

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

**AVALIAÇÃO DE APOPTOSE EM LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE  
PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS**

**VIRNA NOWOTNY CARPIO**

**Porto Alegre**  
**2004**

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

**AVALIAÇÃO DE APOPTOSE EM LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE  
PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS**

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

**VIRNA NOWOTNY CARPIO**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Santos Gonçalves

Porto Alegre

2004

## **AGRADECIMENTOS**

- À minha família pelo apoio e compreensão.
- Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Santos Gonçalves, pela orientação e disponibilidade constante.
- À amiga e colega Esther C.A.Dias pelos ensinamentos, incentivo e confiança.
- Ao Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro pela atenção e orientação.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- À colega do laboratório de pesquisa do Curso de Pós Graduação em Nefrologia Gabriela Souza pelo incentivo e apoio.
- Aos funcionários do Serviço de Nefrologia do HCPA pelo convívio.

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo incentivo a pesquisa e apoio financeiro.
- Ao grupo de Pesquisa e Pós Graduação (GPPG) e ao Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	06
LISTA DE TABELAS .....	08
LISTA DE FIGURAS .....	09
I. INTRODUÇÃO .....	11
Imunologia dos Transplantes .....	12
Apoptose .....	20
Métodos de Avaliação de Apoptose .....	24
Transplante de órgãos e apoptose .....	30
Referências Bibliográficas .....	33
II. OBJETIVOS .....	43
Objetivo Geral.....	43
Objetivos Específicos .....	43

III. ARTIGO EM PORTUGUÊS .....	44
IV. ARTIGO EM INGLÊS .....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

- CPH: Complexo principal de histocompatibilidade
- HLA: antígeno leucocitário humano (“Human Leucocyte Antigen”)
- APC: célula apresentadora de antígeno
- RCT: receptor da célula T
- IL: interleucina
- Th: linfócito T auxiliar (“T helper”)
- Tc: linfócito T citotóxico
- Fas-L: Fas ligante
- TGF $\beta$ : fator de crescimento transformador  $\beta$  (“Transforming Growth Factor”)
- TNF: fator de necrose tumoral (“Tumor Necrosis Factor”)
- DISC: (Complexo sinalizador indutor de morte)
- Apaf: protease de ativação de apoptose (apoptotic protease activating factor)

- IAPs: proteínas de inibição de apoptose (inhibitors of apoptosis proteins)
- AICD: indução da morte celular por ativação (Activation Induced Cell Death)
- DNA: ácido desoxirribonucléico
- PCR: reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
- RT: transcrição reversa (“Reverse Transcription”)
- RNA: ácido ribonucléico
- Qc: competidor quantitativo (“quantitative competitor”)
- RNAm: mensageiro do ácido ribonucléico
- RSC: rejeição subclínica
- FS: fosfatidilserina

## LISTA DE TABELAS

### Artigo em Português

Tabela 1. Percentual de apoptose em relação aos grupos e a imunossupressão ..... 68

Tabela 2. Expressão de FasL em linfócitos não estimulados de pacientes transplantados renais em relação ao grupo e a imunossupressão ..... 69

### Artigo em Inglês

Table 1. Percentage of apoptosis as to groups and immunosuppression ..... 97

Table 2. FasL expression in non-stimulated lymphocytes of renal transplant patients as to the group and immunosuppression ..... 98

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Apresentação esquemática da resposta imune aos aloantígenos .....	17
Figura 2. Representação esquemática dos mecanismos de sinalização de apoptose .....	22
Figura 3. Princípio da reação em cadeia da polimerase .....	26
Figura 4. Esquema representando a expressão genética desde a replicação e a transcrição do DNA, a transcrição reversa do RNA ao DNA complementar e a translação protéica .....	28

### **Artigo em Português**

Figura 1. Percentual de células apoptóticas marcadas com annexina V e iodeto de propídeo por citometria de fluxo após 48 horas em cultura estimulada com PHA 1% ..... 71

Figura 2. Expressão de GAPDH, FASL e IL-2 em linfócitos periféricos de pacientes transplantados renais recentes, tardios e controles ..... 73

### **Artigo em Inglês**

Figure 1. Percentage of apoptotic cells marked with Annexin V and propidium iodide by flow cytometry after 48 hours in a culture stimulated by PHA 1%. ..... 100

Figure 2. Expression of GAPDH, FASL and IL-2 in peripheral lymphocytes of recent and late renal transplant patients and controls ..... 102

## I. INTRODUÇÃO

O transplante renal bem sucedido é o tratamento de escolha que apresenta o maior índice de reabilitação para pacientes com insuficiência renal crônica terminal (1, 2). Nas últimas duas décadas, observou-se em vários centros transplantadores a introdução e o aprimoramento de múltiplos recursos diagnósticos e terapêuticos, no que se refere à prevenção e monitorização da rejeição do aloenxerto, diminuindo assim, a incidência de rejeição aguda e elevando a taxa de sobrevivência, em um ano, do paciente e do enxerto para índices iguais ou superiores a 95% e 90% respectivamente (1-5).

A rejeição aguda é uma complicação que ocorre mais freqüentemente nos primeiros meses pós-transplante, sendo definida como a deterioração estrutural e funcional do rim, causada por uma resposta imune ativa contra o aloenxerto (1, 2).

Apesar dos avanços na preservação dos órgãos, nos testes de histocompatibilidade e da introdução de potentes fármacos com atividade imunossupressora, a reação de rejeição ainda é um problema a ser superado.(5-7). A compreensão dos mecanismos de rejeição é de fundamental importância, tanto na abordagem terapêutica do receptor quanto no desenvolvimento de novas estratégias imunossupressoras (3, 4). Outro aspecto importante é aprofundar o conhecimento a respeito dos mecanismos de ação dos imunossupressores, que pode auxiliar no controle da resposta imune para evitar a rejeição como também na manipulação da mesma no sentido de buscar estratégias que levem ao desenvolvimento de tolerância imunológica (8, 9).

### **Imunologia dos Transplantes**

Diversos estudos em imunologia dos transplantes têm contribuído nas últimas décadas para compreensão dos mecanismos que envolvem a rejeição (10, 11). A reação de rejeição é uma resposta imunológica a antígenos codificados pelo complexo principal de histocompatibilidade (CPH) presentes na superfície das células do tecido transplantado. Estes antígenos são geneticamente determinados e encontram-se no braço curto do cromossomo seis, sendo constituídos por glicoproteínas e têm importantes funções no sistema imune (3, 12-15).

O sistema do Complexo Principal de Histocompatibilidade, no homem denominado *Human Leukocyte Antigen* (HLA) codifica duas classes distintas de moléculas antigênicas de superfície, denominadas antígenos classe I e classe II.

As moléculas de classe I, isto é, HLA-A, B, C são expressas em quase todas as células nucleadas, sendo reconhecidas especificamente por linfócitos T citotóxicos CD8+, enquanto as de classe II, HLA- DP, DQ, DR, têm sua expressão mais limitada e são identificadas pelos linfócitos T auxiliares CD4+ (16,17). A viabilidade do transplante é influenciada pela compatibilidade antigênica entre doador e receptor principalmente das moléculas B e DR, cuja identidade associa-se com uma maior sobrevida do enxerto renal após o primeiro ano de transplante (18).

O processo de rejeição ao enxerto inicia-se com o reconhecimento dos antígenos apresentados pelas moléculas HLA da célula apresentadora de antígenos (APC) ao linfócito T do receptor. Dois mecanismos estão envolvidos neste processo, o direto e o indireto. Na via direta de alorreconhecimento, os linfócitos T do indivíduo transplantado reconhecem os antígenos polimórficos presentes na superfície das células do doador. Na via indireta de alorreconhecimento, os linfócitos T reconhecem antígenos polimórficos processados e apresentados na forma de peptídeos, dentro da molécula de HLA, presentes na superfície celular das APC do próprio receptor (19).

A apresentação ocorre na fenda dos antígenos de classe II do CPH na forma de pequenos peptídeos. O sinal de ativação é transmitido para o citosol da célula T através do complexo receptor de célula T/CD3.

Assim o acoplamento do antígeno do doador, apresentado na fenda de moléculas de classe II HLA das APCs, com o receptor de células T promove o chamado primeiro sinal. Este sinal não é suficiente para promover a ativação das células T sendo necessário a participação de um segundo sinal, denominado de co-estimulatório. Por definição, moléculas com atividade co-estimulatória são aquelas cujo bloqueio levam a célula T a um estado de anergia antígeno-específico e que não se dá através do receptor da célula T. Dentre as moléculas co-estimulatórias destacam-se CD28 e CTLA4 cujos ligantes são as moléculas B7-1 e B7-2 para CD28 e B7 para CTLA4, expressas na superfície das APCs. Outro mecanismo co-estimulatório proposto é o da via CD40-CD40L, sendo que a estimulação do CD40 também induz a expressão da via B7-1 e B7-2 como parte desta cascata de ativação. A manipulação do segundo sinal pode representar uma nova estratégia imunossupressora, pois em modelos experimentais, a sua inibição com receptores solúveis (CTLA4 Imunoglobulina) ou anticorpos monoclonais anti-B7 prolongou a sobrevivência do enxerto, induzindo tolerância imunológica (20, 21).

Diversos eventos intracelulares ocorrem a partir da interação do antígeno com o complexo RCT/CD3, entre eles a ativação de inúmeras proteínas quinases e outras dependentes de cálcio e calmodulina. A interação destes sinais ainda é pouco conhecida, mas crítica para o desenvolvimento da resposta de ativação celular.

A interleucina 1 (IL-1) e a interleucina 6 (IL-6) produzidas pelas APCs, na presença de co-estimulação, também contribuem para a ativação das células T auxiliares, que por sua vez produzem interleucina 2 (IL-2) um potente fator de

crescimento dos linfócitos T, além de induzirem a expressão do receptor para IL-2 em sua superfície. A interação da IL-2 com seu receptor estimula a divisão celular e a expansão clonal das células auxiliares e citotóxicas antígeno-estimuladas (22, 23).

Adicionalmente, a IL-2 estimula a produção de outras linfocinas que desempenham papéis importantes na rejeição, como a IL-3. Esta estimula a proliferação de células precursoras que se diferenciam em granulócitos e macrófagos. O Interferon  $\gamma$ , cuja síntese também é estimulada pela IL-2, aumenta a expressão de antígenos de classe II nas células induzíveis, aumentando a imunogenicidade dos enxertos e aumentando a função citodestrutiva dos macrófagos.

Após a ativação dos linfócitos T auxiliares, são sintetizados fatores de crescimento e diferenciação como IL-4, IL-5 e IL-6. Estes induzem a expansão clonal dos linfócitos B estimulados pelo antígeno, que acabam por produzir anticorpos específicos com atividade citotóxica contra as células do órgão transplantado (23).

Ocorrida a ativação inicial, as células T citotóxicas proliferam sob a influência de IL-2, e sob a ação de interferon  $\gamma$ , IL-4 e IL-6, assumem a função citotóxica. A fase efetora de ataque às células do enxerto pelas células do receptor inicia-se pelo reconhecimento dos antígenos de classe I do CPH expressos na superfície das mesmas pelos linfócitos citotóxicos diferenciados.

A evolução da resposta imune pode ser descrita no contexto em um modelo teórico recentemente proposto. Foi demonstrado que existem ao menos duas

subpopulações funcionalmente distintas de linfócitos T auxiliares, classificadas de acordo com o tipo de citocinas produzidas. Estas células podem ser do tipo Th1 ou Th2. Os linfócitos Th1 secretam IL-2, interferon  $\gamma$  e fator de necrose tumoral  $\alpha$ , estando envolvidos, principalmente, na resposta imune celular a partir da produção de reações de hipersensibilidade tardia e ativação de macrófagos. Os linfócitos Th2 secretam IL-4, IL-5 e IL-10, estando envolvidos na resposta humoral e estimulando a produção de mastócitos, eosinófilos e imunoglobulinas. As citocinas podem então levar à ativação de vários mecanismos efetores. Demonstrou-se *in vitro* que as células dessas duas subpopulações apresentam capacidade de regular umas às outras. A diferenciação das células Th0 em Th2 é inibida pela presença de interferon  $\gamma$ , enquanto que a presença de IL-4 inibe a diferenciação das células Th0 em Th1 (12, 22, 24). Não está claramente definida ainda a importância deste modelo teórico no contexto do transplante de órgãos.

As fases finais do processo de resposta imune resultam em algumas vias ainda não totalmente conhecidas. Pelo menos dois mecanismos são possivelmente envolvidos, e parecem operar por indução da célula-alvo a apoptose: (a) a ligação à célula-alvo estimula as células Tc a liberarem vesículas secretoras no ponto de contato que contém perforina, que se polimeriza na membrana plasmática da célula-alvo para formar canais transmembrana; (b) também estão contidas nessas vesículas as proteases serinas, que parecem passar através dos canais de perforina para induzir a apoptose. O Fas-L é uma proteína de superfície que também pode estimular o processo de apoptose quando unido ao seu ligante - Fas - expresso na superfície das células alvo (13,

22, 25). Essas duas vias estão envolvidas no processo de lise celular que ocorre minutos ou horas após a sua ativação. Discute-se ainda uma terceira via, a via do fator de necrose tumoral (TNF) que participa de forma mais lenta na morte celular. Esta cascata de ativação com destruição celular torna-se cíclica a menos que modificada por fármacos imunossupressores capazes de diminuir ou impedir a atividade citotóxica. Na Figura 1 a seguir estão representados de forma esquemática os principais eventos celulares e humorais das fases de montagem e efetora da resposta imune aos aloantígenos.

**Figura 1.** Apresentação esquemática da resposta imune aos aloantígenos.

O sucesso do transplante depende diretamente do bloqueio da resposta imune do receptor em relação ao doador e, nos últimos anos desenvolveu-se principalmente devido à disponibilidade de imunossupressores eficazes. Os centros de transplante têm estabelecido seus próprios protocolos de imunossupressão, os quais constam de uma combinação de fármacos que agem

em diferentes etapas da ativação dos linfócitos T, com efeito final aditivo ou sinérgico (26). A indução de tolerância imunológica é o objetivo maior de imunologistas, clínicos e cirurgiões que se dedicam aos transplantes de órgãos. Essa busca pela tolerância é plenamente justificada, pois a sua presença indicaria, necessariamente, a ausência de rejeição; conseqüentemente, a utilização de fármacos imunossupressores seria desnecessária, já que, alguns destes, pela inespecificidade do bloqueio, causam muitos efeitos adversos e a imunossupressão generalizada aumenta o risco de infecções e neoplasias (27, 28).

A tolerância imunológica é um fenômeno complexo que ocorre naturalmente em todo ser vivo. É por meio deste fenômeno que as células do sistema imune, mais especificamente os linfócitos T e B aprendem a distinguir o próprio do não próprio. Os mecanismos responsáveis pela indução de não responsividade aos aloantígenos, assim como os potenciais mecanismos de manutenção de tolerância, continuam sob intensa investigação. Os principais mecanismos de indução de tolerância central e periférica descritos até o momento são: deleção, anergia, ignorância, regulação/supressão. Existem também alguns processos imunológicos que levam ao desenvolvimento desses mecanismos, como desvio imune, microquimerismo, macroquimerismo e apoptose (28).

Os linfócitos em apoptose podem secretar IL-10, uma citocina antiinflamatória. Além disso, a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos muitas vezes leva a produção de IL-10 e TGF- $\beta$ , que é um potente imunossupressor, podendo promover tolerância (29, 30, 31). Estes estudos

sugerem que a apoptose de células T e a tolerância imunológica estão estreitamente relacionadas, possibilitando assim a ativação de uma cascata regulatória dirigida por citocinas.

Recentemente, alguns estudos sugeriram que a morte de células por apoptose esta ativamente envolvida na imunossupressão (32, 33). As células apoptóticas são fagocitadas por macrófagos e/ou células dendríticas, ocasionando imunossupressão, este processo provavelmente é mediado pela produção de TGF $\beta$ 1(transforming growth factor). Existem relatos de que morte por apoptose induz a produção de TGF $\beta$ 1, é dito que a produção de TGF $\beta$ 1 por células apoptóticas foi o primeiro achado de anti-imunoglobulina indutora de apoptose em linfoma de células B de camundongos por Warner e colaboradores (34). Subseqüentemente TGF $\beta$ 1 foi encontrado em diversas outras células em apoptose. A ciclosporina e a rapamicina são potentes imunossupressores. Foi demonstrado que pacientes em tratamento com ciclosporina muitas vezes desenvolvem autoimunidade ao contrário daqueles que estão privados do fármaco. Esta autoimunidade tem sido relacionada à inibição das células T em apoptose. Por outro lado a rapamicina promove a indução de apoptose, aumentando a indução da tolerância por aumento das células T em apoptose (35, 36, 37).

As investigações dos mecanismos nos quais as células apoptóticas afetam o sistema imune não serão somente úteis para um melhor entendimento do significado da apoptose durante a resposta imune, mas também auxiliarão na

busca de novas estratégias para o tratamento de doenças autoimunes e no manejo clínico dos transplantes de órgãos. (32).

### **Apoptose**

Atualmente são conhecidas, de maneira geral, duas formas de morte celular: a necrose e a apoptose. Na necrose as células apresentam características morfológicas e bioquímicas distintas, como aumento de volume celular, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo celular ao microambiente, o que desencadeia um processo inflamatório que pode lesar as células vizinhas. Por outro lado, a apoptose caracteriza-se pela execução de uma morte celular programada que existe em todas as células e que está codificada geneticamente, onde as células se inativam e degradam sua própria estrutura e componentes de maneira coordenada e característica, sem desencadear reação inflamatória (38).

O processo apoptótico pode ser dividido em três etapas: a primeira fase é a de iniciação, na qual a célula recebe o estímulo que a conduz a morte; na segunda fase a de execução, é onde podemos constatar as maiores modificações morfológicas e bioquímicas que caracterizam este processo, e por último, a etapa de eliminação onde os restos celulares são degradados por macrófagos e células adjacentes (39).

Diferentes sinais intra e extracelulares podem desencadear a morte por apoptose. Os intracelulares são, geralmente, originados por *stress* biológico, o qual provoca a liberação do citocromo C da mitocôndria (via intrínseca), já os sinais extracelulares desencadeiam o processo apoptótico ao unirem-se aos seus ligantes presentes nas células alvo (via extrínseca) (39, 40).

Quando um indutor de apoptose chega a sua célula alvo, consegue penetrar nela através de intermediários que direcionam este sinal ao encontro de um complexo enzimático, responsável pelas mudanças que a célula sofrerá durante a apoptose. Este complexo é constituído principalmente por caspases. Atualmente, existem descritas na literatura 12 diferentes caspases em humanos. Tanto a apoptose por via intrínseca como a apoptose por via extrínseca, provoca a ativação destas enzimas (41, 42).

Entre as funções das caspases destaca-se a inativação de diversas proteínas, que normalmente protegem a célula da morte, como aquelas envolvidas na reparação do DNA e as encarregadas pela organização do citoesqueleto. Outra função é a indução da expressão de sinais nas células alvo, que as deixam marcadas para serem fagocitadas (43, 44). As caspases que participam da morte apoptótica e sua seqüência de ativação dependem do indutor. Pela via extrínseca, um sinal pró-apoptótico é desencadeado pela ligação de Fas (CD95 ou APO1) com seu ligante FasL(CD95L), que são proteínas de membrana pertencentes à família do fator de necrose tumoral (TNF), esta união provoca o recrutamento do complexo DISC (death inducing signaling complex) ao domínio citoplasmático de Fas. O complexo DISC contém proteínas adaptadoras que permitem a união da pró-caspase 8 , permitindo à caspase 8 ativar as caspases 3, 6 e 7 . Além disso, a caspase 8 pode ativar a Bid (membro pró-apoptótico da família Bcl-2) e esta, induzir a liberação do citocromo C e Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) das mitocôndrias para formar o apoptosoma e ativar também a via intrínseca (39, 40). Existem várias moléculas que participam da

regulação da apoptose, e de acordo com sua estrutura podemos agrupá-las em famílias, as mais importantes são: as IAPs (inhibitors of apoptosis proteins), as proteínas pertencentes a família da Bcl-2 e as FLIP (FLICE(caspase 8)-inhibitory proteins). Dentre os membros da família Bcl-2 encontramos moléculas pró e anti-apoptóticas. As proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-x<sub>L</sub>) encontram-se na membrana externa inibindo a liberação do citocromo C, os membros pró-apoptóticos (Bad, BID, Bax e Bim) estão no citosol e se translocam para a mitocôndria após receber o sinal, onde promovem a liberação do citocromo C (Figura 2).

**Figura 2.** Representação esquemática dos mecanismos de sinalização de apoptose. Modificado de Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature 2000.

A molécula de FasL se expressa predominantemente na superfície dos linfócitos Th1 ativados, interagindo na regulação da resposta imune. A ligação do Fas ao seu ligante FasL induz morte celular por apoptose, através de mecanismos

ainda não bem elucidados. Existem vários mecanismos de reconhecimento das células em apoptose, o qual parece ser um evento conjunto que envolve vários receptores, que podem funcionar isoladamente, simultaneamente ou seqüencialmente (45, 46).

Vários estudos têm demonstrado o papel crítico de Fas e seu ligante na regulação do sistema imune. Quando a ausência de células mortas foi relacionada a defeitos nos genes Fas e FasL, a tolerância imunológica não foi detectada, indicando a importância das células apoptóticas na manutenção da tolerância imunológica (47-50).

A ativação de células T e morte celular induzida por ativação (AICD *activation induced cell death*) parece que são mecanismos importantes na indução de tolerância periférica do enxerto. Refaeli e colaboradores estudaram o papel de Fas, no controle da AICD mediada por IL-2, demonstrando que na ausência desta o Fas não pode recrutar os componentes chave para a execução do processo apoptótico (51). O crítico papel de Fas /FasL na AICD e na homeostase periférica é incontestável. Demonstrou-se que camundongos aos quais o gene que codifica a produção de IL-2 foi inativado por recombinação homóloga (*knockout*) desenvolveram uma profunda deficiência na apoptose mediada por fas *in vitro*, o que demonstra um defeito na sinalização de Fas na ausência de IL-2 (29).

Na fase de eliminação, ocorre mais de um mecanismo de reconhecimento, que assegura a remoção eficiente das células apoptóticas principalmente por fagócitos profissionais; existem evidências de que fagócitos não profissionais

como células dendríticas, epiteliais e fibroblastos também participam desta etapa (52).

Como mencionado anteriormente, o processo de apoptose não induz resposta inflamatória e isto parece ocorrer não somente pela célula apoptótica ser removida rapidamente, sem liberar seu conteúdo citoplasmático, mas também, por que a mesma célula apoptótica induz no fagócito a síntese e a secreção de moléculas antiinflamatórias.

### **Métodos de Avaliação de Apoptose**

Existem diversos métodos para detectar ou quantificar apoptose. A maioria deles detecta alterações nucleares que ocorrem nas células durante este processo como a diminuição do tamanho, a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA (53).

A aplicação de técnicas de biologia molecular através de métodos mais sensíveis e específicos como a reação em cadeia da polimerase (PCR), com a identificação de transcritos de genes citotóxicos pode indicar a presença de um processo patogênico que necessite tratamento, ou pelo menos imunossupressão profilática mais eficiente para proteção do enxerto renal (54, 55). Diversos estudos empregando estes métodos têm demonstrado a presença de transcritos de genes citotóxicos na rejeição (56, 57), entre eles o FasL que também tem sido fortemente relacionado com a morte celular programada (47,48).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica conceitualmente simples para análise de ácidos nucléicos, desenvolvida por Kary Mullis em 1985

(58). O surgimento desta técnica teve grande impacto e ela vem sendo, desde então, muito utilizada em estudos moleculares.

A reação pode ampliar seletivamente uma única molécula de DNA mais de um milhão de vezes em algumas horas e permite a detecção de seqüências de genes específicos na amostra de um paciente sem a necessidade de clonagem ou do uso de outras técnicas como *Southern* ou *Northern blotting*. Além disto as análises podem ser realizadas a partir de concentrações muito baixas da seqüência alvo (59, 60).

A PCR baseia-se na amplificação *in vitro* de seqüências de ácido desoxirribonucléico (DNA). Essa técnica, além de muito eficiente, não depende de proliferação biológica, utilizando-se apenas de uma característica físico-química do DNA, o seu comportamento quando exposto a diferentes temperaturas (59, 60). A característica mais importante da reação é que a enzima polimerase é direcionada para sintetizar uma região específica do DNA, resultando na amplificação desta região. A técnica é extremamente sensível, mas também está sujeita a problemas técnicos e de contaminação. A PCR está esquematicamente representada na Figura 3 abaixo e descrita a seguir.

**Figura 3.** Princípio da reação em cadeia da polimerase. Após os ciclos de amplificação são criadas múltiplas cópias da seqüência a ser analisada. Modificado da referência 59.

O material inicial para a execução de uma PCR é um DNA que contenha a seqüência-alvo a ser amplificada. Não é necessário isolar a seqüência a ser amplificada, pois esta é definida pelos *primers* ou iniciadores utilizados na reação. A quantidade de DNA necessária para uma PCR é muito pequena, menos que um micrograma de DNA é suficiente (61). O fragmento é flanqueado por dois iniciadores da reação. Estes são oligonucleotídeos curtos que se hibridizam com os filamentos opostos do molde e desencadeiam a síntese da seqüência de DNA complementar pela enzima DNA polimerase.

As condições iniciais para amplificação, hibridização e anelamento devem ser definidas para cada par de *primers*. Cuidados especiais devem ser tomados

para evitar contaminações, o que representa um grande problema para esta técnica. A PCR é executada em termocicladores, que são aparelhos onde as temperaturas correspondentes a cada protocolo são programadas para cada ciclo da reação (59). Os ciclos de amplificação são repetidos diversas vezes (em geral de 25 a 40) e originam novos moldes para a próxima reação, resultando na amplificação exponencial da seqüência alvo, conforme demonstrado na Figura 3.

Além da avaliação do DNA, pode-se avaliar a presença de mensagem genética para a translação protéica, através do isolamento de ácido ribonucléico (RNA) seguido de transcrição reversa pela ação da enzima transcriptase reversa, levando à síntese do DNA complementar. Este pode ser submetido à PCR e a sua presença, para um determinado gene indica a presença do sinal para a translação protéica. Esta reação é denominada RT-PCR, ou seja, a PCR precedida de transcrição reversa a qual foi submetido o RNA (59), conforme apresentado na Figura 4.

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

analisada. A utilização desta técnica permite estudos de expressão gênica com número muito pequeno de células e RNA (58, 62).

**Figura 4.** Esquema representando a expressão genética desde a replicação e a transcrição do DNA, a transcrição reversa do RNA ao DNA complementar e a translação protéica. Modificado da referência 59.

O produto final de uma PCR é, em geral, separado em gel de agarose ou acrilamida. O gel é corado com brometo de etídeo, que tem a capacidade de intercalar-se nas hélices duplas do DNA ligando-se às pontes de hidrogênio existentes na molécula e tornando possível a sua visualização sob luz ultravioleta (63).

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

atuam na fase efetora da resposta imune. Assim, estudos envolvendo a expressão e a quantificação de perforina, granzima B, Fas ligante e diversas outras citocinas ligadas à rejeição do enxerto têm sido conduzidos por diferentes pesquisadores na busca de métodos moleculares auxiliares para o diagnóstico da rejeição aguda (63-65).

A identificação dos linfócitos T com propriedades citotóxicas foi demonstrada inicialmente por Strom e colaboradores (66), através da fenotipagem do infiltrado mononuclear em rins com rejeição irreversível. Posteriormente, utilizando a técnica do PCR competitivo, Strehlau e colaboradores detectaram em rins com critérios histológicos de rejeição aguda um aumento estatisticamente significativo da expressão dos genes de IL-7, IL-10, IL-15, Fas ligante, perforina e granzima B (67). Neste estudo a análise simultânea de perforina, granzima B e Fas ligante foi capaz de identificar rejeição aguda mesmo em órgãos com infiltrados leves, com uma sensibilidade e especificidade de 100%. Achados semelhantes foram descritos por Sharma e colaboradores que demonstraram a co-expressão intraenxerto de duas vias citolíticas distintas, Fas e Fas ligante, granzima B e perforina, correlacionando positivamente o nível de RNAm dos genes que codificam para estas moléculas com a severidade histológica da rejeição aguda (68). Recentemente, Dias e colaboradores demonstraram a presença de transcritos dos genes Fas ligante, granzima B e perforina, em biópsias renais protocolares de pacientes com rejeição subclínica (RSC) (69).

A citometria de fluxo representa um importante recurso diagnóstico e prognóstico na análise celular. O processo de apoptose também vem sendo

amplamente estudado por este método, onde se pode analisar a fragmentação do DNA, assim como alguns marcadores de membrana através da utilização de corantes fluorescentes (70). A Anexina V é uma proteína que combinada com fluorocromo é muito utilizada como marcador de apoptose por sua alta afinidade pela fosfatidilserina.

Na fase inicial de apoptose as células perdem a simetria da membrana celular e como consequência, ocorre a exposição de moléculas de fosfatidilserina (FS), a anexina V liga-se a esta, marcando então a membrana da célula com fluorescência verde, que é detectada pelo citômetro de fluxo que é um equipamento óptico e hidráulico com a função de analisar estas células marcadas.

As células em suspensão são aspiradas pelo citômetro e atravessam a câmara de fluxo, onde o laser incide sobre elas, levando à dispersão da luz. Esta dispersão é detectada por um conjunto óptico que distingue os ângulos e a cor gerada pelo fluorocromo fixado à estrutura da célula. O ângulo de dispersão frontal analisa o volume da célula, e o lateral a complexidade citoplasmática. Ainda no ângulo lateral, um complexo de filtros e espelhos captam e separam as cores por seus comprimentos de onda e os distribuem aos fotomultiplicadores, onde os pulsos elétricos são transformados em informações digitais para a criação de histogramas.

### **Transplante de órgãos e apoptose**

Nos transplantes de órgãos a forma ideal de imunossupressão é aquela que induz tolerância específica ou a deleção das células T reativas do receptor.

Alguns pesquisadores sugerem que a apoptose após o transplante tem duplo papel, um prejudicial ao enxerto durante a rejeição e outro benéfico envolvendo a deleção de linfócitos aloreativos. (71, 72).

Carroll e colaboradores sugeriram a possibilidade de aceleração e extensão de apoptose *in vitro* mediada por Fas, como sendo uma estratégia para deleção de células T que respondem ao aloantígeno após o transplante de órgãos e na rejeição do aloenxerto. Assim, a remoção de células T específicas contra o doador, seria uma importante estratégia para indução de tolerância ao órgão transplantado (73).

A AICD é fundamental para a sobrevivência da espécie e é dependente da IL-2. Camundongos *knockouts* para IL-2 (IL-2KO) apresentam AICD deficiente, desenvolvendo doenças linfoproliferativas e auto-imunes (29).

No transplante de órgãos a IL-2 apresenta dois principais mecanismos regulatórios. O aumento da IL-2 leva a uma expansão clonal de células citotóxicas; já sua diminuição induz a AICD. O bloqueio da produção de IL-2 atua nos dois mecanismos, assim como os imunossuppressores ciclosporina e tacrolimus. Estes fármacos atuam no bloqueio de indução da AICD, inibindo ou bloqueando a apoptose dos clones de células regulatórias, dificultando assim os mecanismos de adaptação e tolerância (29, 74).

No sistema imune a AICD é um processo importante que contribui para indução de tolerância periférica para antígenos próprios. A AICD pode ser mediada por várias rotas moleculares, incluindo as vias de Fas e TNF-regulação. Wells e colaboradores demonstraram, em modelos experimentais, que células T

apoptóticas foram requeridas para a indução de tolerância periférica no transplante por bloqueio das vias de co-estimulação CD28 e/ou CD154 (75).

### Referências Bibliográficas

1. Cecka JM. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. Clin Transplant 1999; 1-21.
2. Morris PJ. Results of Renal Transplantation. In: Morris PJM, editor. Kidney Transplantation. Principles and Practice. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995.
3. Manfro RC, Gonçalves LF, Veronese FV e cols. Aspectos clínicos, rotinas e complicações do transplante renal. In: Barros E, Manfro RC, Thomé FS, Gonçalves LF, editores. Nefrologia. Rotinas, Diagnóstico e Tratamento. 2 ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1998. p. 475-500.
4. Hariharan S, Jonhson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, Mcintosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in The United States. N Engl J Med, 2000; 342: 605-12.
5. Bastos MG, Medeiros R, Manfro, RC. Transplante renal. Revista da Associação Médica do Brasil 1994; 40: 283- 92.
6. Abbas AK, Lichitman AH, Prober JS. Cellular and molecular immunology. 3th ed. USA;1997:section 17.
7. Jordan SC, Quartel AW, Czer LS et al. Posttransplant therapy using high-dose human immunoglobulin (intravenous gammaglobulin) to control acute humoral rejection in renal and cardiac allograft recipients and potential mechanism of action. Transplantation 1998; 66: 800-5.

8. Di Renzo M. Enhanced apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in cardiac transplanted patients undergoing chronic immunosuppressive treatment. *Transplant Immunol*, 2002; 10: 269-275.
9. Vathasla A, et al. Inhibition of apoptosis in ant-CD3 treated peripheral blood lymphocytes by immunosuppressive drugs. *Transplant Proc* 2000; 32:1992-94.
10. Strom TB, Tilney NL, Carpenter CB, Busch GJ. Identity and cytotoxic capacity of cells infiltrating renal allografts. *N Eng J Med* 1975;292(24):1257-63.
11. Strom TB, Tilney NL, Paradysz JM, Bancewicz J, Carpenter CB. Cellular components of allograft rejection: identity, specificity, and cytotoxic function of cells infiltrating acutely rejecting allografts. *J Immunol* 1977; 118(6):2020-26.
12. Dalman MJ, Morris PJ Immunology of rejection In: Morris PJ *Kidney Transplantation, Principles and Practice*. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995.
13. Roitt, I. *Roitt's essential immunology*. 9th. Ed. Berlin: Blackwell Science, 1997.
14. Powis SH, Trowsdale J. Major and minor histocompatibility antigens. In: Thomson, AW, Catto, GRD, editors. *Immunology of Renal Transplantation*. 1st ed. London:Edward Arnold; 1993. p. 3-26.
15. Sayegh MH, Perkins DL, Carpenter CB. Transplantation Immunobiology. In: Brenner B, Rector, editors. *The Kidney*. 6th ed., Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. p. 2518-41.

16. Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* 1990; 59:253-88.
17. Carpenter CB. Histocompatibility systems in man. In: Ginns LC, Cosimi AB, Morris PJ, editors. *Transplantation*. 2nd ed. Boston: Blackwell Science; 1999. p. 61-72.
18. Opelz G, Mytilineos J, Wujciak T, Schwarz V, Back D. Current status of HLA matching in renal transplantation. The Collaborative Transplant Study. *Clin Investig* 1993; 70:767-72.
19. Coelho V, Caldas C, Calil J. *Imunobiologia do Transplante Renal* in: Manfro RC, Noronha IL, Silva F<sup>o</sup> A. *Manual de Transplante Renal*. 1<sup>a</sup> ed. Manole Ltda, 2004.
20. Tan P, Anasetti C, Hansen JA, Melrose J, Brunwand M, Bredshaw J, et al. Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. *J Exp Med* 1993; 177: 165-73.
21. Lenschow DJ, Zeng Y, Hathcock KS. Inhibition of transplant rejection following treatment with anti-B7-2 and anti-B7-1 antibodies. *Transplantation* 1995; 60:1171-8.
22. Manfro RC, Gonçalves LF, Saitovich D. *Imunologia e farmacologia das drogas imunossupressoras*. In: Barros EJJ, Manfro RC, Thomé FS, Gonçalves LF, editores. *Nefrologia. Rotinas, Diagnóstico e Tratamento*. 2nd ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1998. P. 463-74.

23. Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. *N Eng J Med* 1994; 331:365-76.
24. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia molecular da célula*. 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas. 1997.
25. Liu CC, Walsh CM, Young JDE. Perforin: structure and function. *Immunol Today* 1995; 16: 194-201.
26. Diasio RB, Lobuglio AF. Imunomoduladores: imunossupressores e imunoestimulantes in: Gilman AG et al.(ed.) *Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. 9 ed. Recife: Guanabara Koogan.1997.
27. Salmon SE. Imunossupressores In: Katzung BG *Farmacologia Básica e Clínica*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. Manfro RC, Gonçalves LFS, Saitovich David. Revisão/Atualização em Transplante Renal: Progressos na indução de tolerância em transplante humanos. *J Bras Nefrol* 1999; 21(3):130-142.
28. Manfro RC, Gonçalves LFS, Saitovich D. Revisão/Atualização em Transplante Renal: Progressos na indução de tolerância em transplante humanos. *J Bras Nefrol* 1999; 21(3):130-142.
29. Li XC, Wells AD, Strom TB, Turka LA. The role of cell apoptosis in transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:522-527.
30. Chen JJ, Sun Y, Nabel GJ. Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science* 1998; 282:1714-1717.

31. Steinmam RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. the induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000; 191:411-416.
32. Sun EW, Shi YF. Apoptosis: the quiet death silence the immune system. *Pharmacology & Therapeutics* 2001; 92:135-145.
33. Gewies A. ApoReview: Introduction to Apoptosis [2003], Disponível em <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/apointro.pdf>
34. Warner GL, Ludlow JW, Nelson DA, Gaur A, Scott DW. Anti-immunoglobulin treatment of murine B- cell lymphomas induces active transforming growth factor beta but pRB hypophosphorylation is transforming growth factor beta independent. *Cell Growth Differ* 1992; 3: 175-181.
35. Shi YF, Sahai BM, Green DR. Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature* 1989; 339:625-626.
36. Shi YF, Frankel A, Radvanyi LG, Penn LZ, Miller R, Mills GB. Rapamicin enhances apoptosis and icreases sensitivity to cisplatin in vitro. *Cancer Res* 1995; 55:1982-1988.
37. LI Y, Li XC, Zheng XX, Wells AD, Turka LA, Strom TB. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T-cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med* 1999; 5:1298-1302.
38. Ameisen JC. The origin of programmed cell death. *Science* 1996; 272:278-1279.

39. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407:770-776.
40. Nagata S. Fas Ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* 1999; 33:29-55.
41. Mehmet H. Caspases find a new place to hide. *Nature* 2000; 403: 29-30.
42. Thornberry NA, Lazabnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998; 281:1312-1316.
43. Kathakota S. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997;278:294-298.
44. Platt N, Da Silva RP, Gordon S. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cell. *Trends. Cell Biol* 1998; 8:365-372.
45. Larsen CP, Alexander DZ, Hendrix R, Ritchie SC, Pearson TC. Fas-mediated cytotoxicity. An immunoeffector or immunoregulatory pathway in T cell-mediated immune response? *Transplantation* 1995; 60(3): 221-4.
46. Dhein J, Walczak H, Bäuml C, Debatin KM, Kramer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 1995; 373:438-441.
47. Kasprzycka M, Klodos K, Nowaczyk M, Wyzgal J, Podobinska I, Durlik M. et al. Expression of FasL gene in T cells of renal allograft recipients. *Immunology Letters* 2002; 80:9-13.
48. Pinti M, Troiano L, Nasi M, Monterastelli E, Moretti L, Bellodi C. Development of real time PCR assays for the quantification of Fas and FasL m

RNA levels in lymphocytes: studies on centenarians. *Mechan Age Devel* 2003; 124:511-516.

49. Swenson KM, Ke B, Wang T, Markowitz JS, Maggard MA, Spear GS, et al . Fas ligand gene transfer to renal allografts in rats: effects on allograft survival. *Transplantation* 1998; 65(2):155-60.

50. Brunner T, Yoo NJ, Griffith TS, Ferguson TA, Green DR. Regulation of CD95 ligand expression: a key element in immune regulation? *Behring Inst Mitt* 1996; 97:161-74.

51. Refaeli Y, Van Parijs L, London CA, Tschopp J, Abbas AK. Biochemical Mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* 1998;8:615-23.

52. Gregory CD, Cd14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to the immune system. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:27-34.

53. Camargo SMR, Schor N. Mecanismos de morte celular: apoptose versus necrose. IN: Schor N, Boim MA, Pavão dos Santos OC, editores. *Medicina Celular* p.133-140.

54. Rush DN, Nickerson P, Gough J et al. Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 2129.

55. Nickerson P, Jeffery J, Gough J et al. Effect of increasing baseline immunosuppression on the prevalence of clinical and subclinical rejection: a pilot study. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1801.

56. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M et al. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94: 695.
57. Lipman ML, Stevens AC, Strom TB. Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts. J Immunol 1994; 152: 5120.
58. Saik RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf S., Higuchi R, Horn GT, Mullis KB. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239:487-91.
59. Manfro RC, Barros EJJ, Saitovitch D. Introdução à biologia celular e molecular In: Barros EJJ, Manfro RC, Thomé FS, Gonçalves LFS e colaboradores Nefrologia: Rotinas, Diagnóstico e Tratamento. 2 ed. Ed. Artes Médicas Sul, Porto Alegre, 1999.
60. Passaglia LMP, Zaha A. Técnicas do DNA recombinante In: Zaha A Biologia Molecular Básica. Ed. Mercado Aberto. Porto Alegre, 1996.
61. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Recombinant DNA. 2 ed. New York: Scientific American Books, W.H. Freeman and Company, 1992.
62. Eisenstein BI. The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. N Eng J Med 1990; 322:178-83.
63. Sambrook J, Fritsch EI, Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, cap. 6,1989.

64. Pavlakis M, Lipman M, Strom TB. Intragraft expression of T-cell activation genes in human renal allograft rejection. *Kidney Int* 1996; 53 Suppl 1:7-12.
65. Vasconcellos LM, Asher F, Schachter D, Vasconcellos LH, Shapiro M, Harmon WE et al. Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation* 1998; 66: 562-6.
66. Strom TB, Tilney NL, Paradysz JM, Bancewicz J, Carpenter CB. Cellular components of allograft rejection: identity, specificity, and cytotoxic function of cells infiltrating acutely rejecting allografts. *J Immunol* 1977; 118:2020-26.
67. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L, Harmon W, et al. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:695-700.
68. Sharma VK, Bologa RM, Li B, Xu GP, Lagman M, Hiscock W, et al. Molecular executors of cell death - differential intrarenal expression of Fas ligand, Fas, granzyme B, and perforin during acute and/or chronic rejection of human renal allografts. *Transplantation* 1996; 62:1860-6.
69. Dias ECA, Veronese FJ, Gonçalves LF, Manfro RC. Molecular markers of acute subclinical rejection of renal transplants. *Clin Transplant* 2004; 18:281-287.
70. Bauer KD, Duque RE, Shankey TV. Technical Aspects. In: *Clinical Flow Cytometry Principles and Application*. Library of Congress, 1993.

71. Krams SM. New approaches to inducing the death of alloreactive lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 2001; 126:371-373.
72. Quian S, Lu L, Fu F, et al. Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allograft. *J Immunol* 1997; 158:4654-61.
73. Carrol HP, Ali S, Kirby JÁ. Accelerating the induction of Fas-mediated T cell apoptosis: a strategy for transplant tolerance? *Clin Exp Immunol* 2001; 126:589-597.
74. Larsen CP, Alexander DZ, Hendrix R, Ritchie SC, Pearson TC. Fas-mediated cytotoxicity. An immunoeffector or immunoregulatory pathway in Tcell-mediated immune responses? *Transplantation* 1995; 60:221-4.
75. Wells AD, Li XC, LI Y, et al. Requirement for T-cell apoptosis in induction of peripheral transplantation tolerance. *Nat Med* 1999; 5:1303-1307.

## **II. OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Avaliar a ocorrência de apoptose em cultura de células mononucleares periféricas de pacientes transplantados renais, em diferentes momentos pós-transplante.

### **Objetivos Específicos**

- Comparar a indução de morte celular por ativação em células mononucleares periféricas de transplantados renais em relação a controles sadios.

- Verificar se existem diferenças na incidência de morte celular induzida por ativação nos linfócitos de transplantados renais em relação ao tempo pós-transplante e o esquema imunossupressor.

- Avaliar, através da expressão dos genes FasL e IL2, a via envolvida na indução da morte celular por ativação.

### **III. Avaliação de apoptose em linfócitos de sangue periférico de pacientes transplantados renais**

Virna Nowotny Carpio

Esther Cristina Aquino Dias

Taísa Aozani Prochnow

Luiz Felipe Santos Gonçalves

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

Titulo Resumido: **Avaliação de apoptose em transplantados renais**

### **III. Artigo - Avaliação de apoptose em linfócitos de sangue periférico de pacientes transplantados renais**

#### **Resumo**

O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de células apoptóticas em sangue periférico de transplantados renais e controles normais por citometria de fluxo, assim como a expressão dos genes FasL e IL-2 por reação em cadeia da polimerase. Estudaram-se 3 grupos: grupo 1=Tx renais < 1 ano (n=17), grupo 2=Tx renais > 5 anos (n=15), grupo 3=controles sadios (n=7). A separação de mononucleares foi realizada com Ficoll-Hypaque, sendo que uma alíquota foi utilizada para extração de RNA. Parte das células extraídas foram estimuladas em cultura com fitohemaglutinina a 1% em meio de cultura RPMI. Avaliou-se o percentual de células apoptóticas após 48h por citometria de fluxo com Anexina V. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As variáveis estudadas foram: apoptose, grupo, idade, sexo, etnia, tipo de imunossupressão: tríplice com prednisona, ciclosporina e azatioprina (A), tríplice com prednisona, ciclosporina e micofenolato (M) ou tríplice com prednisona, micofenolato e tacrolimus (T). Após a extração do RNA e transcrição reversa, realizou-se a reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para os genes GAPDH, Fas-L e IL-2. Análise estatística:  $\chi^2$ , ANOVA, coeficiente de correlação de Pearson, significância,  $P < 0,05$ . Houve aumento estatisticamente significativo no percentual de células apoptóticas nos grupos 1 ( $42 \pm 4$ ) e 2 ( $37 \pm 3$ ) em relação ao grupo 3 ( $27 \pm 2$ );  $P=0,000$ , ANOVA). Também observou-se aumento significativo do percentual de células apoptóticas

no grupo 1 em relação ao grupo 2 ( $P=0,004$ , ANOVA). Encontrou-se uma correlação negativa entre o percentual de apoptose e o tempo pós-transplante ( $r=-0,489$ ,  $P=0,005$ , coeficiente de correlação de Pearson). Não houve diferença significativa no percentual de células apoptóticas em relação ao tipo de imunossupressão. Não houve diferença estatisticamente significativa do percentual de células apoptóticas entre idade, sexo e etnia, quando analisados em relação ao grupo ou tipo de imunossupressão. Encontrou-se associação significativa entre a expressão de FasL e o grupo 1 em relação ao 2 ( $88,2\% \times 0\%$ ,  $P=0,000$ ). Houve uma associação significativa na expressão de FasL nos protocolos imunossupressores T, M em relação ao protocolo A ( $100\% \times 65\% \times 8,3\%$ ,  $P=0,001$ , Qui Quadrado). Concluiu-se que os linfócitos periféricos de pacientes transplantados renais apresentam maior suscetibilidade à morte celular induzida por ativação, com maior magnitude no período pós-transplante mais recente e que há envolvimento da via Fas-FasL neste processo.

**Palavras chaves:** apoptose, transplante renal, FasL, IL-2.

**Autor para correspondência**

Dr. Luiz Felipe Santos Gonçalves

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Serviço de Nefrologia

Ramiro Barcelos, 2350, sala 2030

Porto Alegre, RS, Brasil. 90035-003

Email: [lfgoncalves@hcpa.ufrgs.br](mailto:lfgoncalves@hcpa.ufrgs.br)

Fax: 51 21018121

## Introdução

A apoptose é um processo natural de morte celular, responsável pela manutenção do balanço homeostático em organismos multicelulares (1-7). Nos transplantes de órgãos e tecidos as rotas de apoptose vêm sendo investigadas, devido a sua estreita relação com a indução de tolerância ao aloenxerto (3).

No sistema imune, uma maneira dos linfócitos entrarem em apoptose é através da AICD (morte celular induzida por ativação), um importante processo fisiológico que contribui para a regulação da resposta imune e na indução de tolerância periférica (8).

A apoptose de células T e AICD são controladas por citocinas de sobrevivência como a IL2 e por fatores indutores de morte como o TNF (Fator de Necrose Tumoral) e Fas ligante (FasL). A principal via para a AICD utiliza a interação Fas-FasL, que garante a eliminação das células T ativadas e tem um papel crucial na manutenção da homeostase dos linfócitos (9).

A maneira pela qual a IL-2 regula a AICD e a tolerância ao aloenxerto não esta totalmente elucidada. Na ausência de IL-2 o Fas não pode recrutar os componentes chave para a execução do processo apoptótico (10). Camundongos *knockout* para o gene de IL-2 desenvolvem uma profunda deficiência na apoptose mediada por Fas *in vitro*, o que demonstra um defeito na sinalização de Fas na ausência de IL-2 (11).

A associação da AICD e transplante de órgãos foi demonstrada por Wells e colaboradores em modelos experimentais, onde as células apoptóticas foram requeridas para a indução de tolerância periférica por bloqueio das vias de co-

estimulação CD28 e/ou CD154 (12). Outros estudos demonstraram que a injeção intratímica de células linfóides do doador tem sido usada para prolongar a sobrevivência de aloenxertos hepáticos e cardíacos, possivelmente através da indução da AICD em células T aloreativas (13,14). Além disso, alguns fármacos imunossupressores que são utilizados na clínica do transplante podem, em parte, exercer seu efeito através da modulação da AICD (15,16).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de morte celular por apoptose em linfócitos periféricos de pacientes transplantados renais em diferentes momentos pós-transplante. Também avaliamos a expressão dos genes Fas ligante (Fas L) e interleucina 2 (IL-2) nos mesmos grupos.

## **Pacientes e Métodos**

### **Pacientes**

O estudo envolveu dois grupos de pacientes transplantados renais adultos e um grupo controle. O primeiro grupo foi de dezessete pacientes transplantados renais estáveis entre 6 e 12 meses pós-transplante. O segundo grupo composto por quinze pacientes transplantados renais estáveis, em acompanhamento a mais de cinco anos. No grupo controle foram incluídos sete indivíduos normais. Os grupos foram pareados por sexo, idade e etnia. O tipo de imunossupressão utilizado nos pacientes também foi avaliado nas análises. Foram incluídos apenas transplantados renais com creatinina sérica inferior a 2 mg/dL. Todos os pacientes avaliados estavam livres de neoplasia, infecção bacteriana e infecções pelo HIV, HCV e HBV.

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

## **Métodos**

### **Condições das culturas de células**

Foram coletadas amostras de sangue periférico em tubos com EDTA. As células mononucleares foram isoladas através de centrifugação em gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Suécia). Para cada amostra a cultura foi feita em triplicata como segue: meio de cultura RPMI 1640, suplementado com soro bovino fetal (10%), penicilina–estreptomicina (1%) 100 U/ml (Gibco, Paisley, Reino Unido) e fitohemaglutinina 1% (St. Louis, Estados Unidos da América).

### **Avaliação de apoptose por citometria de fluxo**

Após 48 horas em cultura, a viabilidade das células foi confirmada por microscopia óptica utilizando o corante azul de tripan (Gibco, NY, Estados Unidos da América), a concentração foi ajustada para  $1 \times 10^5$  células/mL e a análise por citometria de fluxo foi feita utilizando-se o Kit Annexin V-EGFP Apoptosis Detection (Alexis Biochemicals®, San Diego, CA), no equipamento FACScan

(Beckton & Dickinson, Heidelberg, Alemanha). As células foram marcadas simultaneamente com anexina V-EGFP e com corante iodeto de propídeo (PI), permitindo uma discriminação das células viáveis (EGFP-PI-), em apoptose (EGFP+ PI-) e em necrose (EGFP+ PI+). A análise de apoptose no citômetro de fluxo foi feita por *dot plot* onde no eixo X (FL1) mostra em escala logarítmica a fluorescência da Annexina V-EGFP e no eixo Y (FL2) mostra a fluorescência do iodeto de propídeo. No *dot plot* as células viáveis são reconhecidas no quadrante inferior a esquerda (EGFP-PI-), as células em apoptose no quadrante inferior a direita (EGFP+PI-) e as células em necrose no quadrante superior a direita. A avaliação dos dados de 10.000 eventos por amostra foi realizada através do software CellQuest® (Becton Dickinson, Califórnia).

### **Análise de FasL e IL2 por RT – PCR**

Amostras de linfócitos extraídos de sangue periférico dos pacientes foram armazenadas para extração de RNA, a qual foi feita utilizando-se o método Rneasy mini kit (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA) de acordo com as instruções do fabricante e estocado à -70°C para posterior análise por RT-PCR. A transcrição reversa foi executada em três etapas: (a) em um tubo para microcentrifuga de 0,5 ml, preparou-se a mistura de componentes para o volume de 31µl: 10 µl de tampão “First Strand” (5x); 10 µl de deoxinucleotídeos (dNTPs) com 10 mM de cada base (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); 5 µl de Ditiotretol (DTT) 0,1 M; 1 µl de albumina bovina acetilada (20 µg/ml); 1 µl de RNAsin (inibidor de ribonuclease) 40

U/μl; 2 μl de *primers* de hexanucleotídeos (oligo-dt<sub>12-18</sub> - 0,1 ug/μl); 2 μl da enzima transcriptase reversa do vírus Moloney murine leucemia (RVT- MMLV [200 U/μl]). (b) 1 a 10 μg do RNA total, elevando-se seu volume a 19 μl com água DEPC, completando o volume final de 50 μl de reação. Esta preparação foi incubada a 65°C por 10 minutos e mantida no gelo por mais 5 minutos. (c) adicionou-se o RNA linearizado à primeira mistura completando o volume final de 50μl de reação. Para síntese de DNA complementar foram utilizadas as seguintes temperaturas: 37°C por 1 hora; gelo picado por 5 minutos; 65°C por 10 minutos e gelo picado seguido de congelamento a - 70°C.

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

Os controles positivos para expressão dos genes FasL e IL-2 foram obtidos a partir de cultura de linfócitos estimulados com fitohemaglutinina (1%) e OKT3(1mg/ml).

As seqüências dos *primers* utilizadas foram:

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

(b) FasL – (5' sense: ATTCTTTGTTACAGGCACCG e 3' antisense: GAGTTGATTGTCAGGAAGCA), que resultam em um fragmento de 696 pb.

(c) IL-2 – (5' sense: GAATGGAATTAATAATTACAAGAATCCC e 3' antisense: TGTTTCAGATCCCTTTAGTTCCAG, que resultam em um fragmento de 222 pb.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 2%, evidenciados com brometo de etídeo por transiluminação com luz ultravioleta e fotografados pelo software de captura de imagens Kodak Digital Science<sup>®</sup> (Rochester, Estados Unidos da América).

### **Análises Estatísticas**

Empregou-se o teste de  $\chi^2$  para a verificação de associação entre variáveis categóricas o teste t de Student e a Análise de Variância para as variáveis contínuas e o coeficiente de correlação de Pearson. O nível adotado para a significância estatística foi o de  $P < 0,05$ .

### **Resultados**

As amostras de cultura de células mononucleares de sangue periférico foram analisadas em 32 pacientes em diferentes momentos pós-transplante e 7

indivíduos normais. Do grupo controle (n=7) participaram voluntários sadios, o grupo transplantados recentes (n=17) foi de transplantados de 6 a 12 meses ( $9 \pm 2$  meses), e no grupo transplantados tardios (n=15), o tempo pós-transplante foi de mais de cinco anos ( $80 \pm 13$  meses).

Três protocolos de imunossupressão foram utilizados nos pacientes incluídos no estudo: (A) – prednisona, ciclosporina e azatioprina; (M) – prednisona, ciclosporina e micofenolato mofetil; (T) – prednisona, micofenolato mofetil e tacrolimus. O percentual de células apoptóticas foi avaliado em relação aos diferentes grupos e ao tipo de imunossupressão, individualmente e em combinação.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre idade, sexo e etnia, quando analisados em relação aos grupos de transplantados ou controle ou tipo de imunossupressão. Verificou-se um aumento estatisticamente significativo no percentual de células apoptóticas nos grupos de transplantados renais recentes ( $42 \pm 4$ ) ou tardios ( $37 \pm 3$ ) em relação ao grupo controle ( $27 \pm 2$ ); ( $P < 0,001$ , ANOVA). A percentagem de células apoptóticas também foi significativamente elevada nos transplantados recentes em relação aos transplantados tardios ( $P = 0,004$ , ANOVA) (Tabela 1 e Figura 1). Encontrou-se uma correlação negativa entre o percentual de apoptose e o tempo pós-transplante ( $r = -0,489$ ,  $P = 0,005$ , Pearson).

Em relação aos diferentes protocolos de imunossupressão utilizados não foi encontrada diferença estatisticamente significativa no percentual de apoptose, havendo, no entanto, uma tendência de aumento do mesmo em pacientes que

utilizaram micofenolato mofetil e tacrolimus quando comparados aos pacientes que receberam ciclosporina e azatioprina ( $42 \pm 2$  x  $38 \pm 4$ ,  $P=0,065$ , ANOVA)(tabela 1).

Verificou-se associação estatisticamente significativa entre a expressão do gene FasL e o grupo de transplantados renais recentes em relação aos tardios (88,2% X 0%,  $P<0,001$ ) (Figura 2). Da mesma forma os pacientes que receberam os protocolos com tacrolimus/MMF e ciclosporina/MMF, também apresentaram associação significativa na expressão de FasL em relação aos que receberam ciclosporina/azatioprina (100% X 65% X 8,3%,  $P=0,001$ , Qui Quadrado) (tabela 2).

Não se observou a expressão do gene IL-2 em nenhuma amostra de linfócitos de sangue periférico não estimulados dos pacientes transplantados renais, independente do tempo pós-transplante e do tipo de imunossupressão. A expressão do gene foi observada apenas no controle positivo.

A análise da expressão de FasL em relação aos grupos pós-transplante, excluindo os casos que receberam tacrolimus e micofenolato mofetil (100% de expressão), permaneceu mostrando associação significativa no grupo de transplantados renais recentes em relação aos tardios (83,3% X 0%,  $P=0,000$ , Teste Exato de Fisher). Os percentuais de células apoptóticas detectadas por citometria de fluxo foram superiores nos casos em que ocorreu a expressão de FasL, embora sem atingir diferença estatisticamente significativa ( $41,3 \pm 3,5$  x  $38,3 \pm 4,8$ ,  $P=0,056$ ; ANOVA).

## **Discussão**

A apoptose é um fenômeno que vem sendo intensamente investigado nos últimos anos devido, principalmente, as suas implicações na vida dos organismos desde que são concebidos até sua morte, e principalmente no seu papel em certas doenças e no desenvolvimento de tolerância (1-5). Recentes evidências sugerem que as células apoptóticas participam na regulação do sistema imune durante alguns processos fisiológicos e patológicos como tolerância tímica, tumorigênese e transplantes (7).

A indução de apoptose em linfócitos no contexto da transplantação de órgãos pode estar relacionada ao controle do processo de rejeição aguda mediante a deleção de linfócitos aloreativos (17) e também mais tardiamente, por este mesmo mecanismo, influenciando o desenvolvimento de tolerância (18).

Existem dois mecanismos distintos pelos quais as células T iniciam o processo apoptótico, quais sejam: (a) morte celular induzida por ativação (AICD), o qual é mediado por membros da família do TNF-receptor principalmente via Fas/FasL e; (b) a morte celular passiva que ocorre quando células T ativadas são privadas de fatores de crescimento (3).

No presente estudo, avaliou-se a apoptose de linfócitos em cultura estimulados com mitógeno e a expressão qualitativa dos genes FasL e IL-2 nos mesmos linfócitos previamente à estimulação. As amostras analisadas foram coletadas de pacientes transplantados renais a menos de um ano, pacientes transplantados há cinco anos ou mais e de um grupo controle normal.

Verificou-se um aumento estatisticamente significativo nos percentuais de células apoptóticas nos grupos de transplantados renais recentes e tardios em relação ao grupo controle normal. Achados semelhantes foram descritos por Di Renzo e colaboradores que demonstraram um aumento de apoptose espontânea em linfócitos de pacientes transplantados cardíacos após cultura de 72h em relação a sujeitos normais. Tais achados, semelhantes também àqueles descritos por Ankersmit e colaboradores (9) sugerem que a situação de exposição crônica aos aloantígenos nos linfócitos de transplantados de órgãos, resulta na persistência de linfócitos *primed* e por isto mais suscetíveis à AICD.

Na comparação entre os grupos de transplantados renais verificou-se que o percentual de apoptose foi significativamente maior nos linfócitos de transplantados recentes. Esta observação clínica não foi testada em outros estudos de nosso conhecimento. Realizamos estas comparações na intenção de avaliar, se a diferença nos tratamentos imunossupressores e a diferença do período pós-transplante interfere na ocorrência de AICD. A maior quantidade de células em apoptose no grupo de transplantados recentes pode ser explicada pela presença de população maior de linfócitos aloreativos ou ainda pela magnitude do efeito dos fármacos imunossupressores. Em um estudo com modelo experimental de tolerância em transplante hepático em camundongos são apresentadas evidências histológicas e imunohistoquímicas de que a apoptose de células T CD8+ ocorre no primeiro mês pós-transplante e seria um instrumento para indução de tolerância (19). A importância da AICD como mecanismo pelo qual o sistema imune elimina linfócitos periféricos ativados, mantém a homeostasia e

contribui para o desenvolvimento de tolerância periférica é suportada por alguns estudos (12,20,21).

Embora seja reconhecida a importância da AICD no controle da resposta imune, restam muitas dúvidas sobre a forma como ela acontece e quais os exatos mecanismos que a desencadeiam. Estudos recentes sugerem que, além da deleção de linfócitos alorreativos, a manutenção de tolerância periférica envolveria mecanismos auto-regulatórios ativos (22,23). Assim, o desfecho de um transplante para rejeição ou tolerância dependeria do balanço entre células citopáticas e regulatórias, com o envolvimento de células T com diferentes e ainda não suficientemente caracterizados fenótipos, além de células dendríticas maduras e imaturas (24,25). No contexto da transplantação este fenômeno pode ser influenciado também pelo tratamento imunossupressor. Hirigome e colaboradores mostraram que tanto ciclosporina como glicocorticóides são capazes de promover apoptose em linfócitos, *in vitro*, após ativação com mitógeno (26). Resultados diferentes foram encontrados por Shi e colaboradores em relação a ciclosporina, demonstrando que a mesma inibe a AICD em hibridomas de células T e timócitos (15). Outro estudo, *in vitro*, observou um aumento de células T em apoptose após estimulação com OKT3 em pacientes transplantados renais tratados com micofenolato mofetil quando comparados aos tratados com azatioprina (27). Brunner e colaboradores analisaram a função efetora de fármacos imunossupressores comumente utilizados na prevenção e tratamento da rejeição em diferentes linhagens de células T por indução de apoptose e modulação da ativação, concluindo que ciclosporina e tacrolimus igualmente

previnem a AICD por modulação negativa do FasL (28). Outro estudo com fármacos imunossupressores confirmou os achados de Brunner sugerindo que a terapia imunossupressiva não aumenta apoptose por AICD (18). Dos fármacos testados somente ciclofosfamida e metotrexato incrementaram AICD em células T periféricas. Como houve variação nos protocolos de imunossupressão nos transplantados recentes e tardios em face da introdução de novos fármacos, avaliamos também o percentual de apoptose em relação a este parâmetro. Não encontramos diferença estatisticamente significativa no percentual de apoptose em relação ao esquema imunossupressor utilizado. Porém verificamos uma tendência de aumento de apoptose no grupo que utilizava micofenolato mofetil e tacrolimus em comparação aqueles que receberam azatioprina e ciclosporina. Takahashi e colaboradores avaliaram em cultura de células, o efeito de fármacos imunossupressores na AICD, constatando aumento da apoptose, estatisticamente significativa, nas culturas com micofenolato mofetil comparadas às de rapamicina e ciclosporina A (29). O mecanismo de ação de imunossupressores mais recentes como LF 15-0195, derivado da deoxispergualina, vem sendo estudado. Ducoroy e colaboradores mostraram que este fármaco sensibiliza linfócitos T para AICD por modulação da via Fas/FasL (30). A ausência do efeito da imunossupressão em relação a AICD observada em nosso estudo deve ser explicada pela forma como os linfócitos foram separados e isolados do sangue periférico, retirando o efeito da presença dos fármacos imunossupressores na cultura.

Além disso, existe a hipótese de que o aumento de apoptose nos transplantados renais seja por morte celular passiva devido à falta de citocinas

principalmente IL-2. É bem descrito que glicocorticóides e ciclosporina A exercem parte de seu efeito imunossupressor inibindo a expressão e produção de IL-2 (31, 32). Di Renzo e colaboradores constataram que os níveis de produção de IL-2 em pacientes transplantados cardíacos são baixos em relação aos indivíduos normais, após estimulação com PHA (3). Alguns estudos demonstraram um aumento da expressão do gene de IL-2 no soro e intra-enxerto após o transplante ou durante a rejeição (33,34). Em outro estudo a expressão dos genes IL-2, IL-4, IL-6, TGF $\beta$  e IF $\gamma$  em sangue periférico de pacientes transplantados hepáticos foi correlacionada com a análise histológica e presença ou não de rejeição. Em relação ao gene da IL-2, sua expressão foi observada somente nas amostras que apresentavam rejeição, enquanto que a expressão dos genes IL-4 e TGF $\beta$  foi observada em todos os pacientes sem rejeição (35). Shimizu e colaboradores avaliaram a expressão do gene IL-2 e IL-2R em sangue periférico de pacientes transplantados renais comparados a pacientes pré-transplante e voluntários sadios, não observando transcritos de IL-2 em nenhuma das amostras enquanto que o transcrito do gene IL-2R foi observado em todos os pacientes (36). Em nosso estudo a expressão do gene IL-2 não foi detectada em nenhuma amostra de linfócitos não estimulados de transplantados. Como esta análise foi realizada em linfócitos não estimulados e todos os pacientes incluídos recebiam inibidores de calcineurina, é possível que o efeito dos mesmos tenha sido responsável por esta ausência de expressão do gene da IL-2. Adicionalmente, como os pacientes selecionados para o nosso estudo apresentavam função renal estável é esperado que seus linfócitos não estivessem ativados e, portanto sem produção da IL-2.

O papel do sistema Fas/FasL na indução e regulação da apoptose já está bem elucidado. É também demonstrado que a AICD em muitos casos reflete uma morte celular dependente de Fas quando o FasL é transitoriamente induzido por ativação das células T (8). Ankersmit e colaboradores demonstraram que células T de transplantados cardíacos expressaram níveis elevados de Fas, FasL e TNFR1, em apoptose (*in vivo*) e AICD (*in vitro*) (9). A expressão de genes envolvidos na ativação e proliferação linfocitária tem sido estudada como marcador para rejeição, já que estes compõem a maior parte do infiltrado leucocitário e são, possivelmente, os principais mediadores da rejeição do enxerto. Transcritos de moléculas efetoras das células T citotóxicas tem sido identificados em biópsias de enxertos com rejeição aguda e rejeição subclínica (37- 40).

A expressão de FasL, talvez seja influenciada pela terapia imunossupressora, especialmente por ciclosporina A. Kasprzycka e colaboradores demonstraram que o tratamento com ciclosporina A diminui a susceptibilidade das células T entrarem em apoptose em pacientes transplantados renais (41, 42). Neste estudo verificamos a expressão de transcritos de FasL no grupo de transplantados recentes, enquanto que no grupo de transplantados tardios não houve a expressão deste gene. Este achado deve-se possivelmente à existência de linfócitos *primed* no grupo de transplantados recentes e isto pode estar relacionado com os resultados aqui descritos, que mostram uma tendência de aumento de apoptose induzida no grupo FasL+ quando comparado com FasL-.

Sumarizando, os resultados evidenciam a maior suscetibilidade dos linfócitos periféricos de pacientes transplantados renais à AICD, com maior magnitude no período pós-transplante mais precoce e que há envolvimento da via Fas-FasL neste processo. A elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos nesta situação e a sua participação no desenvolvimento de tolerância periférica são fundamentais para o estabelecimento de novos esquemas imunossupressores que permitam o controle da resposta imune no sentido de evitar a rejeição e que não impeçam o desenvolvimento de tolerância imunológica.

### Referências bibliográficas

1. Zimmermann KC, Bonzon C and Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*, 2001; 92:57-70.
2. Gewies A. ApoReview: Introduction to Apoptosis [2003], Disponível em <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/apointro.pdf>.
3. Di Renzo M. Enhanced apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in cardiac transplanted patients undergoing chronic immunosuppressive treatment. *Transplant Immunol*, 2002; 10: 269-275.
4. Pinti M, Troiano L, Nasi M, Monterastelli E, Moretti L, Bellodi C. Development of real time PCR assays for the quantification of Fas and FasL mRNA levels in lymphocytes: studies on centenarians. *Mech Age Devel*. 2003; 124:511-516.
5. Chiffolleau E, Walsh PT, Turka L. Apoptosis and transplantation tolerance. *Immunol Rev*. 2003; 193:124-145.
6. Fujioka T, Taniguchi Y, Masuda T, Nishida S, Ikegame K, Kawakami M, Tsuboi A, Hosen N. The Effect on the proliferation and apoptosis of alloreactive T cells of cell dose in a murine MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation model. *Transplant Immunol*. 2003; 11:187-195.
7. Sun EW, Shi YF. Apoptosis: the quiet death silence the immune system. *Pharmacology & Therapeutics*.2001; 92:135-145.

8. Janssen O, Sanzenbacher R, Kabelitz D. Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell Tissue Res.*2000; 301:85-99.
9. Ankersmit HJ, Moser B, Zuckermann A, Roth G, Taghavi S, Brunner M, Wolner & G Boltz-Nitulescu. Activation-induced T cell death, and aberrant T cell activation via TNFR1 and CD95-CD95 ligand pathway in stable cardiac transplant recipients. *Clin Exp Immunol* 2002; 128:175-180.
10. Refaeli Y, Van Parijs L, London CA, Tschopp J, Abbas AK. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* 1998;8:615-23.
11. Li XC, Wells AD, Strom TB, Turka LA. The role of cell apoptosis in transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:522-527.
12. Wells AD, Li XC, LI Y, et al. Requirement for T-cell apoptosis in induction of peripheral transplantation tolerance. *Nat Med* 1999; 5:1303-1307.
13. Nakafusa Y, Goss JA, Mohanakumar T, Flye MW. Induction of donor-specific tolerance to cardiac but not skin or renal allografts by intrathymic injection of splenocyte alloantigen. *Transplantation.* 1993; 55:877-882.
14. Campos L, Alfrey EJ, Posselt AM, Odorico JS, Barker CF, Najj A. Prolonged survival of rat orthotopic liver allografts after intrathymic inoculation of donor-strain cells. *Transplantation.* 1993; 55:866-870.
15. Shi YF, Sahai BM, Green DR. Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature* 1989; 339:625-626.

16. LI Y, Li XC, Zheng XX, Wells AD, Turka LA, Strom TB. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T-cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med* 1999; 5:1298-1302.
17. August C, Schmid KW, Dietl KH, Heidenreich S. Prognostic value of lymphocyte apoptosis in acute rejection of renal allografts. *Transplantation* 1999; 67: 581-85.
18. Strauss G, Osen W, Debatin KM. Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cell by immunosuppressive drugs. *Clin Exp Immunol* 2002;128:255-266.
19. Meyer D, Thorwarth M, Otto C, Gassel HJ, Timmermann W, Ulrichs K, Thiede A. Apoptosis of alloreactive T cells in liver allografts during tolerance induction. *Transplant Proc* 1999; 31:474.
20. Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 1998; 280:243-8.
21. Van Parijs L, Ibraghimov A, Abbas AK. The role of co-stimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity* 1996; 4:321-8.
22. Ferguson TA, Stuart PM, Herndon JM and Griffith TS. Apoptosis, tolerance, and regulatory T cells – old wine, new wineskins. *Immunological Reviews* 2003; 193: 111-123.
23. Zheng XX, Sanchez-Fueyo A, Domenig C and Strom TB. The balance of deletion and regulation in allograft tolerance. *Immunological Reviews* 2003; 196: 75-84.

24. Cortesini R. Regulatory T cells and dendritic cells in transplantation medicine. *Transplant Immunology* 2003; 11: 231-233.
25. Piccirillo CA and Thornton AM. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *Trends Immunol* 2004; 25: 374-380.
26. Hirigome A, Hirano T, Oka K. Glucocorticoids and cyclosporine induce apoptosis in mitogen-activated human peripheral mononuclear cells. *Immunopharmacology* 1997;37:87-94.
27. Kasprzycka M, Wierzbicki P, Nowaczyk M, Górski A, Serafinowicz A, Durlik M, Wyzgat J, Korczak-Kowalska G, Gradowska L, Chmura A. Cellcept enhances the rate of apoptosis in T cells after renal transplantation. *Transplant Proc* 1999;31:328.
28. Brunner T, Yoo NJ, LaFace D, Ware CF, Green DR. Activation-induced cell death in murine T cell hybridomas differential regulation of Fas (CD95) versus Fas ligand expression by cyclosporin A and FK506. *Int Immunol* 1996;8:1017-26.
29. Takahashi K, Reynolds M, Ogawa N, Longo DL, Burdick J. Augmentation of T-cell apoptosis by immunosuppressive agents. *Clin Transplant* 2004;18:73-5.
30. Ducrooy P, Micheau O, Perruche S, Dubrez-Dalazol L, Fornel D, Dutartre P, Saas P, Solary E. LF 15-0195 immunosuppressive agent enhanced activation-induced T-cell death by facilitating caspase-8 and caspase-10 activation at the DISC level. *Blood* 2003;101:195-201.

31. Allison AC. Immunosuppressive drugs: The first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology* 2000; 47(2-3):63-83.
32. Resch K, Szamel M. Molecular mechanisms of the immunosuppressive action of cyclosporin A. *Int J Immunopharmacol* 1997; 19(9-10):579-85.
33. Dallman MJ, Roacke J, Hughes D, Toogood G, Morris PJ. Sequential analysis of IL-2 gene transcription in renal transplants. *Transplantation* 1992; 53:683-85.
34. Kimball PM, Radovancevic B, Isom T, Spickard A, Frazier OH. The paradox of cytokine monitoring-predictor of immunologic activity as well as immunologic silence following cardiac transplantation. *Transplantation* 1996; 61:909-15.
35. Gorczynski RM, Adams RB, Levy GA, Chung SW. Correlation of peripheral blood lymphocyte and intragraft cytokine mRNA expression with rejection in orthotopic liver transplantation. *Surgery* 1996; 120:496-502.
36. Shimizu S, Ueda M, Ozawa S, Wakabayashi G, Endo M, Hayakawa K, Hata M, Murai M, Kitajima M. Detection of IL-2 receptor gene expression in peripheral blood from renal transplant patients. *Surg Today* 2001; 31:1058-64.
37. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M et al. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 695.

38. Lipman ML, Shen Y, Jeffery JR et al. Immune-activation gene expression in clinically stable renal allograft biopsies: molecular evidence for subclinical rejection. *Transplantation* 1998; 66: 1673.
39. Pavlakis M, Lipman M, Strom TB. Intragraft expression of T-cell activation genes in human renal allograft rejection. *Kidney Int* 1996; 53:(S1):7.
40. Dias ECA, Veronese FJ, Gonçalves LF, Manfro RC. Molecular markers of acute subclinical rejection of renal transplants. *Clin Transplant* 2004; 18:281-87.
41. Kasprzycka M, Ktodor K, Nowaczyk M, Wyzgat J, Podobinska I, Durlik M, Górski A. Expression of FasL gene in T cell of renal allograft recipients. *Immunology Letters* 2002; 80:9-13.
42. Kasprzycka M, Górski A, Nowaczyk M, Korczak-Kowalska G, Wierzbicki P, Durlik M, Wyzgat J, Gradowska L, Lao M. T-cell apoptosis following renal transplantation. *Transplant Proc* 1998; 30:2353-54.

**Tabela 1.** Percentual de Apoptose em relação aos grupos e a imunossupressão.

<b>Grupo</b>	<b>APO(%)</b>	<b>P*</b>	<b>Imunos</b>	<b>APO(%)</b>	<b>P*</b>
1	42 ± 4	2x 3= 0,004	M (n=15)	40 ± 5	MxT = 0,413
2	37 ± 3	1x3 = 0,000	T (n=5)	42 ± 2	AxT = 0,065
3	27 ± 2	1x2 = 0,000	A (n=12)	38 ± 4	AxM = 0,411

\* ANOVA

Grupo 1=tx.renais< 1 ano; Grupo 2= Tx.renais>5anos; Grupo 3=indivíduos sadios

Imunos=imunossupressão;

A= Pred.+ Ciclosporina + Azatioprina; M= Pred.+ Ciclosporina + Micofenolato;

T= Pred.+ Micofenolato + Tacrolimos;

APO(%)=percentual de células apoptóticas

**Tabela 2.** Expressão de FasL em linfócitos não estimulados de pacientes transplantados renais em relação ao grupo e a imunossupressão.

	FasL		P*
	+	-	
	n (%)	n (%)	
<b>Grupo 1</b>	15 (88,2)	2 (11,8)	0,000
<b>2</b>	0 (0)	15 (100)	
<b>Imunos A</b>	1 (8,3)	11 (91,7)	0,001
<b>M</b>	9 (60)	6 (40)	
<b>T</b>	5 (100)	0 (0)	

\* Qui-Quadrado

Grupo 1=tx.renais< 1 ano; Grupo 2= Tx.renais>5anos

Imunos=imunossupressão. A= Pred.+ Ciclosporina + Azatioprina;

M= Pred.+ Ciclosporina + Micofenolato; T= Pred.+ Micofenolato + Tacrolimus

**Legenda da figura 1.** Percentual de células apoptóticas marcadas com annexina V e iodeto de propídeo por citometria de fluxo após 48 horas em cultura estimulada com PHA 1%. (A) Grupo 1=Transplantados recentes ( $42\pm 4$ ); (B) Grupo 2=Transplantados tardios ( $37\pm 3$ ); (C) Grupo 3= Controles sadios ( $27\pm 2$ ).

**FIGURA 1**

**Legenda da figura 2.** Expressão de GAPDH, FASL e IL-2 em linfócitos periféricos de pacientes transplantados renais recentes, tardios e controles. Tx = Transplantados renais. GAPDH = Gliceraldeído fosfato desidrogenase; FasL = Fas ligante; IL-2 = Interleucina 2; pb = pares de base.

**FIGURA 2**

#### **IV. Evaluation of apoptosis in peripheral blood lymphocytes of renal transplant patients**

Virna Nowotny Carpio

Esther Cristina Aquino Dias

Taísa Aozani Prochnow

Luiz Felipe Santos Gonçalves

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

Running Title: **Evaluation of apoptosis in renal transplant patients**

#### **IV. Article – Evaluation of apoptosis in peripheral blood lymphocytes of renal transplant patients**

##### **Abstract**

The purpose of this study was to evaluate the occurrence of apoptotic cells in the peripheral blood of renal transplant patients by flow cytometry, as well as the expression of FasL and IL-2 genes by polymerase chain reaction. Three groups were studied: group 1=renal Tx < 1 year (n=17), group 2=renal Tx > 5 years (n=15), group 3=healthy controls (n=7). Peripheral blood mononuclear cells were isolated from on whole blood Ficoll-Hypaque gradient, an aliquot being used to extract RNA. Part of the cells extracted was stimulated in a culture with 1% phytohemagglutinin in an RPMI culture medium. The percentage of apoptotic cells was evaluated after 48 h by flow cytometry with Annexin V. All the experiments were performed in triplicate. The variables studied were: apoptosis, group, age, sex, ethnic group, type of immunosuppression: triple with prednisone, cyclosporine and azathioprine (A), triple with prednisone, cyclosporine and mycophenolate (M) or triple with prednisone, mycophenolate and tacrolimus (T). After RNA extraction and reverse transcription, the polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed for genes GAPDH, Fas-L and IL-2. Statistical analysis:  $\chi^2$ , ANOVA, Pearson correlation coefficient, significance,  $P < 0.05$ . There was a statistically significant increase in the percentage of apoptotic cells in groups 1 ( $42 \pm 4$ ) and 2 ( $37 \pm 3$ ) as compared to group 3 ( $27 \pm 2$ );  $P = 0.000$ , ANOVA). A significant increase in the percentage of apoptotic cells in group 1 was observed as compared to group 2

( $P=0.004$ , ANOVA). A negative correlation was found between the percentage of apoptosis and the post-transplantation time ( $r=-0.489$ ,  $P=0.005$ , Pearson correlation coefficient). No significant difference was found in the percentage of apoptotic cells as to type of immunosuppression. No statistically significant difference occurred in the percentage of apoptotic cells between age, sex and ethnic group, when analyzed as to group or type of immunosuppression. A significant association was found between the expression of FasL and group 1 as compared to 2 (88.2% X 0%,  $P=0.000$ ). A significant association was found in the expression of FasL in the immunosuppressor protocols, T, M in relation to protocol A (100% X 65% X 8.3%,  $P=0.001$ , Chi-Square). It was concluded that peripheral lymphocytes of renal transplants patients presented higher susceptibility to activation-induced cell death, with a greater magnitude during the most recent post-graft period, and that there is involvement of the Fas-FasL pathway in this process.

**Key words:** apoptosis, renal transplant, FasL, IL-2.

**Corresponding author:**

Dr. Luiz Felipe Santos Gonçalves

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Renal Division

Ramiro Barcelos, 2350, room 2030

Porto Alegre, RS, Brazil. 90035-003

Email: [lfgoncalves@hcpa.ufrgs.br](mailto:lfgoncalves@hcpa.ufrgs.br)

Fax: 51 21018121

## Introduction

Apoptosis is a natural cell death process responsible for maintaining homeostatic balance in multicellular organisms (1-7). In organ and tissue transplants, the apoptosis pathways have been investigated, due to their close relationship to the induction of allograft tolerance (3).

In the immune system, a way for the lymphocytes to go into apoptosis is through activation-induced cell death (AICD), an important physiologic process that contributes to regulating the immune response and the induction of peripheral tolerance (8). T cell apoptosis and AICD are controlled by survival cytokines such as IL2 and by death-inducing factors such as TNF (Tumor Necrosis Factor) and Fas ligand (FasL). The main pathway for AICD uses Fas-FasL interaction; ensuring the elimination of activated T cells (9). The way in which IL-2 regulates AICD and allograft tolerance has not been completely elucidated. In the absence of IL-2, Fas cannot recruit the key components to execute the apoptotic process (10). Knockout mice for the IL-2 gene develop a profound deficiency in apoptosis, mediated by Fas *in vitro*, which demonstrates a defect in signaling Fas in the absence of IL-2 (11). The association of AICD and organ transplantation was demonstrated by Wells et cols in experimental models, where the apoptotic cells were required for the induction of peripheral tolerance by blocking CD28 and/or CD154 co-stimulation pathways (12). Other studies have demonstrated that intrathymus injection of lymphoid cells from the donor has been used to prolong the survival of liver and cardiac allografts, possibly by inducing AICD in alloreactive T cells (13,14). Furthermore, several immunosuppressive drugs used in clinical

lymphocytes transplantation may exert part of their effect by modulation of AICD (15, 16).

The purpose of the present study was to evaluate the occurrence of cell death due to apoptosis in peripheral lymphocytes of renal transplant patients at different times post-transplantation. We also evaluated the Fas ligand (Fas L) and interleukin 2 (IL-2) expression in the same groups.

## **Patients and Methods**

### **Patients**

The study involved two groups of adult renal transplant patients and a control group. The first group consisted of seventeen stable renal transplant patients, between 6 and 12 months post-transplantation. The second group consisted of fifteen stable renal transplant patients who had been followed for more than five years. Seven normal individuals were included in the control group. The groups were matched for sex, age and race group. The type of immunosuppression used for the patients was also evaluated in the tests. Only renal transplant patients who had a serum creatinine of less than 2 mg/dL were included. All the patients evaluated were free of neoplasm, bacterial infection and HIV, HCV and HBV infections.

All the patients agreed to participate in the study and signed informed consent. The study was approved by the Committee for Ethics in Medicine at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, accredited by the National Research Council

of the Ministry of Health in Brazil and registered at the Office for Human Research Protection – OHRP-USDHHS) (Institutional Review Board – IRB 00000921).

## **Methods**

### **Cell cultures**

Samples of peripheral blood were collected in tubes with EDTA. Mononuclear cells were isolated by Ficoll-Hypaque density gradient (Pharmacia, Uppsala, Sweden). For each sample the culture was done in triplicate as follows: RPMI 1640 culture medium, supplemented with fetal bovine serum (10%), penicillin-streptomycin (1%) 100 U/ml (Gibco, Paisley, United Kingdom) and 1% phytohemagglutinin (St. Louis, United States).

### **Evaluation of apoptosis by flow cytometry**

After 48 hours in culture, the cell viability was confirmed by optical microscopy using tripan blue stain (Gibco, NY, USA); the concentration was adjusted for  $1 \times 10^5$  cells/mL and flow cytometry analysis was done using the Annexin V-EGFP Apoptosis Detection Kit (Alexis Biochemicals®, San Diego, CA), in the FACScan (Beckton & Dickinson, Heidelberg, Germany) equipment. The cells were marked simultaneously with Annexin V-EGFP and with propidium iodide (PI) stain, allowing the discrimination of viable cells (EGFP-PI-) in apoptosis (EGFP+PI-) and necrosis (EGFP+PI+). The analysis of apoptosis in flow cytometry was performed by dot plot where, on axis X (FL1), the Annexin V-EGFP is shown on a logarithmic scale and on the Y axis (FL2) it shows the propidium iodide

fluorescence. In the dot plot the viable cells are recognized in the lower left quadrant (EGFP-PI-), the cells in apoptosis in the lower right quadrant (EGFP+PI-) and the necrotic cells in the upper right quadrant. The evaluation of the data on 10,000 events per sample was performed using the CellQuest® software (Becton & Dickinson, San Jose, CA).

### **Analysis of FasL and IL2 by RT – PCR**

Samples of lymphocytes extracted from the peripheral blood of patients were stored for RNA extraction, which was done using the Rneasy mini kit method (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA) according to the manufacturer's instructions and stocked at  $-70^{\circ}\text{C}$  for later analysis by RT-PCR. The reverse transcription was performed in three stages: (a) in a 0.5 ml microcentrifuge tube a mixture of components was prepared for a 31  $\mu\text{l}$  volume: 10  $\mu\text{l}$  of "First Strand"(5x) buffer; 10  $\mu\text{l}$  of deoxynucleotides (dNTPs) with 10 mM from each base (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); 5  $\mu\text{l}$  of Dithiothreitol (DTT) 0.1 M; 1  $\mu\text{l}$  of acetylated bovine albumin (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); 1  $\mu\text{l}$  of RNAsin (ribonuclease inhibitor), 40 U/ $\mu\text{l}$ ; 2  $\mu\text{l}$  of hexanucleotide primers (oligo-dt<sub>12-18</sub> - 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ); 2  $\mu\text{l}$  of the reverse transcriptase enzyme of the leukemia Moloney murine virus (RVT- MMLV [200 U/ $\mu\text{l}$ ]). (b) 1 to 10  $\mu\text{g}$  of the total RNA, raising its volume to 19  $\mu\text{l}$  with DEPC water, completing the final volume of 50  $\mu\text{l}$  of reaction. This preparation was incubated at  $65^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes and kept on ice for over 5 minutes. (c) the linearized RNA was added to the first mixture completing the final volume of 50  $\mu\text{l}$  for the reaction. In order to perform a

complementary DNA synthesis the following temperatures were used: 37°C for 1 hour; crushed ice for 5 minutes 65°C for 10 minutes and crushed ice followed by freezing at - 70°C.

The polymerase chain reaction (PCR) was performed with a view to assessing the expression of the genes that coded for the production of Fas-ligand and IL-2. The expression of the glyceraldehyde phosphate dehydrogenase enzyme (GAPDH) gene was used to prove the efficiency of the RNA extraction and reverse transcription. The PCR mixture consisted of: 2.5 µl primers (sense and antisense) specific gene (0.1 µg/µl), 3µl of dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 10 mM, 3 µl of magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>) 50 mM, 5 µl of buffer solution 10 x, 0.5 µl of taq DNA polymerase, 2 µl of cDNA and sterile waters for a final volume of 50 µl.

The positive controls for the expression of genes FasL and IL-2 were obtained from a lymphocyte culture stimulated with phytohemagglutinin (1%) and OKT3(1mg/ml).

The sequences of the primers used were:

(a) GAPDH – (5' Sense: GGTGAAGGTCGGAGTCAACG and 3' Antisense: CAAAGTTGTCATGGATGACC), which result in a fragment of 496 base-pairs (pb).

(b) FasL – (5' sense: ATTCTTTGTTACAGGCACCG and 3' antisense: GAGTTGATTGTCAGGAAGCA), which result in a 696 pb fragment.

(c) IL-2 – (5' sense: GAATGGAATTAATAATTACAAGAATCCC and 3' antisense: TGTTTCAGATCCCTTTAGTTCCAG), which result in a 222 pb fragment.

The amplified products were analyzed in 2% agarose gel shown with ethidium bromide by transillumination with ultraviolet light and photographed using the image capture software Kodak Digital Science<sup>®</sup> (Rochester, USA).

### **Statistical Analysis**

The  $\chi^2$  test was used to verify an association between categorical variables, Student t test and Analysis of Variance for the continuous variables and the Pearson correlation coefficient. The level adopted for statistical significance was  $P < 0.05$ .

### **Results**

The samples from the culture of mononuclear cells of peripheral blood were analyzed in 32 patients at different times post-transplantation and in 7 normal individuals. The group of recent transplants ( $n=17$ ) consisted of patients who had been transplanted 6 to 12 months ( $9 \pm 2$  months) before, and in the group of late transplant patients ( $n=15$ ) the post-transplantation time was over five years ( $80 \pm 13$  months).

Three immunosuppression protocols were used in the patients included in the study: (A) – prednisone, cyclosporine and azathioprine; (M) – prednisone, cyclosporine and mycophenolate mofetil ; (T) – prednisone, mycophenolate mofetil and tacrolimus. The percentage of apoptotic cells was evaluated as to the different groups and to the type of immunosuppression, individually and in combination.

No statistically significant difference was found between age, sex and race

group, when analyzed as to transplanted or control groups or type of immunosuppression. A statistically significant increase in the percentage of apoptotic cells was found in the groups that had undergone recent ( $41 \pm 4$ ) or late ( $37 \pm 3$ ) renal transplants, as compared to the control ( $27 \pm 2$ ); ( $P < 0.001$ , ANOVA). The percentage of apoptotic cells was also significantly higher in the recent transplant patients as compared to the late transplants ( $P = 0.004$ , ANOVA) (Table 1 and Figure 1). A negative correlation was found between the percentage of apoptosis and the time post-transplantation ( $r = -0.489$ ,  $P = 0.005$ , Pearson).

As to the different immunosuppression protocols used, no statistically significant difference was found in the percentage of apoptosis, but there was a tendency for it to rise in patients who used mycophenate mofetil and tacrolimus as compared to the patients who received cyclosporine and azathioprine ( $42 \pm 2$  x  $38 \pm 4$ ,  $P = 0.065$ , ANOVA)(table 1).

A statistically significant association was found between the expression of the FasL gene and the group of recent renal transplant patients as compared to the late ones ( $88.2\%$  X  $0\%$ ,  $P < 0.001$ ). Equally the patients who received the protocols with tacrolimus/MMF and cyclosporine/MMF, also presented a significant association in the expression of FasL as compared with those who received cyclosporine/azathioprine ( $100\%$  X  $65\%$  X  $8.3\%$ ,  $P = 0.001$ , Çhi-Square) (Table 2).

The expression of IL-2 gene was not observed in any sample of non-stimulated peripheral blood lymphocytes of the renal transplant patients, independent of the post-transplant time and of the type of immunosuppression. Gene expression was observed only in the positive control.

The analysis of the expression of FasL in relation to the post-transplant groups, excluding the cases which received tacrolimus and mycophenolate mofetil (100% expression), continued to show a significant association in the group of recent renal transplant patients, as compared to the late ones (83.3% X 0%,  $P=0.000$ , Exact Fisher Test) (Figure 2). The percentages of apoptotic cells detected by flow cytometry were higher in the cases in which the expression of FasL occurred, although without reaching a statistically significant difference ( $41.3 \pm 3.5$  x  $38.3 \pm 4.8$ ,  $P=0.056$ ; ANOVA).

### **Discussion**

Apoptosis is a phenomenon that has been intensely investigated in the last few years due mainly to its implications in the life of organisms from the time they are conceived until their death, and especially in their role in certain diseases and in the development of tolerance (1-5). Recent evidence suggests that apoptotic cells participate in the regulation of the immune system during some physiological and pathological processes such as thymic tolerance, tumorigenesis and transplantation (7).

Apoptosis induction in lymphocytes in the context of organ transplantation may be related to controlling the acute rejection process by means of alloreactive lymphocyte deletion (17) and also later, by the same mechanism, influencing the development of tolerance (18).

There are two different mechanisms by means of which T cells begin the apoptotic process, namely: (a) activation-induced cell death (AICD), which is

mediated by members of the TNF receptor family via Fas/FasL, and; (B) passive cell death that occurs when activated T cells are deprived of growth factors (3).

The present study analyzed the apoptosis of lymphocytes in mitogen-stimulated culture and the qualitative expression of the FasL and IL-2 genes in the same lymphocytes previously adapted to stimulation. A statistically significant increase in the percentages of apoptotic cells was found in the groups of recent and late renal transplant patients as compared to the normal control group. Similar findings were described by Di Renzo et al, who demonstrated increased spontaneous apoptosis in lymphocytes of cardiac transplant patients after a 72-hour culture as compared to normal subjects. These findings, also similar to those described by Ankersmit et al (9), suggest that the situation of chronic exposure to alloantigens in the lymphocytes of patients who have undergone organ transplants results in the persistence of primed lymphocytes and therefore they are more susceptible to AICD.

Comparing the groups of renal transplant patients, it was found that the percentage of apoptosis was significant higher in the lymphocytes of recent transplant patients. As far as we know this clinical observation was not tested in other studies. We performed these comparisons intending to assess whether the difference in immunosuppressive treatments and the difference in post-transplantation period interferes in the occurrence of AICD. The higher number of cells in apoptosis in the recent transplant group may be accounted by the presence of a larger population of alloreactive lymphocyte or else by the magnitude of the effect of immunosuppressive drugs. In a study using an

experimental model of tolerance in a liver transplant in mice, histological and immunohistochemical evidence is presented that the apoptosis of CD8+T cells occurs during the first month post-transplantation, and that it could be an instrument to induce tolerance (19). The importance of AICD as a mechanism through which the immune system eliminates activated peripheral lymphocytes, maintains homeostasis and contributes to the development of peripheral tolerance is supported by some studies (12, 20, 21).

Although the importance of AICD is recognized in controlling the immune response, many doubts remain as to the form in which it occurs and the precise mechanisms that trigger it. Recent studies suggest that, besides the deletion of alloreactive lymphocytes, the maintenance of peripheral tolerance could involve active self-regulatory mechanisms (22,23). Thus, the rejection or tolerance outcome of a transplant would depend on the balance between cytopathic and regulatory cells, with the involvement of T cells with different phenotypes that have not yet been sufficiently characterized, besides mature and immature dendritic cells (24, 25). In the context of transplantation, this phenomenon may be influenced also by immunosuppressive treatment. Hirigome et al showed that both cyclosporine and glucocorticoids are able to promote apoptosis in lymphocytes, in vitro, after activation with mitogen (26). Different results were found by Shi et al, as to cyclosporine, demonstrating that it inhibits AICD in hybridomas of T cells and thymocytes (15). Another in vitro study observed an increase in apoptotic T cells after stimulation with OKT3 in renal transplant patients treated with mycophenolate mofetil when compared to those treated with azathioprine (27). Brunner et al

analyzed the effector function of immunosuppressive drugs commonly used in prevention and treatment of rejection in different T cell lines by apoptosis induction and modulation of activation, concluding that cyclosporine and tacrolimus equally prevent AICD by negative modulation of FasL (28). Another study of immunosuppressive drugs confirmed Brunner's findings, suggesting that immunosuppressive treatment does not increase apoptosis caused by AICD (18). Of the drugs tested, only cyclophosphamide and methotrexate increased AICD in peripheral T cells. Since there was a variation in immunosuppression protocols in recent and late transplant patients, because the introduction of new drugs, we also evaluated the percentage of apoptosis for this parameter. We did not find a statistically significant difference in the percentage of apoptosis concerning the immunosuppressive scheme used. However, we found a trend to increased apoptosis in the group that used mycophenolate mofetil and tacrolimus as compared to those who received azathioprine and cyclosporine. Takahashi et al used a cell culture to evaluate the effect of immunosuppressive drugs in AICD, finding a statistically significant increase of apoptosis in the cultures with mycophenolate mofetil compared to those with rapamycin and cyclosporine A (29). The mechanism of action of recent immunosuppressors such as LF 15-0195, derived from deoxypergualine, is being studied. Ducoroy et al showed that this drug sensitizes T lymphocytes to AICD by modulation of the Fas/FasL pathway (30). The lack of the immunosuppression effect as to AICD observed in our study must be explained by the way in which the lymphocytes were separated and

isolated from peripheral blood, removing the effect of the presence of immunosuppressive drugs in the culture.

Moreover there is a hypothesis that the increased apoptosis in renal transplant patients is due to passive cell death because of the lack of cytokine, especially IL-2. It has been well described that glucocorticoids and cyclosporin A exert part of their immunosuppressive effect inhibiting expression and production of IL-2 (31, 32). Di Renzo et al found that the levels of IL-2 production in cardiac transplant patients are low as compared to normal individuals, after stimulation with PHA (3). A few studies demonstrated increased expression of the serum IL-2 gene and intra-graft after transplant or during rejection (33, 34). In another study, the expression of genes IL-2, IL-4, IL-6 and TGF $\beta$  and IF $\gamma$  in peripheral blood of liver transplant patients was correlated to the histological analysis and presence or not of rejection. As to the IL-2 gene, its expression was observed only in the samples that presented rejection, while the expression of the IL-4 and TGF $\beta$  genes was observed in all patients without rejection (35). Shimizu et al evaluated the expression of the IL-2 and IL-2R gene in peripheral blood from renal transplant patients compared to pre-transplant patients and healthy voluntaries, IL-2 transcripts not being observed in any of the samples while the transcript of the IL-2R gene was observed in all patients (36). In our study the expression of the IL-2 gene was not detected in any sample of non-stimulated lymphocytes of transplant patients. As this analysis was performed in non-stimulated lymphocytes and all patients included receive calcineurin inhibitors, it is possible that their effect was responsible for this absence of expression of the IL-2 gene. In addition, since the

patients selected for our study presented a stable renal function, it is expected that their lymphocytes were not activated, and therefore without IL-2 production.

The role of the Fas/FasL system in the induction and regulation of apoptosis has already been clearly elucidated. It has also been demonstrated that AICD in many cases reflects Fas-dependent cell death when FasL is transiently induced by T cell activation (8). Ankersmit et al demonstrated that the T cells of cardiac transplant patients expressed high levels of Fas, FasL and TNFR1, in apoptosis (*in vivo*) and AICD (*in vitro*) (9). The expression of genes involved in lymphocyte activation and proliferation has been studied as a rejection marker, since these constituted most of the leukocyte infiltrate and are possibly the main mediators of graft rejection. Transcripts of effector molecules of cytotoxic T cells have been identified in biopsies of grafts with acute rejection and subclinical rejection (37-40).

FasL expression may be influenced by immunosuppressive therapy, especially by cyclosporin A. Kasprzycka et al demonstrated that the treatment with cyclosporin A reduces the T cell susceptibility to go into apoptosis in renal transplant patients (41, 42). In our study we found the expression of FasL transcripts in the group of recent transplant patients, while in the group of late transplants there was no expression of this gene. This finding may possibly be due to the existence of primed lymphocytes in the group of recently transplanted patients, and this may be related to the results described here, that show a tendency for increased apoptosis induced in the FasL+ group when compared with FasL-.

Summarizing, the results show the higher susceptibility of the peripheral lymphocytes of renal transplant patients to AICD, with a greater magnitude in the earlier post-transplantation period, and that there is involvement of the Fas-FasL pathway in this process. The elucidation of molecular mechanisms involved in this situation and their participation in the development of peripheral tolerance are essential to establish new immunosuppressive schemes which will allow control of the immune response in the sense of avoiding rejection and will not prevent the development of immunological tolerance.

## References

1. Zimmermann KC, Bonzon C and Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*, 2001; 92:57-70.
2. Gewies A. ApoReview: Introduction to Apoptosis [2003], Disponível em <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/apointro.pdf>.
3. Di Renzo M. Enhanced apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in cardiac transplanted patients undergoing chronic immunosuppressive treatment. *Transplant Immunol*, 2002; 10: 269-275.
4. Pinti M, Troiano L, Nasi M, Monterastelli E, Moretti L, Bellodi C. Development of real time PCR assays for the quantification of Fas and FasL mRNA levels in lymphocytes: studies on centenarians. *Mech Age Devel*. 2003; 124:511-516.
5. Chiffolleau E, Walsh PT, Turka L. Apoptosis and transplantation tolerance. *Immunol Rev*. 2003; 193:124-145.
6. Fujioka T, Taniguchi Y, Masuda T, Nishida S, Ikegame K, Kawakami M, Tsuboi A, Hosen N. The Effect on the proliferation and apoptosis of alloreactive T cells of cell dose in a murine MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation model. *Transplant Immunol*. 2003; 11:187-195.
7. Sun EW, Shi YF. Apoptosis: the quiet death silence the immune system. *Pharmacology & Therapeutics*.2001; 92:135-145.
8. Janssen O, Sanzenbacher R, Kabelitz D. Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell Tissue Res*.2000; 301:85-99.

9. Ankersmit HJ, Moser B, Zuckermann A, Roth G, Taghavi S, Brunner M, Wolner & G Boltz-Nitulescu. Activation-induced T cell death, and aberrant T cell activation via TNFR1 and CD95-CD95 ligand pathway in stable cardiac transplant recipients. *Clin Exp Immunol* 2002; 128:175-180.
10. Refaeli Y, Van Parijs L, London CA, Tschopp J, Abbas AK. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* 1998;8:615-23.
11. Li XC, Wells AD, Strom TB, Turka LA. The role of cell apoptosis in transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:522-527.
12. Wells AD, Li XC, LI Y, et al. Requirement for T-cell apoptosis in induction of peripheral transplantation tolerance. *Nat Med* 1999; 5:1303-1307.
13. Nakafusa Y, Goss JA, Mohanakumar T, Flye MW. Induction of donor-specific tolerance to cardiac but not skin or renal allografts by intrathymic injection of splenocyte alloantigen. *Transplantation*. 1993; 55:877-882.
14. Campos L, Alfrey EJ, Posselt AM, Odorico JS, Barker CF, Najj A. Prolonged survival of rat orthotopic liver allografts after intrathymic inoculation of donor-strain cells. *Transplantation*. 1993; 55:866-870.
15. Shi YF, Sahai BM, Green DR. Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature* 1989; 339:625-626.
16. LI Y, Li XC, Zheng XX, Wells AD, Turka LA, Strom TB. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive

T-cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med* 1999; 5:1298-1302.

17. August C, Schmid KW, Dietl KH, Heidenreich S. Prognostic value of lymphocyte apoptosis in acute rejection of renal allografts. *Transplantation* 1999; 67: 581-85.

18. Strauss G, Osen W, Debatin KM. Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cell by immunosuppressive drugs. *Clin Exp Immunol* 2002;128:255-266.

19. Meyer D, Thorwarth M, Otto C, Gassel HJ, Timmermann W, Ulrichs K, Thiede A. Apoptosis of alloreactive T cells in liver allografts during tolerance induction. *Transplant Proc* 1999; 31:474.

20. Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 1998; 280:243-8.

21. Van Parijs L, Ibraghimov A, Abbas AK. The role of co-stimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity* 1996; 4:321-8.

22. Ferguson TA, Stuart PM, Herndon JM and Griffith TS. Apoptosis, tolerance, and regulatory T cells – old wine, new wineskins. *Immunological Reviews* 2003; 193: 111-123.

23. Zheng XX, Sanchez-Fueyo A, Domenig C and Strom TB. The balance of deletion and regulation in allograft tolerance. *Immunological Reviews* 2003; 196: 75-84.

24. Cortesini R. Regulatory T cells and dendritic cells in transplantation medicine. *Transplant Immunology* 2003; 11: 231-233.

25. Piccirillo CA and Thornton AM. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *Trends Immunol* 2004; 25: 374-380.
26. Hirigome A, Hirano T, Oka K. Glucocorticoids and cyclosporine induce apoptosis in mitogen-activated human peripheral mononuclear cells. *Immunopharmacology* 1997;37:87-94.
27. Kasprzycka M, Wierzbicki P, Nowaczyk M, Górski A, Serafinowicz A, Durlik M, Wyzgat J, Korczak-Kowalska G, Gradowska L, Chmura A. Cellcept enhances the rate of apoptosis in T cells after renal transplantation. *Transplant Proc* 1999;31:328.
28. Brunner T, Yoo NJ, LaFace D, Ware CF, Green DR. Activation-induced cell death in murine T cell hybridomas differential regulation of Fas (CD95) versus Fas ligand expression by cyclosporin A and FK506. *Int Immunol* 1996;8:1017-26.
29. Takahashi K, Reynolds M, Ogawa N, Longo DL, Burdick J. Augmentation of T-cell apoptosis by immunosuppressive agents. *Clin Transplant* 2004;18:73-5.
30. Ducoroy P, Micheau O, Perruche S, Dubrez-Dalazol L, Fornel D, Dutartre P, Saas P, Solary E. LF 15-0195 immunosuppressive agent enhanced activation-induced T-cell death by facilitating caspase-8 and caspase-10 activation at the DISC level. *Blood* 2003;101:195-201.
31. Allison AC. Immunosuppressive drugs: The first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology* 2000; 47(2-3):63-83.

32. Resch K, Szamel M. Molecular mechanisms of the immunosuppressive action of cyclosporin A. *Int J Immunopharmacol* 1997; 19 (9-10):579-85.
33. Dallman MJ, Roacke J, Hughes D, Toogood G, Morris PJ. Sequential analysis of IL-2 gene transcription in renal transplants. *Transplantation* 1992; 53:683-85.
34. Kimball PM, Radovancevic B, Isom T, Spickard A, Frazier OH. The paradox of cytokine monitoring-predictor of immunologic activity as well as immunologic silence following cardiac transplantation. *Transplantation* 1996; 61:909-15.
35. Gorczynski RM, Adams RB, Levy GA, Chung SW. Correlation of peripheral blood lymphocyte and intragraft cytokine mRNA expression with rejection in orthotopic liver transplantation. *Surgery* 1996; 120:496-502.
36. Shimizu S, Ueda M, Ozawa S, Wakabayashi G, Endo M, Hayakawa K, Hata M, Murai M, Kitajima M. Detection of IL-2 receptor gene expression in peripheral blood from renal transplant patients. *Surg Today* 2001; 31:1058-64.
37. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M et al. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 695.
38. Lipman ML, Shen Y, Jeffery JR et al. Immune-activation gene expression in clinically stable renal allograft biopsies: molecular evidence for subclinical rejection. *Transplantation* 1998; 66: 1673.

39. Pavlakis M, Lipman M, Strom TB. Intragraft expression of T-cell activation genes in human renal allograft rejection. *Kidney Int* 1996; 53:(S1):7.
40. Dias ECA, Veronese FJ, Gonçalves LF, Manfro RC. Molecular markers of acute subclinical rejection of renal transplants. *Clin Transplant* 2004; 18:281-87.
41. Kasprzycka M, Ktotos K, Nowaczyk M, Wyzgat J, Podobinska I, Durlik M, Górski A. Expression of FasL gene in T cell of renal allograft recipients. *Immunology Letters* 2002; 80:9-13.
42. Kasprzycka M, Górski A, Nowaczyk M, Korczak-Kowalska G, Wierzbicki P, Durlik M, Wyzgat J, Gradowska L, Lao M. T-cell apoptosis following renal transplantation. *Transplant Proc* 1998; 30:2353-54.

**Table 1.** Percentage of apoptosis as to groups and immunosuppression

Group	APO(%)	P*	Immune	APO(%)	P*
1	42 ± 4	2x 3= 0.004	M (n=15)	40 ± 5	MxT = 0.413
2	37 ± 3	1x3 = 0.000	T (n=5)	42 ± 2	AxT = 0.065
3	27 ± 2	1x2 = 0.000	A (n=12)	38 ± 4	AxM = 0.411

\* ANOVA

Group 1=renal tx.< 1 year; Group 2= renal Tx.>5years; Group 3=healthy immune individuals  
=immunosuppression;

A= Prednisone+ Cyclosporine + Azathioprine; M= Prednisone+ Cyclosporine + Mycophenolate;

T= Prednisone+ Mycophenolate + Tacrolimus;

APO(%)=percentage of apoptotic cells

**Table 2.** FasL expression in non-stimulated lymphocytes of renal transplant patients as to the group and immunosuppression.

		FasL		P*
		+	-	
		n (%)	n (%)	
<b>Group</b>	<b>1</b>	15 (88.2)	2 (11.8)	0.000
	<b>2</b>	0 (0)	15 (100)	
<b>Immune</b>	<b>A</b>	1 (8.3)	11 (91.7)	0.001
	<b>M</b>	9 (60)	6 (40)	
	<b>T</b>	5 (100)	0 (0)	

**\* Chi-Square**

Group 1=renal tx.< 1 year; Group 2= renal Tx.>5years

Immune=immunosuppression. A= Prednisone+ Cyclosporine + Azathioprine;

M= Prednisone+ Cyclosporine + Mycophenolate; T= Prednisone+ Mycophenolate +

Tacrolimus

**Legend of Figure 1.** Percentage of apoptotic cells marked with Annexin V and propidium iodide by flow cytometry after 48 hours in a culture stimulated by PHA !%/ . (A) Group 1= recent transplants( $42\pm 4$ ); (B) Group 2= Late transplants ( $37\pm 3$ ); (C) Group 3= Healthy controls ( $27\pm 2$ ).

**FIGURE 1**

**Legend of figure 2.** Expression of GAPDH, FASL and IL-2 in peripheral lymphocytes of recent and late renal transplant patients and controls. Tx= renal transplant patients. GAPDH= Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; FasL = Fas ligand; IL-2 = Interleukin 2; pb = base pairs.

**FIGURE 2**