

## Biópsia percutânea do enxerto renal: para onde vamos?

F. V. VERONESE, A. D. CENTENO, A. G. DE ALMEIDA, A. FRITSCH, A.G. MELLO, A. WEBBER, A. E. ZUCATTO, S. C. PERINI, R. C. MANFRO, L.F. GONÇALVES.

Trabalho realizado no Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, RS.

UNITERMOS: Transplante renal. Bópsia seriada. Infiltrado celular. Rejeição aguda.

KEYWORDS: Kidney transplant. Routine serial biopsies. Cellular infiltrate. Acute rejection.

### INTRODUÇÃO

A rejeição aguda do rim transplantado ocorre em 40% a 70% dos pacientes, envolvendo morbidade significativa pela exposição a maior imunossupressão. Esta complicação imunológica pós-transplante compromete a sobrevida do enxerto a curto e longo prazo, sendo maior este risco quanto mais severa, tardia e repetida for a rejeição<sup>1-5</sup>. Cole *et al.*<sup>6</sup> observaram que um ou mais episódios de rejeição nos primeiros seis meses do transplante reduz em 13% a sobrevida do enxerto em cinco anos, sendo um dos fatores prognósticos independentemente associados à sobrevida tardia.

A biópsia do rim transplantado, quando realizada de rotina para monitorização de rejeição aguda (RA) em pacientes com função estável, usualmente tem mostrado um infiltrado de leucócitos. Diversos estudos, através de análise histológica seriada, têm demonstrado a presença de células mononucleares, principalmente linfócitos T, monócitos e macrófagos, de distribuição focal no interstício em fase precoce e mesmo tardia pós transplante<sup>7-12</sup>.

O significado clínico deste infiltrado leucocitário nos enxertos funcionalmente estáveis ainda é controverso, e até o momento não foi definitivamente demonstrado que comprometa a sobrevida do enxerto a longo prazo ou que seja tratável com aumento da imunossupressão. Entretanto, é possível que represente uma forma leve de rejeição celular, caracterizando um processo patológico, ou que constitua um mecanismo de adaptação do hospedeiro ao enxerto para aquisição de tolerância imunológica<sup>13,14</sup>.

Nesta revisão objetivamos analisar o valor da biópsia seriada como método de monitorização imunológica do rim transplantado estável, para diagnóstico precoce de rejeição aguda e para estabelecer qual o papel do infiltrado leucocitário

intersticial no que se refere ao desenvolvimento de rejeição crônica a longo prazo.

### A biópsia percutânea para diagnóstico da disfunção do rim transplantado

A biópsia percutânea do rim transplantado é um método seguro e de baixa morbidade, podendo ser realizado em nível ambulatorial, com ou sem orientação ecográfica. Obtém-se tecido renal representativo na grande maioria dos casos com uma baixa incidência de complicações, na maior parte relacionada à hematúria macroscópica geralmente autolimitada<sup>15,16</sup>. Utilizando a pistola automatizada com agulha tipo TruCut, Kolb *et al.*<sup>17</sup> relatam complicações como hematúria em 2,5% dos pacientes, sem nenhum caso de perda do enxerto ou morte relacionada ao procedimento.

O diagnóstico de rejeição do rim transplantado baseia-se em dados clínicos e laboratoriais como febre, aumento do enxerto, diminuição da diurese e elevação ou estabilização da creatinina. A citologia aspirativa demonstra imunoativação em 70% dos casos<sup>18</sup> e na biópsia renal é característico um infiltrado mononuclear intersticial na presença de tubulite. O conjunto destes dados, associados à resposta ao tratamento imunossupressor, constitui o diagnóstico padrão ouro de rejeição aguda do aloenxerto<sup>19</sup>.

A biópsia renal é um método diagnóstico mais sensível e específico do que a ecografia, a cintilografia e a punção aspirativa com agulha fina para o diagnóstico de rejeição aguda do enxerto<sup>20</sup>. No estudo de Gray *et al.*<sup>21</sup>, a histologia convencional e a imunohistologia apresentaram maior sensibilidade do que a punção aspirativa com agulha fina em relação ao diagnóstico de rejeição aguda.

A informação proveniente da biópsia pode modificar a impressão clínica e o tratamento em cerca de 40% dos pacientes, evitando os riscos de imunossupressão desnecessária<sup>22</sup>. No nosso meio, Manfro *et al.*<sup>23</sup>, estudando 95 biópsias de 67 pacientes transplantados, observaram que 29,5% das impressões diagnósticas pré-biópsia foram modificadas pela análise histológica, e que 37,9% das biópsias produziram uma mudança de conduta, sendo a suspensão da pulsoterapia com corticoes-

teróides a situação mais freqüente.

Recentemente, foi padronizada uma classificação internacional para o diagnóstico histopatológico do enxerto renal, denominada Banff<sup>24</sup>, com o objetivo de estabelecer critérios de rejeição aguda e crônica, e de outras alterações associadas à disfunção do enxerto, como toxicidade por ciclosporina e alterações inespecíficas. A rejeição foi quantificada por grau de severidade histológica, variando de uma forma leve que inclui apenas tubulite - invasão do túbulo por mononucleares - (grau I), tubulite associada com arterite da íntima leve a moderada (grau II), e arterite severa e/ou transmural, quando existe necrose fibrinóide da camada média, ocasionalmente associada à infarto focal e hemorragia intersticial (grau III).

O uso clínico rotineiro da classificação de Banff tem sido discutido com base em sua reprodutibilidade. No estudo de Marcussen *et al.*<sup>25</sup>, cinco patologistas atribuíram graduações e escores pelo esquema Banff em biópsias realizadas por suspeita de rejeição aguda. O grau de concordância obtido para vasculite e tubulite foi aceitável, alcançando boa reprodutibilidade para o grau de severidade da rejeição ( $\kappa = 0.40$ ), e ainda melhor para a presença ou ausência de rejeição ( $\kappa = 0.60$ ).

Alguns autores têm criticado a complexidade da classificação de Banff, sugerindo escores simplificados para o diagnóstico de rejeição. Oito centros norte-americanos participaram dos Estudos Clínicos Cooperativos em Transplante do National Institute of Health<sup>26</sup>, definindo três categorias de rejeição celular aguda, com um grau de concordância superior a 90% entre rejeição e não-rejeição. Indiscutivelmente, o desenvolvimento destes sistemas tem proporcionado melhores definições e permitido uma padronização do diagnóstico histopatológico do rim transplantado, embora mais estudos sejam necessários para sua validação e uso rotineiro pelos patologistas renais.

### **Correlação clínica do infiltrado celular em biópsias seriadas**

O infiltrado celular é significativamente maior nos rins com rejeição aguda, quando comparado com enxertos funcionalmente estáveis, mas a proporção de subpopulações de células não é diferente<sup>27,28</sup>. Outro fator determinante da magnitude do infiltrado é o esquema imunossupressor, pois nos pacientes que usam ciclosporina o infiltrado é quantitativamente menor quando comparado à terapia com prednisona e azatioprina<sup>8</sup>. A relação linfócitos T CD4/CD8 é maior na fase inicial do transplante no grupo com ciclosporina, o que sugere uma menor probabilidade de rejeição severa<sup>29</sup>.

Os centros que realizam biópsias de rotina em pacientes sem sinais clínicos de rejeição aguda têm descrito a presença de um infiltrado celular inespecífico, ou de alterações histológicas compatíveis com rejeição<sup>7,8,9,11,14,28</sup>. Burdick *et al.*<sup>7</sup> biopsiaram 1 e 4 semanas após o transplante, demonstrando uma menor área de infiltrado nos rins estáveis do que nos rins com rejeição, assim como melhor função do enxerto ao final do primeiro ano.

Limchin *et al.*<sup>30</sup>, estudando pacientes estáveis com biópsias 1 e 8 semanas pós-transplante, detectaram infiltrado celular inespecífico em cerca de 30% dos casos nos dois períodos. Em 28% havia critérios histológicos para RA na segunda biópsia. Os pacientes com infiltrado apresentaram mais fibrose ao final de dois anos, mas a função renal tardia e o número total de rejeições não foi diferente entre os dois grupos.

Rush *et al.*<sup>11</sup> descreveram alterações histológicas em biópsias precoces. Inicialmente, foram realizadas 29 biópsias nos primeiros três meses em pacientes ambulatoriais com creatinina sérica e imunossupressão triplíce estáveis. Segundo os critérios de Banff, foi detectada em nove (33%) biópsias RA, e nas demais um infiltrado de células mononucleares. Os pacientes com rejeição foram tratados e em metade houve desaparecimento do infiltrado. Posteriormente, publicaram os resultados desta coorte aos 6 meses<sup>31</sup> e 12 meses<sup>12</sup> pós-transplante, correlacionando lesões agudas e crônicas com a função do enxerto. Aos 6 meses, cerca de 10% dos pacientes tinham alterações limítrofes, 30% rejeição subclínica e 17% nefropatia crônica do enxerto, e ao final de um ano, a creatinina dos pacientes com infiltrado ou rejeição foi significativamente maior do que nos casos sem alterações histológicas. Os autores concluem que a persistência do infiltrado inflamatório nas biópsias está associado a dano crônico e disfunção do enxerto a longo prazo.

Serón *et al.*<sup>14</sup> biopsiaram pacientes estáveis e com rejeição clínica 6 semanas após o transplante. O número de células infiltrantes e o grau de fibrose foram preditivos da função renal no momento da biópsia, e os autores sugerem que a presença de infiltrado, particularmente com marcação para CD45RA, pode significar rejeição leve, com efeito adverso para o enxerto ao final de 6 meses. Em outro estudo<sup>32</sup>, a nefropatia crônica do enxerto foi descrita em 42% das biópsias entre o 2º, e 5º meses, associada a maior incidência de rejeição aguda e maior ciclosporinemia pré-biópsia e menor sobrevida do enxerto ao final de cinco anos. É digno de nota esta elevada incidência de rejeição crônica precoce, que pode estar relacionada à

imunossupressão insuficiente nesta amostra de pacientes ou, na verdade, constituir toxicidade crônica por ciclosporina subdiagnosticada.

A longo prazo, o infiltrado mononuclear focal, com ou sem sinais de imunoativação, pode indicar a presença de um processo patológico clinicamente relevante, relacionado ao desenvolvimento de rejeição crônica. Através de punção aspirativa com agulha fina, imunohistoquímica e histologia convencional, Bohman *et al.*<sup>13</sup> descreveram um infiltrado celular focal constituído por linfócitos T, monócitos e macrófagos (CD14), expressando receptores de citocinas (CD25) e antígenos HLA classe II. Este infiltrado poderia constituir um dos potenciais mecanismos pelos quais, a longo prazo, pode haver dano crônico do enxerto.

### Identificação de marcadores de imunoativação no infiltrado celular

A monitorização dos componentes celular e humoral da resposta imune ao enxerto renal tem sido motivo de extensa investigação. A melhor caracterização desta resposta pode, potencialmente, levar à estratégias mais eficientes para bloqueá-la, através de agentes farmacológicos e biológicos<sup>33,34</sup>.

Diversos estudos, utilizando marcadores solúveis circulantes como citocinas e moléculas de adesão<sup>35-37</sup>, têm consistentemente demonstrado que a sua medida plasmática não é útil para o diagnóstico de RA, por apresentar uma baixa especificidade e uma reprodutibilidade pobre.

De outra forma, a investigação das células que infiltram enxertos tem sido conduzida desde a década de 70<sup>38,39</sup>. Através de técnicas de imunohistoquímica, identificaram-se moléculas efetoras ou alvo da RA em células infiltrativas e parenquimatosas, respectivamente<sup>9,29,40,41,42</sup>. Entretanto, a imunohistoquímica, se utilizada isoladamente, não permite distinguir que células estão efetivamente produzindo citocinas e em quais as citocinas estão meramente ligadas ou foram absorvidas, isto é, estão presentes mas não ativas<sup>43</sup>.

Recentemente, através da biologia molecular, tornou-se possível quantificar os genes que codificam para a expressão destas moléculas, correlacionando-os com o nível de proteína produzida. A análise quantitativa do RNA mensageiro total, através de transcrição reversa (RT) do RNAm para o DNA complementar da molécula e amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR), é um método reproduzível e de rápida execução<sup>44,45</sup>. O PCR-RT, mesmo em pequenos fragmentos de rim, permite detectar os genes de citocinas, moléculas de adesão e fatores de crescimento ativamente secretados durante a rejeição de enxertos. Por

exemplo, quando existe uma expressão genética aumentada de moléculas de fase efetora (discutidas a seguir), e a análise histológica é inconclusiva, o PCR-RT confirma a presença de imunoativação e auxilia no diagnóstico da rejeição aguda.

A hibridização *in situ* é outro método pelo qual a localização específica da célula produtora do RNAm é precisa, embora seja tecnicamente mais elaborada e impraticável para processamentos de rotina<sup>43</sup>.

### Linfócitos T citotóxicos, perforina, granzima e fas ligante

Os linfócitos T e os macrófagos compõem a maior parte do infiltrado leucocitário, sendo os linfócitos B e células "natural killer" minoria<sup>9</sup>. Apesar dos achados diferirem na literatura, alguns estudos mostram predominância de linfócitos T CD8+ na rejeição severa ou irreversível, e de CD4+ quando o infiltrado é focal e a rejeição mais leve<sup>29,46,47</sup>.

A identificação dos linfócitos T com propriedades citotóxicas foi demonstrada por Ström *et al.*<sup>38</sup>, através da fenotipagem do infiltrado mononuclear em rins com rejeição irreversível. Posteriormente, utilizando a técnica do PCR competitivo, os mesmos autores quantificaram, em rins com rejeição, a expressão aumentada dos genes de perforina e granzima B, que atuam na fase citodestrutiva da resposta imune<sup>45</sup>. Como fatores preditivos de rejeição aguda, a perforina e a granzima B mostraram uma sensibilidade de 90% e 80% e especificidade de 88% e 96%, respectivamente. Outros autores também identificaram, utilizando imunohistoquímica, a marcação para granzima A e B e perforina em células CD8+ e "natural-killer", restritas a enxertos com rejeição clinicamente manifestada<sup>41,48</sup>.

Fas e seu ligante Fas-L (CD95 ou APO-1) são proteínas de membrana pertencentes à família do fator de necrose tumoral (TNF). A molécula de Fas-L se expressa predominantemente na superfície dos linfócitos Th-1 ativados, interagindo na regulação da resposta imune. A ligação do Fas ao seu ligante Fas-L induz morte celular por apoptose, através de mecanismos ainda desconhecidos<sup>49,50</sup>.

É controverso o papel do Fas como molécula coestimulatória, dependente da célula T, na fase efetora da rejeição a aloenxertos. Estudos clínicos com PCR-RT têm demonstrado a expressão do RNA mensageiro da perforina e do Fas-L em rins com rejeição irreversível<sup>51</sup>. Entretanto, Larsen *et al.*<sup>52</sup> observaram em transplante cardíaco experimental que a ausência seletiva do sistema Fas/Fas-L não altera o desenvolvimento e o tempo de rejeição. Provavelmente o sistema Fas/Fas-L não é um marcador de RA, mas participa de forma mais

ampla no controle da resposta imune, eliminando células T autoreativas e aloreativas e assim impedindo a sua expansão<sup>53-55</sup>.

#### *Citocinas e fatores de crescimento*

Diversos estudos têm demonstrado a expressão *in situ* de citocinas e moléculas de adesão em rins estáveis e com rejeição aguda. Utilizando a técnica da fosfatase alcalina, Noronha *et al.*<sup>56</sup> detectaram maior expressão de TNF- $\alpha$ , interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e IL-2R na vigência de RA do que em rins sem rejeição ou com rejeição crônica. Em estudo posterior envolvendo rins com rejeição, descreveram a predominância de IL-1, IL-2, IL-2R, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  na RA, e de fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) em rins com fibrose e proliferação vascular<sup>57</sup>. Mais recentemente, outros autores<sup>58</sup>, empregando PCR-RT em biópsias de rins com disfunção, também correlacionaram fibrose intersticial e nefropatia crônica do enxerto com a expressão aumentada do RNAm de TGF- $\beta_1$ .

A interleucina 2 isoladamente parece não ser um bom marcador de RA durante sua evolução clínica. Em estudo preliminar com biópsia aspirativa por agulha fina e PCR-RT, Dallman *et al.*<sup>59</sup> encontraram aumento precoce mas fugaz da expressão dos gens de IL-2 e IFN- $\gamma$ , precedendo o aparecimento da rejeição clínica. Este achado já havia sido demonstrado no modelo experimental de ilhotas pancreáticas em camundongos<sup>60</sup>, em relação ao aumento transitório e precoce de IL-2, IFN- $\gamma$  e granzima B, com pico e declínio antes da rejeição clínica. Krams *et al.*<sup>61</sup> analisando rins com RA relatam aumento de IL-6 e TNF- $\alpha$ , e não de IL-2 e IFN- $\gamma$ . Outro estudo<sup>62</sup>, utilizando a hibridização *in situ* não-radioativa em rins com rejeição, descreve uma baixa frequência de células positivas para IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ , sugerindo que o estímulo para a transcrição destas citocinas é menor ou não sustentado na rejeição em curso.

Estudos recentes utilizando PCR-RT têm demonstrado a expressão intraenxerto de potenciais marcadores de RA, como a IL-10 e a IL-15. Xu *et al.*<sup>63</sup> encontraram coexpressão de IL-10 e IFN- $\gamma$  em forte associação com rejeição, observando que a IL-10 não bloqueou a expressão *in vivo* de IL-2, IL-7 e IFN- $\gamma$ . Dados clínicos e experimentais suportam a noção de que a IL-10 possa, em diferentes circunstâncias, apresentar propriedades imunomoduladoras ou imunostimulatórias<sup>63,65</sup>.

De forma semelhante à IL-2, a IL-15 estimula a proliferação e expansão clonal das células T, induzindo sua função citotóxica<sup>66</sup>. Pavlakis *et al.*<sup>64</sup> encontraram um aumento significativo do RNAm da

IL-15 em rins com rejeição aguda, em relação a outras causas de disfunção do enxerto. Os autores postulam que durante a RA, a IL-15 pode manter a expansão clonal dos linfócitos T, não sendo inibida por imunossuppressores como a ciclosporina. Adicionalmente, no modelo experimental de transplante de ilhotas pancreáticas, utilizando-se animais nos quais o gen da IL-2 foi inativado por recombinação homóloga ("knock-out" genético), observou-se um aumento da expressão do gen da IL-15 durante a RA, quando comparado à transplantantes feitos em animais portadores de IL-2<sup>67</sup>.

#### *Moléculas de adesão*

A expressão constitutiva e induzível das moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e de células endoteliais (VCAM-1) e seus ligantes foi demonstrada na rejeição aguda ao enxerto renal<sup>42,68,69,70,71</sup>. Brockmeyer *et al.*<sup>69</sup> descreveram aumento da expressão de ICAM-1 no interstício, túbulos e capilares peritubulares, e de VCAM-1 em túbulos e endotélio peritubular, em associação com infiltrado linfocitário. Alguns autores<sup>68,70</sup> sugerem que as moléculas de adesão seriam marcadores precoces da rejeição aguda, mas a baixa especificidade deste achado torna a sua aplicabilidade clínica questionável<sup>42,72</sup>.

## CONCLUSÃO

A validade clínica da biópsia seriada do rim transplantado, sob o aspecto terapêutico e prognóstico, ainda não foi estabelecida. O que parece indiscutível é a necessidade da detecção precoce de uma rejeição celular incipiente, na tentativa de se obter uma resposta terapêutica eficaz com uma imunossupressão menos agressiva, e de prevenir a ocorrência da nefropatia crônica do enxerto<sup>44</sup>. Diversos autores<sup>2,5,6</sup> mostraram que episódios iniciais de rejeição celular aguda são a variável mais fortemente associada com rejeição crônica, sendo esta a causa mais importante de perda tardia do rim transplantado.

Entretanto, o diagnóstico da rejeição aguda nem sempre é possível ou acurado em bases histológicas<sup>40</sup>, o que leva a potencial utilização de técnicas laboratoriais adicionais, com o óbice de seu alto custo e difícil rotinização na maioria dos centros transplantadores. A imunohistoquímica identifica moléculas na estrutura celular e os métodos moleculares, como o PCR-RT quantificam a expressão do RNAm e a ativação dos gens que codificam estas proteínas, informando sobre a quantidade, localização e características funcionais do infiltrado leucocitário e das células do parênquima renal.

Empregando estes métodos em biópsias seriadas seria possível identificar, antes que ocorra a disfunção do enxerto, qualquer marcador de fase precoce que possa prever especificamente dano ao enxerto, a exemplo de IL-2 e IFN- $\gamma$ <sup>59,60</sup>, IL-10<sup>63</sup>, IL-15<sup>64</sup>, perforina e granzima<sup>41,45,48,68</sup>, e Fas ligante<sup>51,52</sup>. Este achado poderia ser uma justificativa para aumentar a imunossupressão e potencialmente diminuir ou bloquear um episódio de rejeição. O impacto desta conduta a longo prazo ainda é incerto, mas especula-se que poderia prolongar a sobrevida do enxerto<sup>32</sup>.

É possível que no futuro a associação de histopatologia, imunohistoquímica e métodos moleculares em biópsias processadas rotineiramente, permita um diagnóstico mais acurado da rejeição aguda, seu tratamento precoce e, talvez, diminua o risco de rejeição crônica, proporcionando maior sobrevida do rim transplantado e submetendo o paciente a menor morbidade.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cecka JM. Early rejection: determining the fate of renal transplants. *Transplant Proc* 1991; 23: 1.263-4.
- Gulanikar AC, MacDonald AS, Sungurtein U *et al*. The incidence and impact of early rejection episodes of graft outcome in recipients of first cadaver kidney transplants. *Transplantation* 1992; 53:323-8.
- Basadonna GP, Matas AJ, Gillingham KJ *et al*. Early vs late acute renal allograft rejection: impact on chronic rejection. *Transplantation* 1993; 55: 993-5.
- Matas AJ, Gillingham K, Payne WD *et al*. The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival (T1/2). *Transplantation* 1994; 57(6): 857-9.
- van Saase JL, van der Woude FJ, Thorogood J *et al*. The relation between acute vascular and interstitial renal allograft rejection and subsequent chronic rejection. *Transplantation* 1995; 59(9): 1.280-85.
- Cole E, Naimark D, Aprile M *et al*. An analysis of predictors of long-term cadaveric renal allograft survival. *Clin. Transplantation* 1995; 9: 282-8.
- Burdick J, Beschoner W, Smith W *et al*. Characteristics of early routine renal allograft biopsies. *Transplantation* 1984; 38(6): 679-84.
- McWhinnie D, Thompson J, Taylor J *et al*. Leucocyte infiltration patterns in renal allografts assessed by immunoperoxidase staining of 245 sequential biopsies. *Transplant Proc* 1985; 17(1): 560-1.
- McWhinnie D, Thompson J, Taylor H *et al*. Morphometric analysis of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labeling in sequential human renal allograft biopsies. *Transplantation* 1986; 42(4): 352-8.
- Isoniemi H, Krogerus L, von Willebrand E *et al*. Histopathological findings in well-functioning, long term renal allografts. *Kidney Int* 1992; 41: 155-60.
- Rush DN, Henry SF, Gough J *et al*. Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. *Transplantation* 1994; 57(2), 208-11.
- Rush D, Jeffery J, Gough J. Sequential protocol biopsies in renal transplant patients: repeated inflammation is associated with impaired graft function at 1 year. *Transplant Proc* 1995; 27(1): 1.017-18.
- Bohman S, Wilczek H, Reinholt F *et al*. Immunopathological patterns in long-term renal allografts. *Transplantation* 1991; 51(3): 610-13.
- Séron D, Díaz-Gallo C, Griño J *et al*. Characterization of interstitial infiltrate in early renal allograft biopsies in patients with stable renal function. *Transplant Proc* 1991; 23(1): 1.267-79.
- Nahas WC, Mazzuchi E, Henrique A *et al*. Percutaneous needle biopsy of the renal allograft using the automated needle system: evaluation of 87 procedures. *J Urol* 1993; 150: 313-15.
- Wilczek HE. Percutaneous needle biopsy of the renal allograft. A clinical safety evaluation of 1129 biopsies. *Transplantation* 1990; 50(5): 1.790-97.
- Kolb LG, Velosa JA, Bergstralh EJ *et al*. Percutaneous renal allograft biopsy. A comparison of the two needle types and analysis of risk factors. *Transplantation* 1994; 57: 1.742-46.
- Gonçalves LF, Manfro RC, Rauber L *et al*. Evaluation of fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis of acute renal transplant dysfunction. *Transplant Proc* 1992; 24: 3.081-2.
- Nield GN e Rudge CJ. Acute and chronic rejection. In Thomson A & Catto G eds. *Immunology of Renal Transplantation*, 1st ed. London, Edward Arnold, 1993; 221-34.
- Delaney V, Ling BN, Campbell WG *et al*. Comparison of fine-needle aspiration biopsy, Doppler ultrasound, and radionuclide scintigraphy in the diagnosis of acute allograft dysfunction in renal transplant recipients: sensitivity, specificity, and cost analysis. *Nephron* 1993; 63: 263.
- Gray D, Richardson A, Hughes D *et al*. A prospective, randomized, blind comparison of three biopsy techniques in the management of patients after renal transplantation. *Transplantation* 1992; 53(6): 1.226-32.
- Kiss D, Landman J, Mihtasch M *et al*. Risks and benefits of graft biopsy in renal transplantation under cyclosporin-A. *Clin Nephrology* 1992; 38: 132.
- Manfro RC, Lee JY, Lewgoy J *et al*. O papel da biópsia renal percutânea no transplante renal. *Rev Ass Med Brasil* 1994; 40(2): 108-12.
- Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H *et al*. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993; 44: 411-22.
- Marcussen N, Olsen TS, Benediktsson H *et al*. Reproducibility of the Banff classification of renal allograft pathology. Inter and intraobserver variation. *Transplantation* 1995; 60(10): 1.083-9.
- Colvin RB. The renal allograft biopsy. *Kidney Int* 1996; 50: 1.069-82.
- Hancock W, Thomson N, Atkins R. Composition of interstitial cellular infiltrate identified by monoclonal antibodies in renal biopsies of rejecting human renal allografts. *Transplantation* 1983; 35: 458.
- Andersen C, Ladefoged S, Larsen S. Acute kidney graft rejection. A morphological and immunohistological study on "zero-hour" and follow-up biopsies with special emphasis on cellular infiltrates and adhesion molecules. *APMIS* 1994; 102: 23-37.
- Sako H, Nakane Y, Okino K *et al*. Immunohistochemical study of the cells infiltrating human renal allografts by the ABC and IGSS method using monoclonal antibodies. *Transplantation* 1987; 44(1): 43-50.
- Limchin L, Houghton D, Norman D *et al*. Evaluation of routine renal allograft biopsies. 14th Annual Meeting of the American Society of Transplant Physicians, May 14-17, 1995; Abstract 148: 110.
- Rush DN, Jeffery JR, Gough J. Protocol biopsies in stable renal transplant patients under triple immunosuppression: results at 6 months. *Transplant Proc* 1995; 26(5): 2.576.

32. Serón D, Moresco F, Bover J *et al.* Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 1997; 51: 10-16.
33. Souillou JP. Relevant targets for therapy with monoclonal antibodies in allograft transplantation. *Kidney Int* 1994; 46: 540-53.
34. Suthantiran M, Morris RE, Strom TB. Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action. *American Journal of Kidney Diseases* 1996; 28(2): 159-72.
35. John S, Neumayer HH, Weber M. Serum circulating ICAM-1 levels are not useful to indicate active vasculitis or early renal allograft rejection. *Clin Nephrol* 1994; 42(6): 369-75.
36. Kutukculer N, Clark K, Rigg KM *et al.* The value of posttransplant monitoring of interleukin (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, and soluble CD23 in the plasma of renal allograft recipients. *Transplantation* 1995; 59(3): 333-40.
37. Alcalde G, Merino J, Sanz S. Circulating adhesion molecules during kidney allograft rejection. *Transplantation* 1995; 59(12): 1.695-99.
38. Strom TB, Tilney NL, Carpenter CB *et al.* Identity and cytotoxic of cells infiltrating renal allografts. *N Eng J Med* 1975; 292(24): 1.257-63.
39. Strom TB, Tilney NL, Paradysz JM. Cellular components of allograft rejection: identity, specificity, and cytotoxic function of cells infiltrating acutely rejecting allografts. *J Immunol* 1977; 118(6): 2.020-26.
40. Serón D, Alexopoulos E, Raftery MJ *et al.* Diagnosis of rejection in renal allograft biopsies using the presence of activated and proliferating cells. *Transplantation* 1989; 47(5): 811-16.
41. Kummer JA, Wever PC, Kamp AM *et al.* Expression of granzyme A and B proteins by cytotoxic lymphocytes involved in acute renal allograft rejection. *Kidney Int* 1995; 47: 70-7.
42. Manfro RC, Gonçalves LF, Rauber M *et al.* Analysis of ICAM-1 and HLA-DR expression on renal allograft aspirates. *Clin Transplantation* 1996; 10: 379-83.
43. Dallman MJ. Cytokine regulation of the immune response to organ transplants. In Thomson A & Catto G eds. *Immunology of Renal Transplantation*. 1st ed. London, Edward Arnold, 1993; 97-111.
44. Pavlakis M, Lipman M, Strom TB. Intra-graft expression of T-cell activation genes in human renal allograft rejection. *Kidney Int* 1996; 49(53): S7-S12.
45. Lipman ML, Stevens AC, Strom TB. Heightened intra-graft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts. *J Immunol* 1994; 152: 5.120-27.
46. Kolbeck P, Tatum A, Sanfilippo F. Phenotypic evaluation of mononuclear cell infiltrates in renal allograft biopsies. *Transplant Proc* 1985; 17(1): 893-5.
47. Van Es A, Meyer C, Olijans P *et al.* Mononuclear cells in renal allografts. Correlation with peripheral blood T lymphocyte subpopulations and prognosis. *Transplantation* 1984; 37: 134.
48. Matsuno T, Sakagami K, Saito S *et al.* Does perforin mediate the direct injury of renal allograft in acute rejection? *Transplant Proc* 1993; 25(1): 879-80.
49. Crispe IN. Fatal interactions: Fas-induced apoptosis of mature T cells. *Immunity* 1994; 1: 347-9.
50. Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol Today* 1995; 16(12): 569-74.
51. Marques VP, Balda CA, Moura LA *et al.* Expressão intraxerxto renal humano de mRNA de perforina, FasL e iNOS durante rejeição aguda irreversível. Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Nefrologia, São Paulo, 1996. Disciplina de Nefrologia, UNIFESP-EPM, São Paulo.
52. Larsen CP, Alexander DZ, Hendrix R *et al.* Fas-mediated cytotoxicity. An immunoeffector or immunoregulatory pathway in T cell-mediated immune response? *Transplantation* 1995; 60(3): 221-4.
53. Dhein J, Walczak H, Bäumler C *et al.* Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 1995; 373: 438-41.
54. Singer GG & Abbas AK. The Fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1994; 1:365-71.
55. Puijls LV, Ibraghimov A, Abbas AK. The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity* 1996; 4: 321-28.
56. Noronha IL, Eberlein-Gonska M, Hartley B *et al.* In situ expression of tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and interleukin-2 receptors in renal allograft biopsies. *Transplantation* 1992; 54(6): 1.017-24.
57. Noronha I, Weis H, Hartley B *et al.* Expression of cytokines, growth factors, and their receptors in renal allograft biopsies. *Transplant Proc* 1993; 25(1): 917-18.
58. Sharma VK, Bologa RM, Xu G-P *et al.* Intra-graft TGF-β1 mRNA: A correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 1996; 49: 1.297-303.
59. Dallman MJ, Larsen CP, Morris PG. Cytokine gene transcription in vascularized organs grafts: analysis using semi-quantitative polymerase chain reaction. *Journal Experimental Medicine* 1991; 174: 493-96.
60. O'Connell P, Pacheco-Silva A, Nickerson P. Unmodified pancreatic islet allograft rejection results in the preferential expression of certain T cell activation transcripts. *J Immunol* 1993; 150: 1.093-104.
61. Krams SM, Falco DA, Villanueva JC *et al.* Cytokine and T cell receptor gene expression at the site of allograft rejection. *Transplantation* 1992; 53 (1): 151-56.
62. Grimm PC, McKenna RM, Gospoderek EM *et al.* Low frequency of infiltrating cells intensely expressing T cell cytokine mRNA in human renal allograft rejection. *Transplantation* 1995; 59: 579-84.
63. Xu G-P, Vijay KS, Li B *et al.* Intra-graft expression of IL-10 messenger RNA: A novel correlate of renal allograft rejection. *Kidney Int* 1995; 48: 1.504-7.
64. Pavlakis M, Strehlau J, Lipman M *et al.* Intra-graft IL-15 transcripts are increased in human renal allograft rejection. *Transplantation* 1996; 62(4): 543-45.
65. Zheng XX, Steele AW, Nicherson PN *et al.* Administration of non cytolytic IL-10 FC in immune models of lipopolysaccharide-induced septic shock and allogeneic islet transplantation. *Journal Immunology* 1995; 154: 5.590-600.
66. Grabstein K, Eisenman J, Shanebeck K *et al.* Cloning of a T cell growth factor that interacts with the chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 1994; 264: 965.
67. Manfro RC, Roy-Chaudhury P, Zheng XX *et al.* Interleukin-15 gene transcripts are present in rejection islet allografts. *Transplant Proc* 1997, 29: 1.077-78.
68. Matsuno T, Sakagami K, Saito S *et al.* Expression of intercellular adhesion molecule-1 and perforin on kidney allograft rejection. *Transplant Proc* 1992; 24(4): 1.306-67.
69. Brockmeyer C, Ulbrecht M, Schendel D *et al.* Distribution of cell adhesion molecules (Icam-1, Vcam-1, Elam-1) in renal tissue during allograft rejection. *Transplantation* 1993; 55(3): 610-15.
70. von Willebrand E, Krogerus L, Salmela K. Expression of adhesion molecules and their ligands in acute rejection of human kidney allografts. *Transplant Proc* 1995; 27(1): 917-18.
71. Hill P, Main I, Atkins R. ICAM-1 and VCAM-1 in human renal allograft rejection. *Kidney Int* 1995; 47: 1.383-91.
72. Thervet E, Patey N, Legendre Ch *et al.* Prospective serial evaluation of cell adhesion molecule expression in transplanted kidneys. *Transplant Proc* 1995; 27(1): 1.007-8.