

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

AVALIAÇÃO DE APOPTOSE EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS
PERIFÉRICOS EXPOSTOS À RAPAMICINA

TAÍSA AOZANI PROCHNOW

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 CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS PERIFÉRICOS
EXPOSTOS À RAPAMICINA

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

TAÍSA AOZANI PROCHNOW

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Santos Gonçalves

PORTO ALEGRE

2004

Ao meu irmão, André Aozani Prochnow,
fonte inesgotável de estímulo e carinho em
todas as etapas desta busca pelo conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Santos Gonçalves, pela orientação segura e sempre presente em todos os momentos da execução deste trabalho, por ter propiciado crescimento profissional e pessoal através de conhecimentos transmitidos durante a elaboração da dissertação.

As colegas do Laboratório de Nefrologia, Esther C. Aquino Dias e Virna Nowonty Carpio, pela imprescindível colaboração durante a realização deste trabalho, pelo apoio e estímulo, e pela amizade construída a cada dia de nosso convívio.

A minha mãe, Ana Maria, pelo exemplo de força, pelo amor e pelo apoio.

A minha irmã, Liége, pela paciência e por suas palavras de estímulo.

Aos amigos, em especial à Larissa e à Débora, pelo incentivo e apoio.

A Florência Barbé, Denise Cantarelli Machado e Andres Cañedo, pela colaboração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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 QUADROS.....	
LISTA DE FIGURAS.....	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 A resposta imune ao aloenxerto.....	02
1.2 Imunossuppressores.....	05
1.2.1 Rapamicina.....	07
1.3 Transplante de órgãos e apoptose.....	08
1.3.1 Apoptose.....	09
1.4 Referências Bibliográficas.....	14
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3. ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	22
4. ARTIGO EM INGLÊS.....	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Diferenças entre apoptose e necrose.....	11
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Local de ação de drogas imunossupressoras.....	07
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs: células apresentadoras de antígenos

CPH: complexo principal de histocompatibilidade

HLA: antígenos leucocitários humanos

IFN-gama: interferon-gama

IL-1: interleucina 1

IL-2: interleucina 2

IL2-R: receptor de interleucina 2

IL-3: interleucina 3

IL-4: interleucina 4

IL-6: interleucina 6

IMPDH: iosino monofosfato desidrogenase

IRC: insuficiência renal crônica

mTOR: mammalian target of rapamycin

NFAT: fator nuclear de célula T ativada

TCR: receptor da célula T

TNF: fator de necrose tumoral

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP biotin nick end labeling.

1. INTRODUÇÃO

A hemodiálise, a diálise peritoneal e o transplante são as três modalidades terapêuticas utilizadas para o portador de insuficiência renal crônica (IRC), as quais surgiram e se desenvolveram de forma independente durante o século 20 (1-4).

O transplante renal representa atualmente a melhor opção terapêutica e de reabilitação para o paciente com IRC terminal e, portanto, é o tratamento universalmente de escolha para esses pacientes (5, 6). O primeiro transplante renal, com sucesso, foi realizado em 1954, por John Merrill, Joseph Murray e William Hartwell, em Boston (2). Nos últimos 40 anos, o transplante vem progredindo de forma excepcional, os avanços na compreensão da imunologia dos transplantes e o desenvolvimento de drogas imunossupressoras mais efetivas e eficazes diminuiu a incidência de rejeição aguda de 70% para menos de 20%, com paralelo aumento da sobrevida de 1 ano do enxerto de 40% para próximo de 90%, sendo que a maioria dos transplantes ultrapassa 5 anos com função adequada (4, 7-9). Apesar desses avanços e da introdução de múltiplos recursos diagnósticos e terapêuticos, no que se refere à prevenção e controle da rejeição ao aloenxerto, esta ainda é uma das causas de perda do enxerto (1, 4, 9).

O objetivo da utilização de protocolos de imunossupressão no transplante de órgãos é bloquear a resposta imune aos antígenos do enxerto, procurando preservar, idealmente, os demais aspectos da imunidade. Como a imunidade mediada por linfócitos T é reconhecida como principal mecanismo na rejeição, procura-se desenvolver métodos que deprimam mais seletivamente este tipo de resposta imune (10, 11).

A imunossupressão passou a ser utilizada no início dos anos 60 com a prednisona e a azatioprina. Estas duas drogas produziam inadequada imunossupressão, não dispunham de monitorização do nível sanguíneo, sendo que a rejeição aguda manifestava-se de forma clínica

exuberante (1,12). Dezoito anos mais tarde iniciou-se o emprego da ciclosporina, fármaco que produziu um novo impulso aos transplantes. Ciclosporina, azatioprina e prednisona, substituíram o esquema terapêutico clássico, de associação entre azatioprina e prednisona (10). Com este esquema triplice e com o uso de anticorpos antilinfocitários, a sobrevida do enxerto com doador cadáver aumentou entre 15 e 20%, alcançando 80 e 90% ao final do primeiro ano. Estes excelentes resultados impulsionaram o número de transplantes de coração, fígado e pulmão (13).

1.1 A RESPOSTA IMUNE AO ALOENXERTO

Os órgãos transplantados são rejeitados devido a respostas imunológicas do receptor direcionadas a antígenos expressos no órgão do doador. A natureza imunológica da reação de rejeição foi estabelecida há mais de quarenta anos, quando experimentos de enxertos de pele em ratos levaram à descoberta do complexo principal de histocompatibilidade (CPH) (14).

Os antígenos do sistema HLA (antígenos leucocitários humanos) –denominação do complexo principal de histocompatibilidade em humanos, são determinados geneticamente e localizam-se no braço curto do cromossomo 6, sendo constituídos por glicoproteínas e desempenham importantes funções no sistema imune (15-17).

Estes antígenos são divididos em duas classes, denominadas I e II. Os antígenos de classe I, isto é, HLA-A, B e C estão presentes nas membranas citoplasmáticas da maioria das células nucleadas do organismo, incluindo os linfócitos T e B, plaquetas e células de órgãos parenquimatosos, sendo os alvos dos linfócitos T citotóxicos, e são facilmente detectados por métodos sorológicos. Os antígenos de classe II, principalmente HLA-DP, DQ e DR, têm distribuição restrita e não são tão bem caracterizados. São normalmente encontrados em linfócitos B, células T ativadas, macrófagos, no endotélio vascular e em algumas células epiteliais. Da mesma forma que os antígenos de classe I, podem ser detectados por métodos sorológicos e

moleculares. A compatibilização dos pares doador e receptor dos antígenos do HLA é importante para o sucesso dos transplantes (10, 18-20).

A rejeição do enxerto ocorre devido a respostas celular e humoral, desencadeadas pelas incompatibilidades nos antígenos de histocompatibilidade. Efeitos citotóxicos voltados às células do órgão transplantado, acompanhados de resposta inflamatória não específica resultam em alterações estruturais e funcionais no órgão (21). Várias células estão envolvidas no processo de rejeição, como macrófagos, leucócitos, células T citotóxicas (CD8+) e auxiliares (CD4+), plasmócitos, entre outras. Essas células são mediadoras de uma cascata de eventos que, se não for modificada por agentes imunossupressores ou mecanismos naturais, resultará na destruição do enxerto.

A prevenção ou inibição da função efetora das células T é o alvo principal para a imunossupressão. Após emergir da medula óssea, os precursores de linfócito T são maturados no timo e se distribuem nos tecidos, onde seletivamente se ligam a antígenos através de receptores específicos. O receptor da célula T (TCR) recebe o sinal inicial da presença do aloenxerto pela apresentação do aloantígeno, de forma direta ou indireta, no contexto das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (CPH) das células apresentadoras de antígenos. Os linfócitos T, CD4+ e CD8+ se ligam aos componentes monomórficos do CPH classe II e classe I respectivamente, estimulando a redistribuição de proteínas de superfície, como CD2 e CD5, e a organização do complexo TCR/CD3. Após estímulo via TCR, o CD3 funciona como um componente transdutor de sinal através da fosforilação de suas projeções intracelulares. A ativação coordenada destas células resulta em liberação de citocinas e interações entre moléculas de superfície celular, com recrutamento local de linfócitos T (CD4+ e CD8+), linfócitos B e outros leucócitos pró-inflamatórios. A ligação entre TCR e o antígeno apresentado no CPH das células apresentadoras ativa uma série de quinases, resultando na mobilização do cálcio intracelular, que

se liga a calmodulina. As quinases dependentes da associação cálcio-calmodulina como a calcineurina são ativadas por desfosforilação (22).

O aumento do cálcio livre intracelular e a ativação da PKC promovem a expressão de proteínas reguladoras nucleares, e expressão de genes centrais ao crescimento celular. A calcineurina é uma fosfatase serina-treonina, calmodulina-dependente que participa na transdução dos sinais de ativação até o núcleo, transcrevendo genes que codificam citocinas relevantes na transformação da célula T de repouso para o estado ativado. A calcineurina desfosforilada atua no fator nuclear de célula T ativado (NFAT), que se desloca para o núcleo, onde se liga à região promotora de genes para IL-2, IL-4 e IFN-gama, causando a transcrição dos mesmos e secreção destas citocinas (22).

Para alcançar esta ativação sustentada, há necessidade de participação de sinais co-estimulatórios no contato célula apresentadora de antígeno e linfócito T, que estabilizem esta interação. Este contato é inativo durante o repouso, mas, após a ativação, há produção de citocinas inflamatórias, que induzem a expressão de moléculas de adesão na superfície celular, promovendo a adesão dos leucócitos ao endotélio vascular e sua migração trans-endotelial (23). As moléculas de adesão também promovem de forma não específica o contato das células T com as células apresentadoras de antígeno e a transdução de sinais regulatórios ao linfócito T, subsequentes à interação do receptor do linfócito T e seu antígeno (24). Múltiplos receptores de superfície e moléculas de co-estimulação estão envolvidos na interação entre o linfócito T e as células apresentadoras de antígenos (APCs), os quais serão descritos a seguir.

Os principais sinais co-estimulatórios são ICAM1, CD28-CTLA4, CD40L, CD2 e LFA1, expressos na superfície do linfócito T, que se ligam aos seus correspondentes na célula apresentadora de antígeno, respectivamente LFA1, B7 (CD80 e CD86), CD40, LFA3, ICAM1.

A ligação através do CD28-B7 estimula a ativação e transcrição de genes produtores de IL-2 e outras citocinas em via independente de cálcio e PKC, desta forma não sensível aos bloqueadores de calcineurina. Sinais co-estimulatórios também podem partir das citocinas de células apresentadoras de antígenos (25).

Com a interação do TCR e seu antígeno e concomitante ativação dos sinais co-estimulatórios e transcrição estável dos genes para citocinas, as células T se movem da fase G0 de repouso para a fase de ativação G1. O progresso da fase G1 para S é regulado por uma variedade de receptores presentes na superfície da célula T, incluindo receptores de interleucina 2 (IL2-R), que atuam no controle de enzimas chaves na indução da divisão celular (26). A IL-2 e outras interleucinas se ligam ao seu correspondente receptor, levando à ativação desta via de promoção do ciclo celular. Uma vez ativados e proliferados, os linfócitos T com capacidade citotóxica produzem granzimas e perforinas, enzimas líticas que contém indutores de apoptose, os quais desencadeiam mecanismos apoptóticos nas células alogênicas transplantadas, culminando com sua destruição (27).

A participação do linfócito B e imunoglobulinas nesta resposta ainda não está bem esclarecida. Sua estimulação é dependente de sinais antigênicos e co-estimulatórios, gerados pela interação de antígenos específicos e imunoglobulinas de superfície. Citocinas derivadas de células T (IL-2 e IL-4) e o contato físico entre linfócitos T e B via CD40/CD40L funcionam como sinais co-estimulatórios (26).

1.2 IMUNOSSUPRESSORES

A introdução de drogas imunossupressoras representou um marco fundamental para o sucesso do transplante de órgãos. Os imunossupressores bloqueiam diversas fases da ativação celular, que culminam com a rejeição ao aloenxerto. Os centros de transplante têm estabelecido

seus próprios protocolos de imunossupressão, os quais invariavelmente incorporam a combinação de fármacos que agem em diferentes passos da ativação do linfócito T, com efeito, final aditivo ou sinérgico (10, 28). Os imunossupressores em uso clínico apresentam mecanismos de ação diferentes. Os corticóides inibem a transcrição de genes que codificam várias citocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, fator de necrose tumoral-alfa e interferon-gama, a azatioprina inibe a proliferação celular através da alquilação dos precursores do DNA, a ciclosporina e o tacrolimus bloqueiam a proliferação dos linfócitos T através da inibição da calcineurina, a rapamicina bloqueia a proliferação de linfócitos dependente de IL-2, o micofenolato mofetil inibe a enzima iosino monofosfato desidrogenase (IMPDH) que acarreta na inibição da proliferação de linfócitos e o OKT3 é um anticorpo monoclonal que se liga à molécula de CD3 das células T, promovendo a depleção de linfócitos T (10).

A figura 1 mostra o local de ação de diversas drogas imunossupressoras.

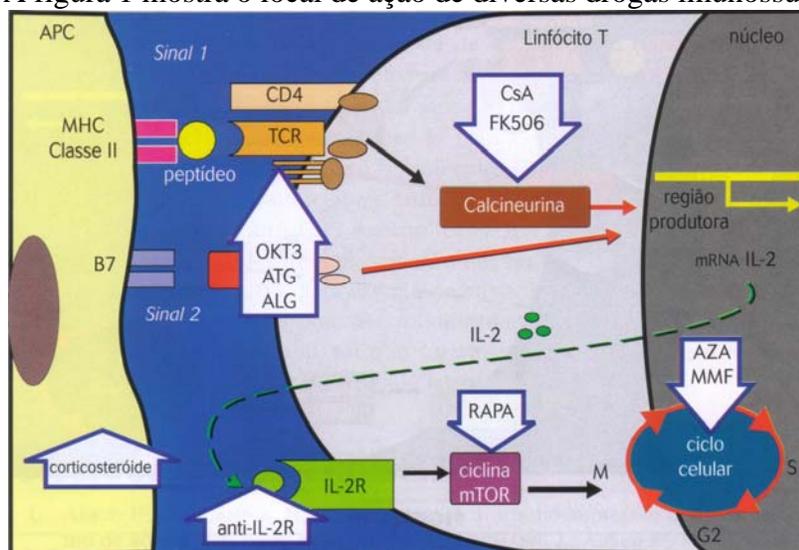


Fig 1- Apresentação esquemática dos mecanismos de ativação

Do linfócito T. APC = célula apresentadora de antígenos; MHC+ complexo principal de histocompatibilidade; TCR = receptor da célula T; IL-2 = interleucina 2; IL-2R = receptor da interleucina 2; B7-CD28 = moléculas co-estimulatórias.

Fonte: Manual de Transplante Renal, ed Manole 2004

1.2.1 RAPAMICINA

A rapamicina, imunossupressor mais recentemente aprovado para uso clínico, é um antibiótico macrolídeo isolado do fungo *Streptomyces hygroscopicus*. Este fármaco apresenta mecanismo de ação diferente das drogas imunossupressoras até então utilizadas. A sua ação imunossupressora depende de sua ligação na imunofilina FKBP12, formando o complexo ativo Rapa/FKBP, que inibe a atividade enzimática da mTOR (*mammalian target of rapamicin*) (12, 29-32). Esta enzima é responsável pelo controle da atividade enzimática de diversas proteínas envolvidas na transdução de sinais de ativação e proliferação derivados de receptores da membrana de linfócitos, principalmente aqueles derivados do receptor de interleucina 2 (IL2R) e do receptor de co-estimulação linfocitário CD28.

A proliferação celular, após a ativação das vias Ca^{++} dependente e Ca^{++} independente também é inibida pela rapamicina. As rapamicinas (sirolimus e everolimus) inibem o ciclo celular na transição da fase G1 para S em diversas linhagens celulares, incluindo células musculares lisas (alvo primário de seu possível efeito na nefropatia crônica do enxerto) e os linfócitos (alvo primário de seu efeito imunossupressor) (12, 33).

A especificidade, a seletividade, e o sinergismo com outros imunossupressores tornam a rapamicina uma droga especialmente atrativa. A especificidade é consequência do efeito da rapamicina ocorrer apenas em células ativadas. A seletividade por células linfóides decorre da maior sensibilidade destas células ao efeito antiproliferativo da rapamicina quando comparadas com outras células de linhagem mielóide ou mesenquimal (12). O sinergismo com

inibidores da calcineurina foi amplamente estudado em modelos experimentais *in vivo* e em trabalhos *in vitro* (35, 35).

A rapamicina é rapidamente absorvida após administração oral, atingindo pico de concentração sanguínea em uma ou duas horas, com biodisponibilidade média de 14%, com variação intra (26%) e interindividual (50%). A meia vida de eliminação é de aproximadamente 62 horas, sendo excretada quase totalmente pela bile (12).

Para identificar a relação entre dose e eficácia da combinação de rapamicina e ciclosporina standard, um estudo multicêntrico, randomizado, paralelo (6 grupos) e controlado com placebo foi realizado. Pacientes recebendo as doses usuais de ciclosporina standard receberam também rapamicina nas doses zero, 1 ou 3 mg/m²/dia. Pacientes recebendo as doses reduzidas de ciclosporina standard receberam também rapamicina nas doses de 1, 3 ou 5 mg/m²/dia. As concentrações sanguíneas de ciclosporina foram determinadas prospectivamente e as de rapamicina retrospectivamente por HPLC. Após um ano de tratamento, as sobrevidas do paciente e do enxerto não foram diferentes, sendo observada uma redução significativa na incidência de rejeição aguda em pacientes recebendo rapamicina (36).

1.3 TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS E APOPTOSE

No transplante de órgãos, a apoptose tem sido implicada na mediação da rejeição ao enxerto, na eliminação de linfócitos aloreativos e no desenvolvimento de tolerância. Estudos recentes vêm demonstrando que alguns fármacos utilizados nos protocolos de imunossupressão empregados no transplante renal induzem apoptose nos linfócitos, diminuindo a produção da IL-2, um potente fator de crescimento dos linfócitos T que estimula a divisão celular e expansão clonal das células auxiliares e citotóxicas antígeno-estimuladas (37, 38). No entanto, a influência

dos imunossupressores na regulação da apoptose de linfócitos ativados e seu papel no controle da resposta imune aos aloenxertos humanos ainda não está bem elucidado.

Um estudo realizado *in vitro*, analisou vários imunossupressores quanto a indução de apoptose em células T humanas. Os achados deste estudo sugerem que a rapamicina não induz apoptose em células T ativadas, mas inibe a proliferação e expansão destas após contato com o antígeno, indicando que as células T são silenciadas e não deletadas (39). Por outro lado, estudos experimentais *in vivo* tem demonstrado a indução de apoptose pela rapamicina (40).

1.3.1 APOPTOSE

Até aproximadamente 20 anos atrás só se definia uma via de morte celular, a necrose. Durante a década de 1970, John Kerr e colaboradores descreveram outra forma de morte, denominada de morte celular programada ou apoptose, palavra originária do grego clássico que expressa renovação e não a morte propriamente dita (41).

Necrose e apoptose são dois mecanismos distintos de morte celular. A necrose, também chamada de morte celular patológica ou acidental, ocorre quando as células são expostas a uma variação extrema de suas condições fisiológicas (como hipertermia, hipóxia, etc), ocorrendo intumescimento da célula decorrente da falência dos mecanismos de transporte de membrana. A perda da integridade da membrana plasmática permite a entrada de enzimas proteolíticas para o citosol e também a liberação do material intracelular e desencadeamento de reação inflamatória (41).

Já a apoptose é um processo natural no qual as células se inativam e degradam sua própria estrutura e componentes de maneira coordenada e característica, sem desencadear reação inflamatória (41-43). Existem várias diferenças morfológicas, bioquímicas e fisiológicas entre apoptose e necrose, como demonstrado no quadro 1.

Quadro 1. Diferenças entre apoptose e necrose

Características	Apoptose	Necrose
Tamanho das células	diminuído	aumentado
Permeabilidade da membrana celular	normal	perdida precocemente
Brotamentos da membrana celular	precoce e característicos	ausentes
Cromatina nuclear	condensada e fragmentada	não condensada e fragmentada
Formação de corpos apoptóticos	característico	ausente
Término	fagocitada rapidamente por células vizinhas	lise
Aparência nos cortes de tecidos	difícil de detectar	lesão das células e ao redor, fácil de detectar
Resposta inflamatória	ausente	presente
Desintegração das organelas	ausente	presente

Fonte: Bases Moleculares da Biologia, da Genética e da Farmacologia, 2003

A apoptose é obtida por meio de uma rota ativa que executa um programa de morte celular. Os componentes da rota podem estar presentes em muitas ou em todas as células eucarióticas. A apoptose pode ser desencadeada por vários estímulos (43).

O processo apoptótico pode ser dividido em 03 etapas: na primeira, de iniciação, a célula receberá um estímulo que irá desencadear a etapa de execução, onde ocorrerá a maior modificação morfológica e bioquímica. Na última etapa, de eliminação os restos celulares serão degradados pelos macrófagos e células adjacentes (42).

Diferentes sinais intra e extracelulares podem desencadear a morte por apoptose. As intracelulares são geralmente, originadas por *stress* biológico, o qual provoca a liberação do citocromo C da mitocôndria. Já os sinais extracelulares desencadeiam apoptose ao unirem-se aos seus ligantes presentes nas células alvo (42, 43).

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 - proteases com resíduos de cisteína (c-) que clivam seus substratos sempre depois de um resíduo de ácido aspártico (-aspase). Entre as funções das caspases destacam-se a inativação de diversas proteínas que normalmente protegem a célula da morte e a indução da expressão de sinais nas células, que as deixam marcadas para serem fagocitadas (42, 43). As caspases que participam da morte apoptótica e sua sequência de ativação dependem do indutor. Pela via extrínseca, o indutor responsável por esta ativação pode ser a ligação do receptor celular Fas com seu ligante FasL (CD95 ou APO1). Fas e seu ligante FasL são proteínas de membrana pertencentes à família do fator de necrose tumoral (TNF). 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 (43).

Cada célula pode conter os componentes da rota apoptótica e estar sujeita à regulação do balanço entre a ativação e a repressão da morte celular. O controle da apoptose é crucial. Falhas na apoptose permitem que células neoplásicas sobrevivam e, portanto, contribuem para o câncer. A ativação inapropriada da apoptose está envolvida em doenças neurodegenerativas (43).

Existem diversos métodos para qualificar ou quantificar apoptose, a maioria deles detectam alterações nucleares que ocorrem nas células durante o processo, como diminuição de tamanho, condensação da cromatina e fragmentação do DNA (41).

A coloração com hematoxilina ou a utilização de corantes fluorescentes são técnicas morfológicas simples para qualificar apoptose. Pode-se também detectar apoptose *in situ* através da técnica de imuno-histoquímica denominada TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl

Transferase-mediated dUTP biotin Nick End Labeling), já a eletroforese em gel de agarose detecta a fragmentação do DNA que ocorre durante o processo (41).

Métodos que utilizam o citômetro de fluxo são muito adequados para quantificar apoptose. Nestas técnicas pode-se analisar a fragmentação do DNA ou alguns marcadores de membrana através da utilização de corantes fluorescentes (44). Existem kits comerciais para a realização destas técnicas, como o kit que contém anexina V marcada, uma proteína que se liga a fosfatidilserina externalizada na membrana celular nas fases iniciais da apoptose.

O citômetro de fluxo é um equipamento óptico e hidráulico com a função de analisar partículas, como as células. 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. No ângulo lateral, há um complexo de filtros e espelhos que 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 (44). Através deste método pode-se avaliar apoptose em cultura de linfócitos expostos a imunossupressores (20).

A exata compreensão do mecanismo de ação dos imunossupressores é fundamental para o uso adequado no controle da resposta imune após os transplantes de órgãos. Adicionalmente, a busca em obter esquemas que induzam tolerância imunológica também depende da elucidação dos efeitos dos imunossupressores nesta situação. A rapamicina, com seus conhecidos efeitos antiproliféricos, pode representar uma nova opção no estabelecimento de esquemas de imunossupressão mais adequados. Assim, o estudo de seus mecanismos de ação, e

mais especificamente, a indução de apoptose nas células imunes, é importante para atingir estes objetivos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) 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.
- (2) Coelho V, Caldas C, Kalil J. Imunobiologia do transplante renal. In: Manfro RC, Noronha IL, Silva Filho AP e col. editores. Manual de Transplante Renal. 1 ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 2-21.
- (3) Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ, Port FK. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med*, 1999; 341: 1725-30.
- (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) Morris PJ. Results of Renal Transplantation. In: Morris PJM, editor. *Kidney*

Transplantation. Principles and Practice. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995.

- (6) Cecka JM. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. Clin Transplant, 1999; 1-12.
- (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) Suthanthiran M. Acute rejection of renal allografts: mechanistic insights and therapeutic options. Kidney Int, 1997; 51 (4): 1289-1304.
- (9) Bastos MG, Medeiros R, Manfro RC. Transplante renal. Revista da Associação Médica do Brasil, 1994; 40:283-92.
- (10) Manfro RC, Gonçalves LF, Saitovich D. Imunologia e farmacologia das drogas imunossupressoras. In: Barros EJG, Manfro RC, Thomé FS, Gonçalves LF, editores. Nefrologia. Rotinas, Diagnóstico e Tratamento. 2nd ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1998. p. 470-4.
- (11) Tedesco Silva H. Novas drogas imunossupressoras. In Manfro RC, Noronha IL, Silva Filho AP e col. Editores. Manual de Transplante Renal. 1ed. São Paulo: Manole, 2004. P. 115-29.

- (12) Saitovitch D, Pestana JMO, Pacheco e Silva FO, Neves FAR, Moura LAR, Ajzen H. Biópsia percutânea em rim transplantado: indicações, complicações e análise prospectiva de sua influência sobre a evolução do enxerto e do paciente. *J Bras Nefrol*, 1991; 13: 12-18.
- (13) Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med*, 1989; 321: 1725-38.
- (14) Dalma MJ, Morris PJ. Immunology of rejection In: Morris PJ *Kidney Transplantation, Principles and Practice*. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995.
- (15) Roitt, I. *Roitt's essential immunology*. 9th. Ed. Berlin: Blackwell Science, 1997.
- (16) 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.
- (17) Sayegh MH, Perkins DL, Carpenter CB. Transplantation Immunology. In: Brenner B, Rector, editors. *The Kidney*. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. p. 2518-41.
- (18) Bjorkan PJ, Parham P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem*, 1990; 59: 253-88.

- (19) Carpenter CB. Histocompatibility systems in man. In: Ginns LC, Cosimi AB, Morris PJ, editors. Transplantation. 2nd ed. Boston: Blackwell Science: 1999. p. 61-72.
- (20) Olpez 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.
- (21) Suthantiran M, Morris RE, Strom TB. Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action. Am J Kidney Dis, 1996; 28: 159-72.
- (22) Lipman ML. Immune-activation gene expression in clinically stable renal allograft biopses. Transplantation, 1998; 66: 1673-78.
- (23) Câmara, NOS. Estudo das vias de co-estimulação envolvidas envolvidas na proliferação linfocitária induzida por células endoteliais humanas, na presença de PHA. Departamento de Medicina-Disciplina de Nefrologia. UNIFESP. Tese de Doutorado, 2000.
- (24) Heemann UW, Tullius SG, Kupiec-Weglinski JW, Tilney NL. Early events in acute allograft rejection: Leukocyte/endothelial cell interactions. Clin Transplantation, 1993; 7: 82-89.
- (25) Sayegh MH, Turka LA. Tcell costimulatory pathways: promising novel targets for immunosuppression and tolerance induction. J Am Soc Nephrol, 1995; 6:1143-50.

- (26) Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med*, 1998; 338: 1813-21.
- (27) Li XK, Tamura A, Fujino M, Guo L, Kakefuda T, Funeshina N, Enosawa S, Amari M, Naoe S, Amemiya H, Suzuki S. Induction of lymphocyte apoptosis in rat liver allograft with ongoing rejection by FTY 720. *Clin Exp Immunol*, 2001; 123 (b): 331-9.
- (28) Diaso RB, Lobuglio AF. Imunomoduladores: imunossupressores e imunoestimulantes. In: Goodman e Gilman, *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9 ed. Recife: Guanabara Koogan, 1997.
- (29) Chiu MJ, Katz H, Berlin V. RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91: 12574-8.
- (30) Sabatini DM, Barrow RK, Blackshaw S, Burnett PE, Lai MM, Field ME, Bahr BA, Kirsch J, Betz H, Snyder SH. Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling. *Science*, 1999; 284: 1161-4.
- (31) Abraham RT, Wiederrecht GJ. Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Ver Immunol*, 1996; 14: 483-510.
- (32) Kim HS, Raskova J, Degiannis D, Raska K Jr. Effects of cyclosporine and rapamycin on immunoglobulin production by preactivated human B cells. *Clin Exp Immunol*, 1994; 96: 508-12.

- (33) Cao W, Mohacsi P, Shorthouse R, Pratt R, Morris RE. Effect of rapamycin on growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis. Inhibition of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor action and antagonism of rapamycin by FK506. *Transplantation*, 1995; 59 (a): 390-5.
- (34) Stepkowski SM, Kahan BD. Rapamycin and cyclosporine synergistically prolong heart and kidney allograft survival. *Transplant Proc*, 2000; 23: 3262-4.
- (35). Khanna AK. Mechanisms of the combination immunosuppressive effects of rapamycin with either cyclosporine or tacrolimus. *Transplantation*, 2000; 70: 690-4.
- (36) .Zimmerman JJ, Kahan BD. Pharmacokinetics of sirolimus in stable renal transplant patients after multiple oral dose administration. *J Clin Pharmacol*, 1997; 37: 405-15.
- (37). Di Renzo M. Enhanced apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in cardiac transplanted patients undergoing chronic immunosuppressive treatment. *Transplant Immunology*, 2002; 10: 269-275.
- (38). Suthantiran M, Morris RE & Strom TB. Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action. *A J Kidney Dis*, 1996; 28: 159-172.
- (39). Strauss G, Osen W, Debatin KM. Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs. *Clin Exp Immunol*, 2002; 128: 255-66.

- (40). Lieberthal W. Mechanisms of apoptosis and its potential role its in tubular epithelial cell in injury. *Am J Physiol*, 1996; 271: 477-88.
- (41) Camargo SMR, Schor N. Mecanismos de morte celular: apoptose versus necrose. IN: Schor N, Boim MA, Pavão dos Santos OC, editores. *Medicina Celular e Molecular*.p 133-140.
- (42). Sánchez EL, Vargas FD. Apoptosis: The phenomenon and its determination. *Téc Pecu Mex*, 2003; 41: 49-62.
- (43). Lewin B. Ciclo Celular e Regulação do crescimento. In: Lewin B, editor. *Genes VII*, 2001.p829-836.
- (44). Bauer KD, Duque RE, Shankey TV. In: *Clinical Flow Cytometry Principles and Application*. Part 1- Section B. Technical Aspects. P 71-1777. Library of Congress, 1993.

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS

Avaliar a indução de apoptose em linfócitos periféricos humanos expostos à rapamicina.

2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a indução de apoptose em culturas de linfócitos periféricos humanos não estimulados e estimulados com fito-hemaglutinina.

Avaliar a indução de apoptose em culturas de linfócitos periféricos humanos não estimulados e estimulados com fito-hemaglutinina e expostos à rapamicina.

3. ARTIGO EM PORTUGUÊS

AVALIAÇÃO DA APOPTOSE EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS PERIFÉRICOS EXPOSTOS A RAPAMICINA

Taísa Aozani Prochnow

Virna Nowotny Carpio

Esther Cristina Aquino Dias

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.

Autor para correspondência

Prof. 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

Telefone: 51 33168295

Fax: 51 33168121

E-mail: lfgoncalves@hcpa.ufrgs.br

AValiação DA APOPTOSE EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS PERIFÉRICOS EXPOSTOS A RAPAMICINA

Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Resumo

A influência dos imunossupressores na regulação da apoptose de linfócitos ativados e seu papel no controle da resposta imune aos aloenxertos humanos ainda não está bem elucidado. O objetivo deste estudo foi avaliar a indução de apoptose pela rapamicina em linfócitos humanos periféricos.

Métodos: Polimorfos mononucleares foram separados do sangue periférico de voluntários sadios através de centrifugação em gradiente de densidade. A fração mononuclear foi suspensa em meio de cultura, e após, transferida para placas de cultura, as quais acrescentou-se fito-hemaglutinina (PHA) e/ou rapamicina conforme o ensaio. Foram testados 04 ensaios experimentais: cultura de linfócitos puros, linfócitos com PHA, linfócitos com rapamicina, e linfócitos com PHA e rapamicina. As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera estéril, com 5% de CO₂ por 24 e 48 horas. A apoptose foi determinada através da marcação com Anexina V por citometria de fluxo.

Resultados: não houve diferença estatisticamente significativa na detecção de apoptose em linfócitos com e sem rapamicina, tanto na análise após 24 h (7,1% + 3,8 x 6,6% + 2,6, p=1,0) como após 48h (6,1% + 1,9 x 6,2 + 1,8, p=1,0). Já, linfócitos com PHA, na presença ou ausência da droga, aumentou estatisticamente a apoptose, tanto nas análises de 24h como nas de 48h (P = 0,0000 e P = 0,0006, ANOVA). Nas culturas estimuladas com PHA a adição de rapamicina também não ocasionou aumento estatisticamente significativo nos percentuais de apoptose tanto em 24 h (P=0,69) como após 48 h (P>0,73).

Conclusão: Os achados deste estudo mostram que a rapamicina não induz apoptose em cultura de linfócitos T estimuladas ou não.

Palavras chaves: rapamicina, apoptose, linfócitos e imunossupressão

INTRODUÇÃO

O transplante renal é, atualmente, a melhor opção de tratamento para a insuficiência renal crônica terminal (1). Os avanços na compreensão da imunologia dos transplantes e o desenvolvimento de drogas imunossupressoras mais efetivas e eficazes diminuíram a incidência de rejeição aguda para menos de 20%, com melhoras nas sobrevidas de enxertos e pacientes (2).

A rapamicina, imunossupressor mais recentemente aprovado para uso clínico, é um antibiótico macrolídeo isolado do fungo *Streptomyces hygroscopicus*. A sua ação imunossupressora depende de sua ligação na imunofilina FKBP12, formando o complexo ativo Rapa/FKBP, que inibe a atividade enzimática da mTOR (mammalian target of rapamicin), enzima responsável pelo controle da atividade enzimática de diversas proteínas envolvidas na transdução de sinais de ativação e proliferação derivados de receptores da membrana de linfócitos (3, 4). As rapamicinas (sirolimus e everolimus) inibem o ciclo celular na transição da fase G1 para S em diversas linhagens celulares, incluindo células musculares lisas (alvo secundário de seu possível efeito na nefropatia crônica do enxerto) e os linfócitos (alvo primário de seu efeito imunossupressor) (5, 6). Sua eficácia na prevenção da rejeição aguda tem sido demonstrada em alguns estudos clínicos de fase III (7, 8), mas apresenta um potencial emprego em esquemas com retirada precoce de inibidores da calcineurina e possíveis efeitos na prevenção da nefropatia crônica do enxerto (9).

A apoptose é um processo natural de morte celular, no qual as células se inativam e degradam sua própria estrutura e componentes de maneira coordenada e característica (10, 11). No contexto do transplante de órgãos, a indução de apoptose tem sido documentada como um mecanismo que leva a deleção de linfócitos aloreativos durante a resposta imune ao aloenxerto

(12). A influência dos imunossupressores na regulação da apoptose de linfócitos ativados e seu papel no controle da resposta imune aos aloenxertos humanos ainda não está bem elucidado. Um estudo realizado *in vitro*, analisou vários imunossupressores quanto à indução de apoptose em células T humanas (13). Os achados deste estudo sugerem que a rapamicina não induz apoptose em células T ativadas, mas inibe a proliferação e a expansão destas após contato com o antígeno, indicando que as células T são silenciadas e não deletadas (13).

Por outro lado, estudos experimentais *in vivo* têm demonstrado a indução de apoptose pela rapamicina (14).

O presente estudo tem como objetivo avaliar a indução de apoptose por rapamicina em linfócitos humanos periféricos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Imunossupressor e reagentes

Nas culturas celulares foram utilizados os seguintes reagentes: RPMI-1640 com Hepar (Sigma, St Louis, EUA), soro bovino fetal (Sigma, St Louis, EUA), penicilina-estreptomicina (Gibco, Paisley, UK) e fito-hemaglutinina (PHA) (Sigma, St Louis, EUA). O imunossupressor testado foi a rapamicina, na concentração de 10ng/mL.

Preparações celulares e cultura

Polimorfos mononucleares foram separados do sangue periférico de voluntários saudáveis através de centrifugação em gradiente de densidade (Lymphoprep, Oslo, Norway). A fração mononuclear foi lavada e suspensa em RPMI-1640 com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina). As preparações celulares foram transferidas para

placas de cultura de 24 poços, com número de células ajustado para $1,5 \times 10^6$ células/mL, as quais acrescentou-se PHA e/ou rapamicina conforme o ensaio. Foram testados 04 ensaios experimentais: a) cultura de linfócitos não estimulados; b) cultura de linfócitos estimuladas pela PHA; c) cultura de linfócitos não estimulados e expostos à 10ng/mL de rapamicina; d) cultura de linfócitos estimuladas pela PHA e expostas à 10ng/mL de rapamicina. As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera estéril, com 5% de CO₂ por 24 e 48 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Detecção de Apoptose

A apoptose foi determinada nos períodos de 24 e 48 h através da marcação com Anexina V por citometria de fluxo, utilizando-se o kit Annexin V-EGFP Apoptosis Detection (Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland), no aparelho FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany), utilizando-se o software CellQuest para a análise dos dados. A anexina V liga-se a fosfatidilserina exposta na superfície celular nas fases iniciais do processo apoptótico. As células coradas pela anexina V, mas não pelo iodeto de propídeo, foram interpretadas como entrando em apoptose.

Análise estatística

Os valores percentuais de linfócitos apoptóticos em cada um dos quatro ensaios experimentais foram avaliados estatisticamente pela Análise de Variância Simples, seguida pelo Teste de Scheff. O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

A figura 1 ilustra os resultados obtidos dos quatro ensaios experimentais (cultura de linfócitos não estimulados, linfócitos estimulados pela PHA, linfócitos expostos à rapamicina, e linfócitos estimulados e expostos à rapamicina), nos períodos de 24 e 48 h.

Verifica-se que não houve diferença estatisticamente significativa na detecção de apoptose nas culturas de linfócitos com e sem rapamicina, tanto na análise de 24 h (7,1% + 3,8 x 6,6% + 2,6, $p=1,0$) como após 48 h (6,1% + 1,9 x 6,2 + 1,8, $p=1,0$).

No entanto, quando estimulou-se as culturas de linfócitos com PHA, na presença ou ausência da droga, houve aumento estatisticamente significativo da apoptose, em comparação com os demais grupos, tanto nas análises de 24 como nas de 48 h ($P = 0,0000$ e $P = 0,0006$, ANOVA).

Quando avaliou-se a adição de rapamicina às culturas estimuladas por PHA verificou-se que a mesma induziu um discreto aumento no percentual de linfócitos em apoptose, embora sem atingir diferença estatisticamente significativa, tanto na análise dos ensaios em 24 h (46,55% + 11,0 x 39,0% + 12,6, $P = 0,69$) como após 48 h (30,2% + 8,7 x 24,3% + 11,0, $P = 0,73$).

A figura 2 ilustra os efeitos apoptóticos em linfócitos periféricos humanos após estimulação pela PHA e/ou exposição a rapamicina na citometria de fluxo.

DISCUSSÃO

A introdução de drogas imunossupressoras mais efetivas e eficazes representou um marco fundamental para o avanço do transplante de órgãos nas últimas décadas. Estudos recentes

vêm demonstrando que alguns imunossuppressores utilizados no transplante renal podem induzir apoptose nos linfócitos, diminuindo a produção da IL-2, um potente fator de crescimento dos linfócitos T que estimula a divisão celular e expansão clonal das células auxiliares e citotóxicas antígeno-estimuladas (15, 16). No entanto, o papel dos imunossuppressores na regulação da apoptose de linfócitos ativados ainda não está bem elucidado.

No presente estudo, avaliamos a indução de apoptose *in vitro* do imunossupressor rapamicina em cultura de linfócitos humanos periféricos, nos períodos de 24 h e 48 h. Testamos quatro ensaios experimentais: a) linfócitos não estimulados, b) linfócitos estimulados pela fito-hemaglutinina (PHA), c) linfócitos expostos à rapamicina, e d) linfócitos estimulados e expostos à rapamicina.

A análise dos resultados dos nossos ensaios mostrou que quando estimulamos as culturas com PHA, na presença ou ausência da droga, houve aumento estatisticamente significativo da apoptose, em comparação com os grupos não estimulados, tanto nas análises de 24 h como após 48 h. Da mesma forma, Wu et al (17) estudando apoptose em cultura de linfócitos T periféricos humanos encontrou aumento da apoptose nas culturas estimuladas com PHA na análise de 18 h. A PHA é um agente mitogênico para linfócitos humanos que age fundamentalmente sobre os linfócitos T (18).

Em nosso estudo, quando acrescentamos a rapamicina (10ng/mL) nas culturas de linfócitos estimuladas e na ausência de estimulação, não encontramos diferença estatisticamente significativa na detecção de apoptose tanto na análise de 24 h como após 48 h. Outros estudos, como o de Staruch et al (19) mostram que a rapamicina não induz apoptose em cultura de células T de hibridomas (DO.11.10 cel) na análise de 16 h. Igualmente, Ishizuka et al (20) não encontraram indução de apoptose, em culturas de células T imaturas de camundongos, quando estas foram expostas à concentrações de 10pg/mL-100ng/mL de rapamicina, em análise de 48 h.

Strauss et al (13) estudaram a indução de apoptose em culturas de células T periféricas humanas expostas a vários imunossupressores. Seus achados sugerem que a rapamicina, mesmo em altas concentrações, não induz apoptose daquelas células. No entanto, o estudo de Koenen et al (21) realizado em cultura mista de linfócitos mostrou que a rapamicina aumenta a apoptose de células T CD4+, quando comparada com a ciclosporina ou FK506. Da mesma forma, um estudo realizado por Muthukkumar (22) em cultura de células B de linfoma mostrou que a rapamicina induz a morte destas células através da indução de apoptose. Tais diferenças entre os estudos poderiam ser explicadas pelos diferentes tipos celulares analisados e diferentes métodos de detecção de apoptose empregados.

Existem diversos métodos para qualificar ou quantificar apoptose, a maioria deles detectam alterações nucleares que ocorrem nas células durante o processo, como diminuição de tamanho, condensação da cromatina e fragmentação do DNA (23). Nosso estudo utilizou como método de quantificação de apoptose a detecção por citometria de fluxo de anexina V, uma proteína que se liga a fosfatidilserina externalizada na membrana celular nas fases iniciais da apoptose. Portanto, a anexina V é um marcador precoce, ideal para os ensaios analisados em 24 h e após 48 h. Outros métodos de avaliação de apoptose, como a fragmentação do DNA, são marcadores tardios de apoptose.

A apoptose nas células tubulares renais tem sido estudada como um possível indicador da viabilidade do enxerto e da extensão da lesão de isquemia-reperfusão que ocorre após o transplante renal. Esta hipótese é confirmada pelo estudo de Torony et al (24) que mostrou redução no grau de apoptose das células tubulares em rins de transplantados com função inicial do enxerto. Lieberthal et al (25) atribui ao uso de rapamicina a piora da recuperação da insuficiência renal aguda induzida em camundongos por oclusão da artéria renal. Segundo este

autor esta droga aumentaria a morte de células tubulares (via apoptose) e inibiria a resposta regenerativa destas células.

Embora tais achados foram estudados em modelo experimental *in vivo* e relacionem-se a indução de apoptose em células tubulares, eles são discrepantes em relação aos nossos achados *in vitro* e da maioria dos estudos semelhantes (19, 20, 21), que não mostram indução de apoptose pela rapamicina.

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 (26) e também mais tardiamente, por este mesmo mecanismo, influenciando o desenvolvimento de tolerância imunológica. O estudo experimental de Li Y et al (27), estudando transplante de pele em ratos, mostra que a rapamicina induz tolerância através da apoptose de células T aloreativas. Outros estudos sugerem que a rapamicina atua no desenvolvimento de tolerância periférica através da indução de anergia por inibição da transdução dos sinais mediados pela IL-2 (28). Nossos achados, *in vitro*, de ausência de indução de apoptose suportam a hipótese de indução de anergia como provável mecanismo de indução de tolerância pela rapamicina.

Em conclusão, os achados deste estudo mostram que a rapamicina não induz apoptose em cultura de linfócitos T estimuladas ou não. Portanto, é mais provável que seu mecanismo de ação não seja a deleção de linfócitos ativados, mas a inibição da proliferação destas células o que contribuiria para a prevenção da rejeição aguda e talvez para a indução de anergia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cecka JM (1999). The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. *Clin Transplant*, 165: 1-12.
2. Hariharan S, Jonhson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, Mcintosh MJ, Stablei D (2000). Improved graft survival after renal transplantetion in The United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med*, 342: 605-12.
3. Sabatini DM, Barrow RK, Blackshaw S, Burnett PE, Lai MM, Field ME, Bahr BA, Kirsch J, Betz H, Snyder SH (1999). Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling. *Science*, 284: 1161-4.
4. Abraham T & Wiederrecht GJ (1996). Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Ver Immunol*, 14: 483-510.
5. Kim HS, Raskova J, Degiannis D, Raska K Jr (1994). Effects of cyclosporine and rapamycin on immunoglobulin production by preactivated human B cell. *Clin Exp Immunol*, 96: 508-12.
6. Cao W, Mohacsi P, Shorthouse R, Pratt R, Morris RE (1995). Effect of rapamicyn on growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis. Inhibition of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor action and antagonism of rapamycin by FK506. *Transplantation*, 59 (a): 390-5.
7. Kahan BD (2000). Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group. *Lancet*, 356: 194-202.

8. MacDonald AS (2001). A worldwide, phase III, randomized, controlled, safety and efficacy study of a sirolimus/cyclosporine regimen for prevention of acute rejection in recipients of primary mismatched renal allografts. *Transplantation*, 71: 271-280.
9. Johnson RW, Kreis H, Oberbauer R, Brattstrom C, Claesson K & Eris J (2001). Sirolimus allows early cyclosporine withdrawal in renal transplantation resulting in improved renal function and lower blood pressure. *Transplantation*, 72: 777-786.
10. Sánchez EL & Vargas FD (2003). Apoptosis: the phenomenon and its determination. *Téc Pecu Mex*, 41: 49-62.
11. Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407: 770-776.
12. August C, Schmid KW, Dietl KH, Heidenreich S (1999). Prognostic value of lymphocyte apoptosis in acute rejection of renal allograft. *Transplantation*, 67: 581-585.
13. Stauss G, Osen W & Debatin KM (2002). Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs. *Clin Exp Immunol*, 128: 255-266.
14. Lutz J, Zou H, Liu S, Antus B & Heemann (2003). Apoptosis and treatment of chronic allograft nephropathy with everolimus. *Transplantation*, 76: 508-515.
15. Suthantiran M, Morris RE & Strom TB (1996). Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action. *A J Kidney Dis*, 28: 159-172.
16. Di Renzo M (2002). Enhanced apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in cardiac transplanted patients undergoing chronic immunosuppressive treatment. *Transplant Immunology*, 10: 269-275.
17. Wu MX, Ao Z, Daley JF & Schollossman SF (1997). Induction and detection of apoptosis in human peripheral blood T cell. *Journal of Immunological Methods*, 206: 153-162.

18. Olej B, Lugon JR, P da Silva FE, Meletti-Oliveira MC & Rumjanek VM (2002). Atividade imunossupressora de preparações de ciclosporina A em células mononucleares. *J Bras Nefrol*, 24 (Supl 1): 5-10.
19. Staruch MJ, Sigal NH & Dumont FJ (1991). Differential effects of the immunosuppressive macrolides FK-506 and rapamycin on activation-induced T-cell apoptosis. *Int J Immunopharmac*, 13: 677-685.
20. Ishizuka T, Sakata N, Johnson GL, Gelfand EW & Terada N (1997). Rapamycin potentiates dexamethasone-induced apoptosis and inhibits JNK activity in lymphoblastoid cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 230: 386-391.
21. Koenen HJ, Michielsen EC, Verstappen J, Fasse E & Joosten I (2003). Superior T-cell suppression by rapamycin and FK506 over rapamycin and cyclosporine a because of abrogated cytotoxic T-lymphocyte induction, impaired memory responses, and persistent apoptosis. *Transplantation*, 75: 1581-1590.
22. Muthukkumar S, Ramesh TM & Bondada S (1995). Rapamycin, a potent immunosuppressive drug, causes programmed cell death in B lymphoma cells. *Transplantation*, 60: 264-270.
23. Bauer KD, Duque RE, Shankey TV. In: *Clinical Flow Cytometry Principles and Application*. Part 1- Section B. Technical Aspects. Library of Congress, 1993.p 71-1777.
24. Torony (2001). Renal tubular cell necrosis and apoptosis in transplanted kidneys. *Cell Biology Int*, 25: 267-270.
25. Lieberthal W (1996). Mechanisms of apoptosis and its potential role tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol*, 271: 477-488.

26. Wells AD, Li XC, Li Y, Walsh MC, Zheng XX, Wu Z, Nuñez G, Tang A, Sayegh M, Hancock WW, Strom TB & Turka LA (1999). Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nature Medicine*, 5: 1303-1307.
27. Li Y, Li XC, Zheng XX, Wells AD, Turka LA & Strom TB (1999). Blocking both signal 1 and 2 of T-cell activation prevents apoptosis of active T cell and induction of peripheral allograft tolerance. *Nature Medicine*, 5: 1298-1302.
28. Prud'homme GJ, Vanier LE, Bocarro DC & Ste-Croix H (1995). Effects of cyclosporine A, rapamycin, and FK520 on peripheral T-cell deletion and anergy. *Cellular Immunology*, 164: 47-56.

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1: Percentual de apoptose em linfócitos humanos periféricos não estimulados, estimulados por PHA, expostos à rapamicina, e estimulados e expostos à rapamicina.

Figura 2: Efeitos apoptóticos em linfócitos humanos periféricos após estimulação pela PHA e/ou exposição a rapamicina na citometria de fluxo.

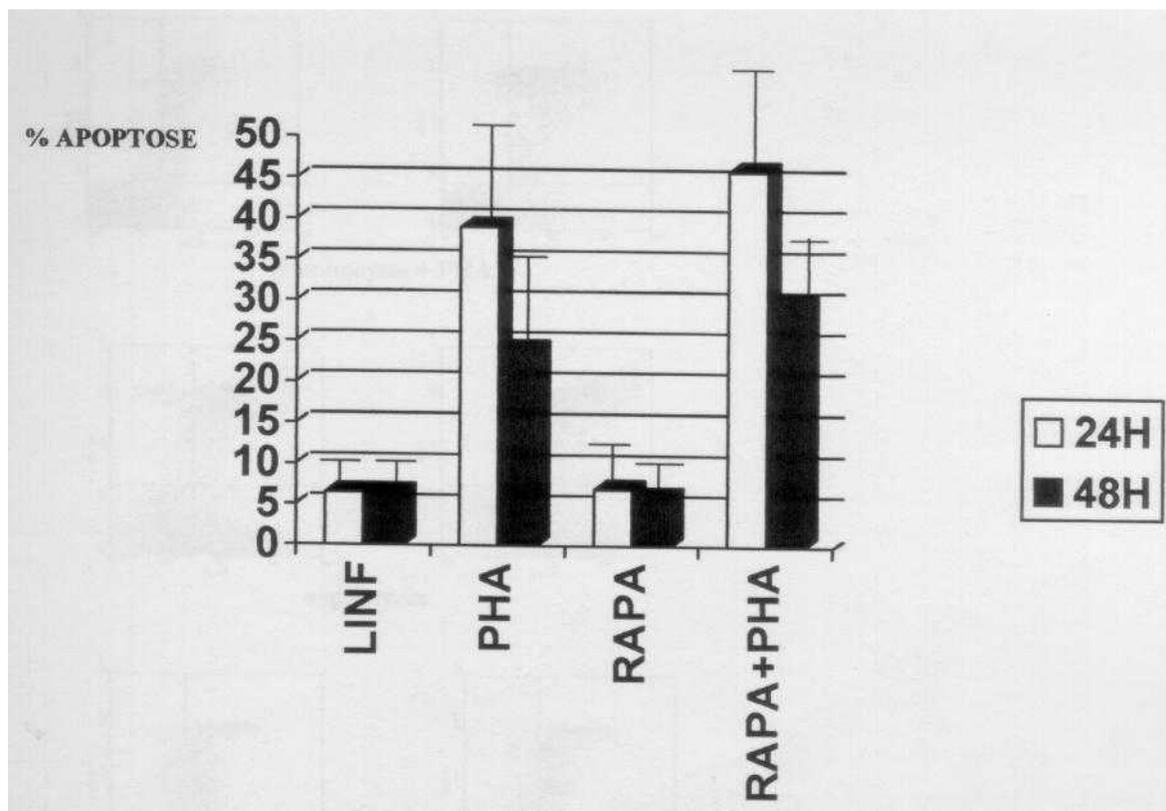


Figura 1 – Percentual de apoptose em linfócitos não estimulados (LINF), linfócitos estimulados pela PHA (PHA), linfócitos não estimulados e expostos a rapamicina (RAPA), e linfócitos estimulados pela PHA e expostos à rapamicina (RAPA+PHA).

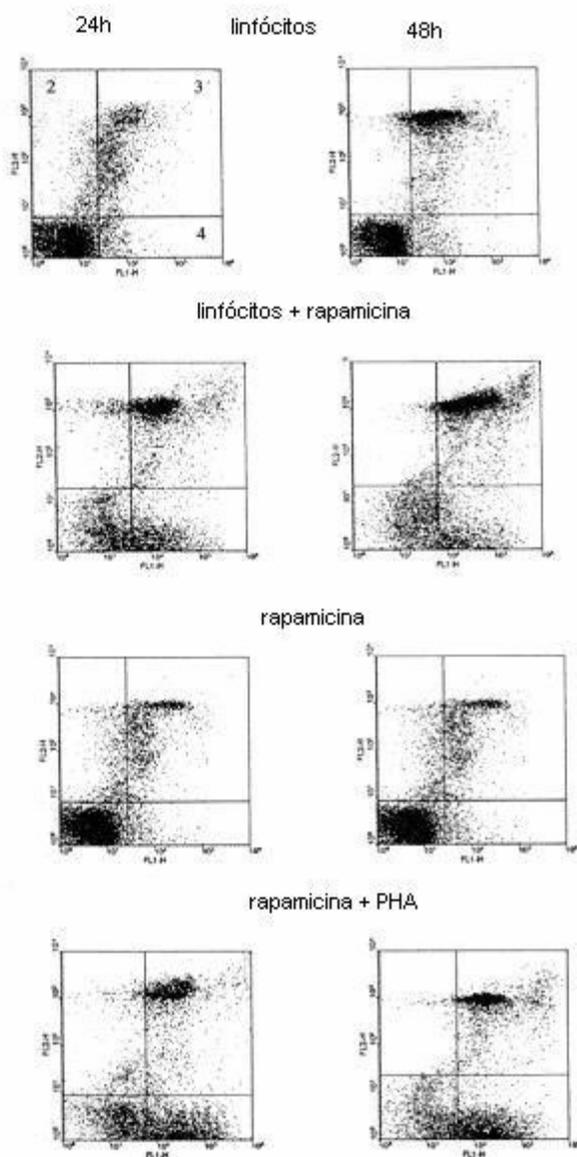


Figura 2 – Efeitos apoptóticos em linfócitos periféricos humanos após estimulação pela PHA e/ou exposição a rapamicina. Os quadrantes representam: 1) células vivas, 2) debris, 3) células em necrose e 4) células em apoptose.

4. ARTIGO EM INGLÊS

EVALUATION OF APOPTOSIS IN A CULTURE OF PERIPHERAL HUMAN LYMPHOCYTES EXPOSED TO RAPAMYCIN

AUTHORS: Taísa Aozani Prochnow¹, Virna Nowotny Carpio¹, Esther Cristina Aquino Dias¹, Roberto Ceratti Manfro^{1,2}, Luiz Felipe Santos Gonçalves^{1,2,3}.

INSTITUTIONS: Post Graduation Medical Sciences: Nephrology Program. School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Nephrology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

KEYWORDS: rapamycin, apoptosis, lymphocytes, immunosuppression

FOOTNOTE

¹ Post Graduation Medical Sciences: Nephrology Program. School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

² Nephrology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

³ Address for correspondence to: Luiz Felipe Santos Gonçalves, M.D. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Nephrology Division, Rua Ramiro Barcelos, 2350, sala 2030, Porto Alegre, RS, Brazil. CEP 90035-003; Tel: 51 – 21018295; Fax: 51 21018121; E-mail: lfgoncalves@hcpa.ufrgs.br

EVALUATION OF APOPTOSIS IN A CULTURE OF PERIPHERAL HUMAN LYMPHOCYTES EXPOSED TO RAPAMYCIN

Brazilian Journal of Medical and Biological Research

ABSTRACT

The influence of immunosuppressive drugs in the regulation of apoptosis of activated lymphocytes and their role in the control of immune response to human allografts is still not well determined. The aim of this study is to evaluate the induction of apoptosis by rapamycin in peripheral blood human lymphocytes.

Methods: Mononuclear cells were isolated by gradient density centrifugation of peripheral blood obtained from five healthy volunteers. Non stimulated and phytohemagglutinin (PHA) stimulated cells were suspended in RPMI 1640 and were cultured for 24 and 48 hours on 24-well plates with and without rapamycin (Wyeth, Brazil). Apoptosis was determined by Annexin V-EGFP staining (Alexis Biochemicals, Switzerland) to externalized phosphatidylserine and analysed by flow cytometry. Five experiments were performed in triplicates for each experimental condition (with and without PHA and with and without rapamycin). Results are shown as average \pm standard deviation and Student's t test was used for statistical analyses.

Results: In non-stimulated cultures there was no statistically significant difference in the percentage of apoptotic cultured lymphocytes with and without rapamycin both after 24 hours ($7.1\% \pm 3.8\%$ x $6.6\% \pm 2.6\%$; $P=1.0$) and after 48 hours ($6.1\% \pm 1.9\%$ x $6.2\% \pm 1.8\%$; $P=1.0$). In PHA stimulated cell cultures in the absence of rapamycin there was a statistically significant increase in the percentage apoptotic cells at 24 hours ($39.0\% \pm 12.6\%$ x $6.6\% \pm 2.6\%$; $P=0.002$) and

48 hours ($24.3\% \pm 11.0\%$ x $6.2\% \pm 1.8\%$; $P=0.033$) respectively, as compared with non-stimulated cultures. The addition of rapamycin to PHA stimulated cultures did not modify the percentage of apoptotic cells at 24 hours ($46.5\% \pm 11.0\%$ x $39.0\% \pm 12.6\%$; $P=0.69$ and at 48 hours ($30.2\% \pm 8.7\%$ x $24.3\% \pm 11.0\%$; $P=0.73$).

Conclusion: These data demonstrate that there is increased apoptosis upon stimulation of peripheral blood lymphocytes *in vitro* and that rapamycin does not induce apoptotic cell death in such conditions.

INTRODUCTION

Nowadays renal transplantation is the best option for the treatment of end-stage renal diseases (ESRD) (1). Advances in the understanding of transplantation immunology and the development of more effective immunosuppressive drugs has reduced acute rejection to less than 20% with consequent improvement in the survival of grafts and patients (2).

Recently approved for clinical use, the immunosuppressive drug rapamycin is a macrolide antibiotic isolated from the *Streptomyces hygroscopicus* fungus. Its immunosuppressive action is related to its connection with the FKBP12 immunophilin forming the active complex Rapa/FKBP. This complex inhibits the enzymatic activity of mTOR (*mammalian target of rapamycin*) which is the enzyme responsible for the control of enzymatic activity in various proteins involved in the translation of activation and proliferation signals derived from lymphocytic membrane receptors (3, 4).

The rapamycin family of drugs (*sirolimus and everolimus*) inhibit the cell cycle in the G1 to S phase in various cellular lines, including smooth muscular cells (secondary target for its possible effect in chronic allograft nephropathy) and the lymphocytes (primary target for its immunosuppressive action) (5, 6). Its efficacy in preventing acute transplant rejection has been demonstrated in some clinical studies of Phase III (7, 8) but it may have a potential use in immunosuppressive schemas involving the early removal of calcineurin inhibitors and possible effects in the prevention of chronic allograft nephropathy (9).

Apoptosis is a natural process of cellular death, in which the cells deactivate themselves and degrade their structure and components in a characteristic and ordered manner (10, 11). In the transplantation context, the induction of apoptosis has been described as a mechanism that leads to deletion of alloreactive lymphocytes during the immune response (12).

The influence of immunosuppressive drugs in regulation of apoptosis of activated lymphocytes and their role in the control of the immune response to human allografts is still not well determined (13). An *in vitro* study analyzed various immunosuppressive drugs as regards the apoptosis of human T-cells and demonstrated that rapamycin does not induce apoptosis in the activated T-cells, but inhibits their proliferation and expansion after contact with the antigen, suggesting that rapamycin silences T-cells but does not delete them (13).

On the other hand, experimental *in vivo* studies have demonstrated the induction of apoptosis by rapamycin (14). Therefore, the aim of this study is to evaluate the induction of apoptosis by rapamycin in peripheral human lymphocytes.

MATERIALS AND METHODS

Immunosuppressive drug and reagents

In the cell cultures the following reagents were used: RPMI-1640 with HEPES (Sigma, St Louis, USA), fetal bovine serum (Sigma, St Louis, USA), penicillin-streptomycin (Gibco, Paisley, UK) and phytohemagglutinin (PHA) (Sigma, St Louis, USA). The immunosuppressive was rapamycin in a concentration of 10ng/mL.

Cell preparations and culture

Mononuclear polymorphs were obtained from peripheral blood of healthy donors. Isolation was performed by density gradient of blood (Lymphoprep, Oslo, Norway). The mononuclear fraction was washed and suspended in RPMI-1640 with 10% of bovine fetal serum and 1% of penicillin-streptomycin. Lymphocytes (1.5×10^6 cells/mL) were cultured in triplicate for 24h and 48h on 24-well plates coated with PHA and/or rapamycin as specified for the test and incubated at 35°C with 5% CO₂. Four (04) experimental tests were performed: (a) a culture of non stimulated

lymphocytes; (b) a culture of lymphocytes stimulated by PHA; (c) a culture of lymphocytes not stimulated and exposed to 10ng/mL of rapamycin; (d) a culture of lymphocytes stimulated by PHA and exposed to 10ng/mL of rapamycin.

Detection of Apoptosis

Apoptosis was determined by Annexin V-EGFP staining to externalized phosphatidylserine (Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland) on a FACScan cytometer. Data analysis were made with CellQuest software (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Cells that stained for annexin-V, but not propidium iodide, were interpreted as undergoing early apoptosis. Data always represent the mean of triplicates.

Statistical Analysis

The values of lymphocytes were expressed as a percentage in each one of the four experimental tests and were evaluated statistically by Analysis of Variance (ANOVA) followed by the Scheffe test. The significance level was established as $p < 0.05$.

RESULTS

Figure 1 illustrates the results obtained from the four experimental tests (culture of lymphocytes not stimulated, lymphocytes stimulated by PHA, lymphocytes exposed to rapamycin, lymphocytes stimulated and exposed to rapamycin) in 24 and 48 hours. It can be seen that there was no statistically significant difference in detection of apoptosis in the lymphocyte cultures with and without rapamycin both in 24 h ($7.1\% \pm 3.8$ x $6.6\% \pm 2.6$, $p=1,0$) and after 48 h ($6.1\% \pm 1.9$ x 6.2 ± 1.8 , $p=1,0$). However, when lymphocyte cultures were stimulated with PHA, in the presence or absence of the drug, a statistically significant increase of apoptosis took place in

comparison with the other groups, both in 24 h analysis and at 48 h ($P = 0.0000$ e $P = 0.0006$, ANOVA). When the addition of rapamycin to the cultures stimulated by PHA was evaluated, it was found that, although rapamycin induced a certain increase in the percentage of lymphocyte apoptosis, this increase did not attain a statistically significant value either in 24 h ($46.55\% \pm 11.0$ x $39.0\% \pm 12.6$, $P = 0.69$) or after 48 h ($30.2\% \pm 8.7$ x $24.3\% \pm 11.0$, $P = 0.73$).

Figure 2 illustrates the apoptotic effect in peripheral human lymphocytes after stimulation with PHA and/or exposure to rapamycin.

DISCUSSION

The introduction of more effective and efficient immunosuppressive drugs was a benchmark in the progress of organ transplantation in the last decades. Recent studies demonstrate that some immunosuppressive drugs used in renal transplants can induce apoptosis in lymphocytes, by reducing the IL-2 production which is a potent factor in the growth of the T-cells and which, in turn, stimulates cell division and clonal expansion of antigen-stimulated cytotoxic cells (15, 16). However, the role of immunosuppressive drugs in the regulation of apoptosis of lymphocytes has not yet been clear.

In the present study we evaluated the induction of apoptosis *in vitro* with rapamycin in a culture of peripheral human lymphocytes in periods of 24 h and 48 h. We made four experimental tests: (a) non stimulated lymphocytes; (b) lymphocytes stimulated with PHA; (c) lymphocytes non stimulated and exposed to rapamycin, (d) lymphocytes stimulated and exposed to rapamycin.

Analysis of our results demonstrated that when we stimulated the culture with PHA in the presence or absence of the drug a statistically significant increase of apoptosis took place in comparison with the non stimulated groups, both in 24 h analysis and at 48 h. In the same way, Wu et al (17) studying apoptosis in a culture of human peripheral T-lymphocytes, found an increase of apoptosis in the cultures stimulated with PHA in 18 h analysis. PHA is a mitogenic agent for human lymphocytes that acts basically on the T-lymphocytes (18).

In our study, when we added rapamycin (10ng/mL) in lymphocytes cultures, either stimulated or non stimulated, no statistically significant difference was found in the detection of apoptosis in either 24 h or 48 h analysis. Other studies such as that of Staruch et al (19) demonstrated that rapamycin does not induce apoptosis in cultures of T-cells (DO.11.10 cell) in 16 h analysis.

Similarly, Ishizuka et al (20) did not detect the induction of apoptosis in cultures of immature T-cells from mice, when these were exposed to concentrations of 10pg/mL-100ng/mL of rapamycin in 48 h analysis. Strauss et al (13) studied the induction of apoptosis in cultures of human peripheral T-cells exposed to various immunosuppressive drugs. Their findings suggest that rapamycin, even in high concentrations, does not induce apoptosis in those cells. However, another study by Koenen et al (21) carried out on a mixed lymphocyte culture showed that rapamycin increases the apoptosis of the CD4 + T cells when compared to cyclosporine or FK506. In the same way, a study realized by Muthukkumar (22) in a culture of lymphoma B cells demonstrated that rapamycin induces death of these cells by apoptosis. These differences between the studies may be explained by the different types of cells analyzed and the different methods of apoptosis detection employed.

There are many methods of quantifying and qualifying apoptosis, the majority of which operate by detecting nuclear alterations which occur in the cell during the process, such as reduction of size, condensation of chromatin and fragmentation of the DNA (23). Quantification of apoptosis

in our study was achieved by flow cytometry of Annexin V, a protein that attaches to phosphatidylserine externalized in the cell membrane in the initial phases of apoptosis. Therefore the Annexin V is an early indicator of apoptosis and as such, is ideal for tests analyzed in 24 hours and after 48 hours. Other methods of evaluation of apoptosis, such as DNA fragmentation, identify the presence of apoptosis much later in the process.

The apoptosis of renal tubular cells has been studied as a possible indicator of the viability of the graft and in the evaluation of ischemia-reperfusion lesion which occurs after a renal transplant. This hypothesis was confirmed by Torony et al (24) that demonstrated a reduction in the degree of apoptosis of tubular cells in the kidneys allografts patients without delayed graft function. Lieberthal et al (25) considered the use of rapamycin responsible for worse recovery from acute renal failure induced in mice by occlusion of the renal artery. According to this author, this drug increases the death of tubular cells (by apoptosis) and inhibits the regenerative response of these cells. Although these findings were studied in an experimental *in vivo* model and were concerned with the induction of apoptosis in tubular cells, they differ from the findings in our study and to those of the majority of similar studies (19, 20, 21) which do not show the induction of apoptosis by rapamycin.

The induction of apoptosis in lymphocytes in the context of organ transplants may be related to the control of acute rejection process by means of deleting alloreactive lymphocytes (26) and also somewhat later, by this same mechanism, influencing the development of immunological tolerance. An experimental study by Li Y et al (27) on skin transplants in rats, showed that rapamycin induces tolerance by apoptosis of alloreactive T cells. Other studies suggest that rapamycin acts on the development of peripheral tolerance by induction of anergy inhibiting the transduction signals controlled by IL-2 (28). In our findings *in vitro* the absence of apoptosis

induction supports the hypothesis that induction of anergy is the probable mechanism for rapamycin induction of tolerance.

In conclusion, the findings of this study demonstrate that rapamycin does not induce apoptosis in a culture of T-lymphocytes whether stimulated or not. Therefore, it is most likely that its action mechanism is not deletion of activated lymphocytes, but the inhibition of the proliferation of these cells which could contribute to the prevention of acute rejection and, perhaps, the induction of anergy.

REFERENCES

1. Cecka JM (1999). The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. *Clinical Transplantation*, 165: 1-12.
2. Hariharan S, Jonhson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, Mcintosh MJ, Stablei D (2000). Improved graft survival after renal transplantation in The United States, 1988 to 1996. *New England Journal of Medicine*, 342: 605-12.
3. Sabatini DM, Barrow RK, Blackshaw S, Burnett PE, Lai MM, Field ME, Bahr BA, Kirsch J, Betz H, Snyder SH (1999). Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling. *Science*, 284: 1161-4.
4. Abraham T & Wiederrecht GJ (1996). Immunopharmacology of rapamycin. *Annual Review of Immunology*, 14: 483-510.
5. Kim HS, Raskova J, Degiannis D, Raska K Jr (1994). Effects of cyclosporine and rapamycin on immunoglobulin production by preactivated human B cell. *Clinical Experimental Immunology*, 96: 508-12.
6. Cao W, Mohacsi P, Shorthouse R, Pratt R, Morris RE (1995). Effect of rapamicyn on growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis. Inhibition of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor action and antagonism of rapamycin by FK506. *Transplantation*, 59 (a): 390-5.
7. Kahan BD (2000). Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group. *Lancet*, 356: 194-202.

8. MacDonald AS (2001). A worldwide, phase III, randomized, controlled, safety and efficacy study of a sirolimus/cyclosporine regimen for prevention of acute rejection in recipients of primary mismatched renal allografts. *Transplantation*, 71: 271-280.
9. Johnson RW, Kreis H, Oberbauer R, Brattstrom C, Claesson K & Eris J (2001). Sirolimus allows early cyclosporine withdrawal in renal transplantation resulting in improved renal function and lower blood pressure. *Transplantation*, 72: 777-786.
10. Sánchez EL & Vargas FD (2003). Apoptosis: the phenomenon and its determination. *Téc Pecu Mex*, 41: 49-62.
11. Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407: 770-776.
12. August C, Schmid KW, Dietl KH, Heidenreich S (1999). Prognostic value of lymphocyte apoptosis in acute rejection of renal allografts. *Transplantation*, 67: 581-585.
13. Strauss G, Osen W & Debatin KM (2002). Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs. *Clinical Experimental Immunology*, 128: 255-266.
14. Lutz J, Zou H, Liu S, Antus B & Heemann (2003). Apoptosis and treatment of chronic allograft nephropathy with everolimus. *Transplantation*, 76: 508-515.
15. Suthantiran M, Morris RE & Strom TB (1996). Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action. *American Journal of Kidney Diseases*, 28: 159-172.
16. Di Renzo M (2002). Enhanced apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in cardiac transplanted patients undergoing chronic immunosuppressive treatment. *Transplant Immunology*, 10: 269-275.
17. Wu MX, Ao Z, Daley JF & Schollossman SF (1997). Induction and detection of apoptosis in human periphery blood T cell. *Journal of Immunological Methods*, 206: 153-162.

18. Olej B, Lugon JR, P da Silva FE, Meletti-Oliveira MC & Rumjanek VM (2002). Atividade imunossupressora de preparações de ciclosporina A em células mononucleares. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 24 (Supl 1): 5-10.
19. Staruch MJ, Sigal NH & Dumont FJ (1991). Differential effects of the immunosuppressive macrolides FK-506 and rapamycin on activation-induced T-cell apoptosis. *International Journal of Immunopharmacology*, 13: 677-685.
20. Ishizuka T, Sakata N, Johnson GL, Gelfand EW & Terada N (1997). Rapamycin potentiates dexamethasone-induced apoptosis and inhibits JNK activity in lymphoblastoid cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 230: 386-391.
21. Koenen HJ, Michielsen EC, Verstappen J, Fasse E & Joosten I (2003). Superior T-cell suppression by rapamycin and FK506 over rapamycin and cyclosporine A because of abrogated cytotoxic T-lymphocyte induction, impaired memory responses, and persistent apoptosis. *Transplantation*, 75: 1581-1590.
22. Muthukkumar S, Ramesh TM & Bondada S (1995). Rapamycin, a potent immunosuppressive drug, causes programmed cell death in B lymphoma cells. *Transplantation*, 60: 264-270.
23. Bauer KD, Duque RE, Shankey TV. In: *Clinical Flow Cytometry Principles and Application*. Part 1- Section B. Technical Aspects. Library of Congress, 1993.p 71-177.
24. Torony C (2001). Renal tubular cell necrosis and apoptosis in transplanted kidneys. *Cell Biology Int*, 25: 267-270.
25. Lieberthal W (1996). Mechanisms of apoptosis and its potential role in tubular epithelial cell injury. *American Journal of Physiology*, 271: 477-488.
26. Wells AD, Li XC, Li Y, Walsh MC, Zheng XX, Wu Z, Nuñez G, Tang A, Sayegh M, Hancock WW, Strom TB & Turka LA (1999). Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nature Medicine*, 5: 1303-1307.

27. Li Y, Li XC, Zheng XX, Wells AD, Turka LA & Strom TB (1999). Blocking both signal 1 and 2 of T-cell activation prevents apoptosis of active T cell and induction of peripheral allograft tolerance. *Nature Medicine*, 5: 1298-1302.

28. Prud'homme GJ, Vanier LE, Bocarro DC & Ste-Croix H (1995). Effects of cyclosporine A, rapamycin, and FK520 on peripheral T-cell deletion and anergy. *Cellular Immunology*, 164: 47-56.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Percentage of apoptosis in human peripheral non stimulated lymphocytes, stimulated by PHA, non stimulated and exposed to rapamycin, stimulated and exposed to rapamycin.

Figure 2: The apoptotic effect in peripheral human lymphocytes after stimulation by PHA and/or exposure to rapamycin. The frames represent 1) live cells; 2) debris; 3) cells in necrosis; 4) cells in apoptosis.

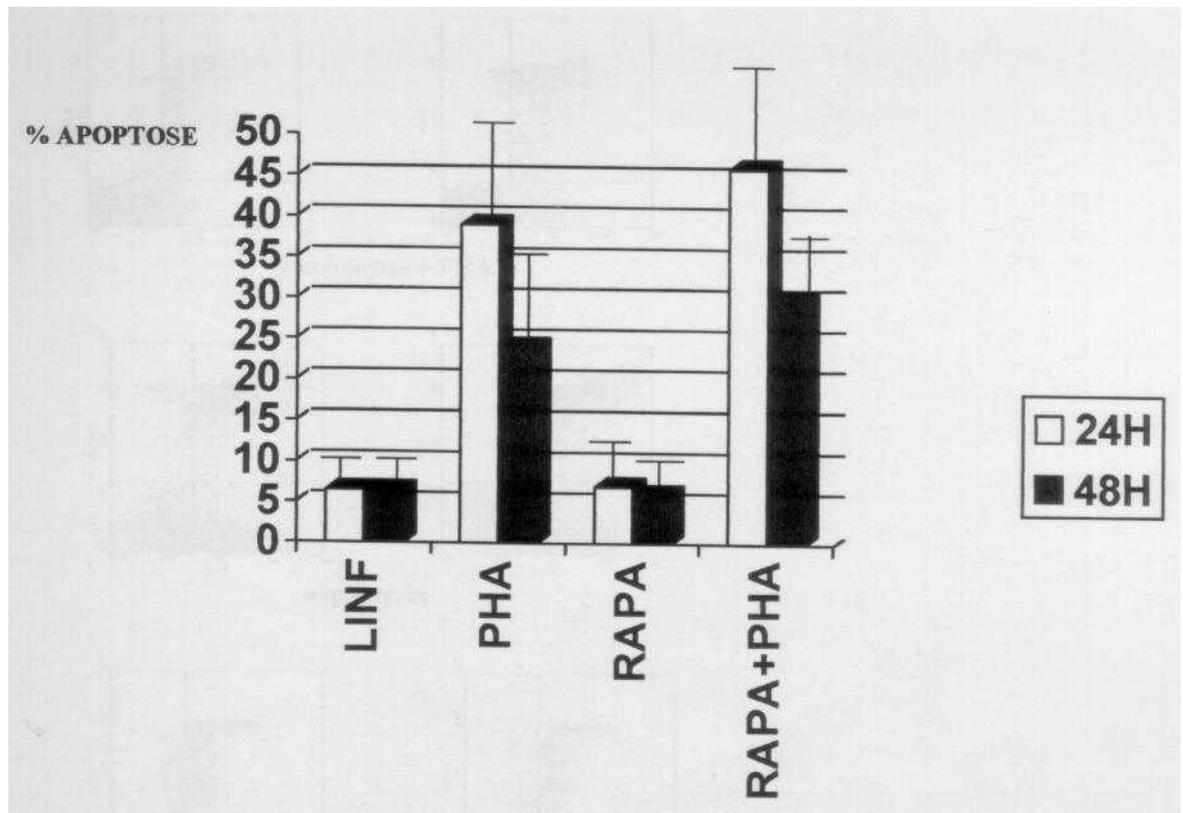


Figure 1 – Percentage of apoptosis: lymphocytes non stimulated (LINF), lymphocytes stimulated by PHA (PHA), lymphocytes non stimulated and exposed to rapamycin (RAPA), lymphocytes stimulated by PHA and exposed to rapamycin (RAPA+PHA).

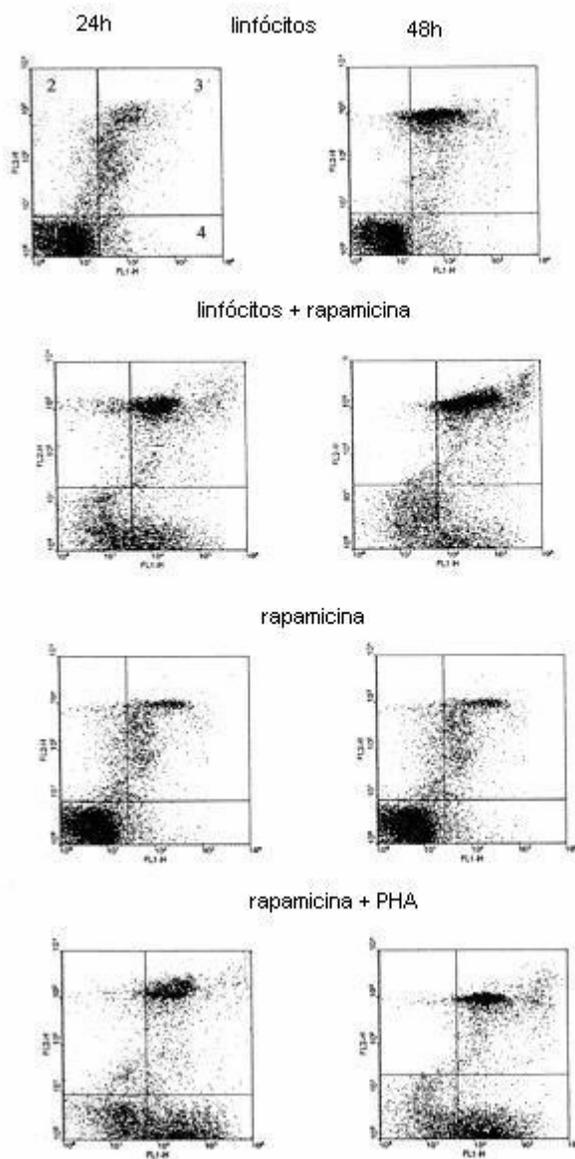


Figure 2 – The apoptotic effect in peripheral human lymphocytes after stimulation by PHA and/or exposure to rapamycin. The frames represent 1) live cells; 2) debris; 3) cells in necrosis; 4) cells in apoptosis.