136**:2348-2357, 1986.
169. MOURA, L.A.R.; ALBERTI, V.N.; MONTEZZO, L.C. et alii.: Brazilian experience with fine-needle aspiration cytology in kidney transplants. **Transplant Proc** **20**: 617-618, 1988.
170. MOURA, L.A.R.: **Efetividade da biópsia aspirativa com agulha fina na avaliação morfológica seqüencial do transplante renal**. Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1989.
171. MUELLER, C.; GERSHENFELD, H.K.; LOBE, C.G. et alii.: A high proportion of T lymphocytes that infiltrate H-2 incompatible heart allografts in vivo express genes encoding cytotoxic cell-specific serine proteases, but do not express the MEL-14-defined lymph node homing receptor. **J Exp Med** **167**:1124-1136, 1988.
172. MYBURGH, J.A.; MEYERS, A.M.; THOMSON, P.D; et alii.: Total lymphoid irradiation. Current status. **Transplant Proc** **21**:826-828, 1989.
173. NAST, C.C.; BLIFELD, G.M.; DANOVITCH, G.M. et alii.: Evaluation of cyclosporine toxicity by renal transplant fine needle aspiration biopsy. **Kidney Int** **35**:531(A), 1989.
174. NELSON, P.W.; COSIMI, A.B.; DELMONICO, F.L. et alii.: Antithymocyte globulin as the primary treatment for renal allograft rejection. **Transplantation** **36**:587-589, 1983.
175. NICOLLS, M.R.; AVERSA, G.G.; PEARSE, N.W. et alii.: Induction of long-term specific tolerance to allografts in rats by therapy with an anti-CD3-like monoclonal antibody. **Transplantation** **55**:459-468, 1993.
176. NORMAN, D.J.; KAHANA, L.; STUART JR., F.P. et alii.: A randomized clinical trial of induction therapy with OKT3 in kidney transplantation. **Transplantation** **55**:44 - 50, 1993.
177. NORMAN, D.J.; BARRY, J.M.; BENNETT, W.M. et alii.: OKT3 for induction immunosuppression in renal transplantation: a comparative study of high versus low doses. **Transplant Proc** **23**:1052-1054, 1991.
178. NORMAN, D.J.; BARRY, J.M.; BENNETT, W.M. et alii.: The use of OKT3 in cadveric renal transplantation for

- rejection that is unresponsive to conventional anti-rejection therapy. **Am J Kidney Dis** 11:90-93, 1988.
179. NORMAN, D.J.; SHIELD III, C.F.; HENELL, K.R. et alii.: Effectiveness of a second course of OKT3 monoclonal anti-T cell antibody for treatment of renal allograft rejection. **Transplantation** 46:523-529, 1988.
  180. NORMAN, D.J.; SHIELD III, C.F.; BARRY, J. et alii.: Early use of OKT3 monoclonal antibody in renal transplantation to prevent rejection. **Am J Kidney Dis** 21:107-110, 1988.
  181. NORMAN, D.J.; BARRY, J.M.; HENELL, K. et alii.: Reversal of acute allograft rejection with monoclonal antibody. **Transplant Proc** 17:39-41, 1985.
  182. O'GARRA, A.; WARREN, D.J.; HOLMAN, M. et alii.: Effects of cyclosporine on responses of murine B cells to T-cell derived lymphokines. **J Immunol** 137:2220-2227, 1986.
  183. OH, C.S.; SOLLINGER, H.W.; STRATTA, R.J. et alii.: Delayed response to Orthoclone OKT3 treatment for renal allograft rejection resistant to steroid and antilymphocyte globulin. **Transplantation** 45:65-67, 1988.
  184. OPELZ, G.: Correlation of HLA matching with kidney graft survival in patients with and without cyclosporine treatment. **Transplantation** 40:240-243, 1985.
  185. ORTHO MULTICENTER TRANSPLANT STUDY GROUP.: A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. **New Eng J Med** 313:337-342, 1985.
  186. OUWEHAND, A.J.; BAAN, C.C.; GROENEVELD, K. et alii.: Altered specificity of alloreactive cardiac graft-infiltrating cells by prophylactic treatment with OKT3 or horse antilymphocyte globulin. **Transplantation** 55:154-158, 1993.
  187. PALAY, D.A.; CLUFF, C.W.; WENTWORTH, P.A.; ZIEGLER, H.K.: Cyclosporine inhibits macrophage-mediated antigen presentation. **J Immunol** 136:4348-4353, 1986.
  188. PALMER, B.F.; HERNANDEZ, J.; SAGALOWSKY, A. et alii.: Documentation of fungal pyelonephritis of renal allograft by fine needle aspiration biopsy. **Transplant Proc** 21:3598-3599, 1989.
  189. PARFREY, P.S.; KUO, Y.L.; HANLEY, J.A., et alii.: The prognostic value of renal allograft biopsy in acute rejection. **Transplant Proc** 17:1951-1954, 1985.

190. PASTERNAK, A.: Fine-needle aspiration biopsy of human renal homografts. **Lancet** 2:82-84, 1968.
191. PEARSON, T.C.; CHRISTOPHER, R.D.; BUSHELL, A.R. et alii.: The assessment of transplantation tolerance induced by anti-CD4 monoclonal antibody in the murine model. **Transplantation** 55:361-367, 1993.
192. PENN, I.: Development of New Tumors After Transplantation. In: CERILLI, G.J. **Organ Transplantation and Replacement**; J.B. Lippincott Co.; Londres; 1988:439- 444.
193. PONTICELLI, C.; TARANTINO, A.; MONTAGNINO, G. et alii.: A randomized trial comparing triple drug and double drug therapy in renal transplantation. **Transplantation** 45:913-918, 1988.
194. PONTICELLI, C.; RIVOLTA, E.; TARANTINO, A. et alii.: Rescue of severe steroid-resistant rejection with OKT3. **Transplant Proc** 19:1908-1909, 1987.
195. REEVE, R.S.; COOKSEY, G.; WENHAM, P.W. et alii.: A comparison of fine needle aspiration cytology and trucut tissue biopsy in the diagnosis of acute renal allograft rejection. **Nephron** 42:68-71, 1986.
196. REINHERS, E.L.; MENER, S.; FITZGERALD, K.A. et alii.: Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex. **Cell** 30:735-743, 1982.
197. RUSSEL, S.J.; LLEWELYN, M.B.; HAWKINS, R.E.: Monoclonal antibodies in medicine - principles of antibody therapy. **Br Med J** 305:1424-1429, 1992.
198. RUSSELL, J.D.; BEECROFT, M.L.; LUDWIN, D., CHURCHILL, D.N.: The quality of life in renal transplantation. A prospective study. **Transplantation** 54:656-660, 1992.
199. SCHMALDIENST, S.; BOHMIG, G.; POHANKA, E. et alii.: Evidence for granulocyte activation by OKT3. **Transplant Proc** 24:2600-2601, 1992.
200. SCHROEDER, T.J.; WEISS, M.A.; SMITH, R.D. et alii.: The use of OKT3 in the treatment of acute vascular rejection. **Transplant Proc** 23:1043-1045, 1991.
201. SERÓN, D.; DÍAZ-GALLO, C.; GRINÓ, J.M. et alii.: Characterization of interstitial infiltrate in early renal allografts biopsies in patients with stable renal function. **Transplant Proc** 23:1267-1269, 1991.



202. SHABTAI, M.; WALTZER, W.C.; DOMINGUEZ-RAFER, C. et alii.: Prognostic significance of T cell associated surface antigen density changes during OKT3 therapy of renal allograft rejection. **J Urol** **145**:928-931, 1991.
203. SHAPIRO, R.; JORDAN, M.; FUNG, J. et alii.: Kidney transplantation under FK 506 immunosuppression. **Transplant Proc** **23**:920-923, 1991.
204. SHI, Y.; BISSONNETTE, R.P.; PARFREY, N. et alii.: In vivo administration of monoclonal antibodies to the CD3 T cell receptor complex induces cell death (apoptosis) in immature thymocytes. **J Immunol** **146**:3340-3346, 1991.
205. SIBLEY, R.K.; PAYNE, W.: Morphologic findings in the renal allograft biopsy. **Sem Nephrol** **5**:294-306, 1985.
206. SMITH, C.A.; WILLIAMS, G.T.; KINGSTON, R. et alii.: Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. **Nature** **337**:181-184, 1989.
207. SOBH, M.A.; MOUSTAFA, F.E.; GHONEIM, M.A.: Fine needle aspiration biopsy: reproducibility and correlation with Tru-Cut biopsy in the evaluation of renal allotransplants. **Nephrol Dial Transplant** **2**:562-567, 1987.
208. SOULILLOU, J.P.; CANTAROVICH, D.; LE MAUFF, B. et alii.: Randomized controlled trial of a monoclonal antibody against the interleukin-2 receptor (33B3.1) as compared with rabbit antithymocyte globulin for prophylaxis against rejection of renal allografts. **N Eng J Med** **322**:1175-1182, 1990.
209. SPRINGER, T.A.: Adhesion receptors of the immune system. **Nature** **346**:425-434, 1990.
210. STREEM, A.B.; NOVICK, A.C.; BRAUN, W.E. et alii.: Antilymphoblast globulin for treatment of acute renal allograft rejection. **Transplant Proc** **19**:1889-1891, 1987.
211. STROM, T.B.; TILNEY, N.L.; PARADYSZ, J.M. et alii.: Cellular components of allograft rejection: identity, specificity and cytotoxic function of cells infiltrating acutely rejecting allografts. **J Immunol** **118**:2020-2026, 1977.
212. STROM, T.B.: Toward more selective therapies to block graft rejection. **AKF Nephrology letter** **4**:13-20, 1987.
213. STROM, T.B.; KELLEY, V.E.: Toward more selective therapies to block undesired immune responses. **Kidney Int** **35**:1026-1033, 1990.

214. SUTHANTHIRAN, M.: Signaling features of T cells: Implications for the regulation of the anti-allograft response. **Kidney Int** 44 (S 43):3-11, 1993.
215. SWINNEN, L.J.; COSTANZO-NORDIN, M.R.; FISHER, S.G. et alii.: Increased incidence of lymphoproliferative disorder after immunosuppression with the monoclonal antibody OKT3 in cardiac-transplant recipients. **N Eng J Med** 323:1723-1728, 1990.
216. TAKAHASHI, N.; HAYANO, T.; SUZUKI, M.: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporine A-binding protein cyclophilin. **Nature** 337:473-475, 1989.
217. TASHIRO, M.; AIWAKI, A.; SATO, I. et alii.: Comparison of lymphocyte subsets of peripheral blood and grafts in renal transplant recipients. **Transplant Proc** 21:1859-1860, 1989.
218. TERASAKI, P.I.; CECKA, J.M.; TAKEMOTO, S. et alii.: Overview. In: TERASAKI, P.I.; ed.: **Clinical Transplants 1988**. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1988:409-434.
219. THISTLETHWAITE JR, J.R.; STUART, J.K.; MAYES, J.T. et alii.: Complications and monitoring of OKT3 therapy. **Am J Kidney Dis** 21:112-119, 1988.
220. THISTLETHWAITE JR, J.R.; HAAG, B.W.; GEBER, A.O. et alii.: The use of OKT3 to treat steroid-resistant renal allograft rejection in patients receiving cyclosporine. **Transplant Proc** 19:1901-1904, 1987.
221. THOMAS, J.M.; GROSS, U.; CUNNINGHAM, P.; THOMAS, F.T.: Two-color fluorescence activated flow cytometric analysis of T cells in fine needle aspirates for diagnosis of rejection. **Transplant Proc** 21:3611-3613, 1989.
222. THOMAS, J.M.; CARVER, F.M.; HAISCH, C.E. et alii.: Suppressor cells in Rhesus monkeys treated with antithymocyte globulin. **Transplantation** 34:83-89, 1982.
223. THURLLOW, P.J.; LOVERING, E.; D'APICE, A.J.F. et alii.: A monoclonal anti-pan T-cell antibody. **Transplantation** 36:293-298, 1983.
224. TILNEY, N.L.; MILFORD, C.B.; CARPENTER, J.M. et alii.: Long-term results of cyclosporine treatment in renal transplantation. **Transplant Proc** 18-2 (Suppl 1): 179-185, 1986.

225. TILNEY, N.L.; GOWANS, J.: The sensitization of rats by allografts transplanted to alymphatic pedicles of skin. **J Exp Med** **133**:951-962, 1971.
226. TILNEY, N.L.; STROM, T.B.; MACPHERSON, S.G. et alii.: Surface properties and functional characteristics of infiltrating cells harvested from acutely rejecting cardiac allografts in inbred rats. **Transplantation** **20**: 323-330, 1975.
227. TILNEY, N.L.; STROM, T.B.; VINEYARD, J.C. et alii.: Factors contributing to the declining mortality rate in Renal Transplantation. **N Engl J Med** **299**:1321-1325, 1978.
228. TILNEY, N.L.; KUPIEC-WEGLINSKI, J.W.: The biology of acute transplant rejection. **Ann Surg** **214**:99-106, 1991.
229. TING, A.: What crossmatches are required in organ transplantation. **Transplant Proc** **21**:613-614, 1989.
230. TODD, P.A.; BROGDEN, R.N.: Muromonab CD3: a review of its pharmacology and therapeutic potential. **Drugs** **37**:871-899, 1989.
231. TOLKOFF-RUBIN, N.E.; RUBIN, R.H.: Infections in the organ transplant recipient. In: CERILLI, G.J. **Organ Transplantation and Replacement**; J.B. Lippincott; Londres; 1988:445-461.
232. TOUSSAINT, C.; PAUW, L.D.; VEREERSTRAETEN, P. et alii.: Possible nephrotoxicity of the prophylactic use of OKT3 monoclonal antibody after cadaveric renal transplantation. **Transplantation** **48**:524-526, 1989.
233. TSANG, S.Y.; GAROVOY, M.R.; BENET, L.Z.: Immunossuppressive activity of prednisone and prednisolone and their metabolic interconversion in the mixed lymphocyte reaction. **Int J Immunopharmac** **7**: 731-737, 1985.
234. TVEGAARD, E.; OLGAARD, K.: Orthoclone OKT3 as rescue treatment for steroid-resistant and recurrent acute rejection in clinical renal transplantation. **Transplant Proc** **22**:217-218, 1990.
235. UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM. Survival probabilities and causes of death. **Am J Kidney Dis** **18**(S2):49-60, 1991.
236. VINCENTI, F.; AMEND, W.; FEDUSKA, N.J. et alii.: Improved outcome following renal transplantation with reduction in the immunosuppression therapy for rejection episodes. **Am J Med** **69**:107-112, 1980.

237. VOLMER, W.M.; WAHL, P.W.; BLAGG, C.R.: Survival with dialysis and transplantation in patients with end-stage renal disease. **New Engl J Med** 308:1553-1558, 1983.
238. VON WILLEBRAND, E.; HÄYRY, P.: Cyclosporin-A deposits in renal allografts. **Lancet** 2:189-192, 1983.
239. VON WILLEBRAND, E.; HAYRY, P.: Reproducibility of the fine needle aspiration biopsy. Analysis of 93 double biopsies. **Transplantation** 38:314-316, 1984.
240. WAID, T.H.; LUCAS, B.A.; THOMPSON, J.S. et alii.: Treatment of acute cellular rejection with T10B9.1A-31 or OKT3 in renal allograft recipients. **Transplantation** 53:80-86, 1992.
241. WALKER, R.G.; D'APICE, A.L.F.: Azathioprine and steroids. In: MORRIS PG, ed. **Kidney Transplantation. Principles and Practice**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1988:319-342.
242. WALTZER, W.C.; MILLER, F.; ARNOLD, A. et alii.: Immunohistologic analysis of human renal allograft dysfunction. **Transplantation** 43:100-105, 1987.
243. WEE, S.L.; COLVIN, R.B.; PHELAN, J.M. et alii.: Fc-receptor for mouse IgG1 (FcyRII) an antibody-mediated cell clearance in patients treated with Leu2a antibody. **Transplantation** 48:1012-1017, 1989.
244. WEGENER, A.M.K.; LETOURNEUR, F.; HOEVELER, A. et alii.: The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. **Cell** 68:83-95, 1992.
245. WINN, H.J.: Antibody-mediated rejection. In: BURDICK, J.F.; RACUSEN, L.C.; SOLEZ, K. AND WILLIAMS, G.M.: **Kidney transplant rejection**. 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker Inc. New York, 1992. p 319-329.
246. WONG, J.T.; EYLATH, A.A.; GHOBRIAL, I.; COLVIN, R.B.: The mechanism of anti-CD3 monoclonal antibodies. Mediation of cytolysis by inter-T cell bridging. **Transplantation** 50:683-689, 1990.
247. WOOD, R.F.M.; BOLTON, E.M.; THOMPSON, J.F.; MORRIS, P.J.: Monoclonal antibodies and fine needle aspiration cytology in detecting renal allograft rejection. **Lancet** 2:278, 1982.
248. WOODLE, E.S.; THISTLETHWAITE, J.R.; JOLLIFFE, L.K. et alii.: T-cell activation and lymphokine production induced by antihuman CD3 monoclonal antibodies. **Transplant Proc** 23:81-82, 1991.

249. WOODLE, E.S.; THISTLETHWAITE, J.R.; GHOBRIAL, I.A. et alii.: OKT3 F(AB')<sub>2</sub> fragments - retention of the immunosuppressive properties of whole antibody with marked reduction in T cell activation and lymphokine release. **Transplantation** 52:354-360, 1991.
250. WOODLE, E.S.; THISTLETHWAITE, J.R.; JOLLIFFE, L.K. et alii.: Murine/human chimeric OKT3 antibodies: in vitro analysis of T cell activation and suppression properties and idiotype. **VI International Workshop on Transplant Aspirative Cytology**, Oxford, 1991.
251. YAMASHITA, Y.; BULLINGTON, R.; CLEMENT, L.T.: Equivalent helper functions of human "naive" and "memory" CD4<sup>+</sup> T cells for the generation of alloreactive cytotoxic T lymphocytes. **J Clin Immunol** 10:237-246, 1990.
252. ZANNIER, A.; FAURE, J.L.; MUTIN, M. et alii.: Aspiration cytology of liver allografts: Monitoring of hepatocyte major histocompatibility complex-DR expression increases accuracy diagnosis of rejection episodes. **Transplant Proc** 20:650-651, 1988.
253. ZAR, J.H.: **Biostatistical Analysis**. 2<sup>nd</sup> ed. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, 1984.