

MONITORAÇÃO IMUNOLÓGICA PÓS-TRANSPLANTE CARDÍACO

Andriy Morgun, Natalia Shulzhenko , Maria Gerbase-DeLima

Setor de Imunogenética, Disciplina de Alergia, Imunologia Clínica e Reumatologia, Departamento de Pediatria, Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP, Brasil

Correspondência:

Profa. Maria Gerbase-DeLima

Setor de Imunogenética – UNIFESP – Escola Paulista de Medicina

e-mail: gerbase@igen.epm.br

Título resumido: Expressão de genes de ativação imune em transplante cardíaco

UNITERMOS

Palavras chave: Rejeição em Transplante Cardíaco, Monitoração Imunológica; RT-PCR; cDNA array

Key words: Cardiac Allograft Rejection; Immunologic Monitoring; RT-PCR, cDNA array

Resumo

A monitoração imunológica no pós-transplante cardíaco tem sido proposta com os seguintes objetivos: incremento na sensibilidade dos métodos correntemente utilizados para o diagnóstico de rejeição; descoberta de marcadores capazes de

indicar ocorrência de rejeição antes do aparecimento de lesões histológicas; estabelecimento de parâmetros para individualização das doses/tipos de imunossupressores; descoberta de novos alvos para modulação *in vivo* da resposta imune. Neste artigo, revisamos a contribuição, em termos de respostas a estas questões, de estudos em que foi realizada avaliação de expressão de genes da resposta imune em biópsias endomiocárdicas e em sangue de receptores de transplante cardíaco.

Summary

The goals of immunological monitoring after cardiac transplantation could be summarized as follows: improvement of the sensitivity of the current methods of diagnosis of rejection; disclosure of markers that could indicate the occurrence of rejection before the appearance of histologic alterations; establishment of parameters for adjustment of immunosuppression; identification of new possible targets for immunotherapy. In this paper we review the contribution to these questions of studies concerning the expression of immune activation genes in endomyocardial biopsies and in blood of cardiac transplant recipients.

O transplante cardíaco é uma terapêutica eficaz para pacientes com insuficiência cardíaca terminal. Entretanto, a reação de rejeição continua a representar uma grave ameaça para seu sucesso, a despeito da grande evolução que vem ocorrendo em termos de drogas imunossupressoras. A rejeição aguda é a principal causa de morbidade e de mortalidade no período entre 30 dias e 12 meses pós-transplante e, juntamente com a rejeição crônica e as neoplasias, representa também uma importante causa de morte no pós-transplante tardio¹.

Durante o primeiro ano pós-transplante, a incidência de rejeição aguda situa-se em torno de 40 episódios de rejeições/100 pacientes/mês². É muito importante seu diagnóstico precoce e preciso, de maneira a orientar, com segurança, sobre a necessidade de tratamento imunossupressor suplementar.

Diagnóstico de rejeição no transplante cardíaco

O diagnóstico de rejeição aguda do transplante cardíaco repousa fundamentalmente na avaliação histopatológica de biópsias endomiocárdicas, (BEM) uma vez que as alterações funcionais decorrentes da rejeição se expressam em geral mais tardiamente. A avaliação histológica de BEM, entretanto, apresenta problemas de sensibilidade e nem sempre permite a distinção entre episódios de rejeição leves, auto-limitados, e aqueles que irão progredir para quadros mais sérios.³⁻⁹

Desta maneira, tornam-se importantes pesquisas sobre outros métodos que, isoladamente, ou em conjunto com a avaliação histológica de biópsias endomiocárdicas, possam contribuir para uma maior precisão no diagnóstico de rejeição do transplante cardíaco.

Monitoração imunológica

O reconhecimento de aloantígenos pelos linfócitos T, em conjunto com sinais co-estimulatórios apropriados, inicia uma cascata de eventos, envolvendo uma série de citocinas e de células, que culminam na reação de rejeição aguda.

Com base no conhecimento dos diversos elementos que participam da resposta imune contra o enxerto, tem sido proposta a monitoração imunológica no pós-transplante com os seguintes objetivos:

1. aumentar a sensibilidade dos métodos correntemente utilizados para o diagnóstico de rejeição;
2. descobrir marcadores capazes de indicar ocorrência de rejeição antes do aparecimento de lesões histológicas;
3. estabelecer parâmetros para individualização das doses/tipos de imunossupressores
4. descobrir novos alvos para modulação *in vivo* da resposta imune

Que moléculas devem ser investigadas?

Qualquer molécula que participe na ativação, desenvolvimento, regulação ou fase efetora da resposta imune é candidata a fornecer informações sobre a resposta imune do receptor contra o enxerto.

Onde e como monitorar?

A maior parte dos estudos têm utilizado fragmentos de endomiocárdio, colhidos por ocasião das biópsias rotineiramente realizadas com finalidade de diagnóstico de rejeição. Amostras de sangue, representando uma alternativa não invasiva, também têm sido também investigadas. Os métodos empregados devem apresentar boa reprodutibilidade e serem de execução relativamente rápida.

Qualquer que seja o material ou método utilizado, maiores informações são em geral obtidas quando os testes são realizados de maneira seriada, permitindo que sejam consideradas flutuações de valores em um mesmo paciente.

Os métodos de biologia molecular vêm apresentando grandes novidades nos últimos anos, oferecendo um grande potencial de utilização para o seguimento de receptores de transplantes de órgãos. Os métodos baseados em reação em cadeia catalizada pela enzima DNA polimerase em combinação com transcrição reversa (RT-PCR, de *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) são os mais utilizados, especialmente em situações em que somente pequenas quantidades de material são disponíveis para análise. No método de RT-PCR, inicialmente o RNA total ou o RNA mensageiro (mRNA) é isolado da amostra e convertido em seu DNA complementar (cDNA). A seguir, o cDNA é amplificado através PCR com *primers* específicos para o gene de interesse. A quantificação do cDNA pode ser realizada através do método tradicional de ensaio competitivo ou através do novo método denominado “real-time” RT-PCR. A quantidade de cDNA reflete a quantidade de mRNA o qual, por sua vez, reflete o grau de ativação do gene e também, em geral, a quantidade da proteína sintetizada.^{10,11}

Monitoração imunológica e diagnóstico de rejeição

A pesquisa de parâmetros de ativação imune em fragmentos de biópsias endomiocárdicas, através de técnicas imuno-histoquímicas ou através da detecção de mRNA, tem sido bastante explorada, nos últimos 10 anos, como ferramenta diagnóstica de rejeição no transplante cardíaco.¹²⁻³⁹ Os resultados obtidos em relação a algumas moléculas, como, por exemplo, IFN- γ , TNF, CD40L e IL-8 apresentam muitas controvérsias, observando-se desde correlação de sua detecção com rejeição aguda,^{15, 24, 27, 28, 30} até falha de sua detecção em todas as biópsias estudadas.^{17, 23, 25, 26} Entretanto, em relação às moléculas efetoras de citotoxicidade mediada por células (FasL, granzima, perforina), os estudos são unânimes em detectar a expressão aumentada destas moléculas durante a rejeição.^{13, 21, 31}

Nosso grupo demonstrou aumento de expressão de vários genes de moléculas envolvidas na resposta imune em biópsias endomiocárdicas com rejeição histologicamente comprovada. Estes genes incluem os codantes para moléculas co-estimulatórias (CD40L, TIRC7, CD27), citocinas (IFN- γ , IL-8), e moléculas efetoras de citotoxicidade mediada por células (perforina, granzima B, FasL) ³³⁻³⁶. É importante notar que a detecção de aumento de expressão de um gene isolado (por ex., TIRC7) ou de uma combinação de genes (por ex (perforina, granzima B, FasL) permitiu se atingir 100% de sensibilidade no diagnóstico de rejeição. O poder do teste de análise de expressão gênica em biópsias pode ainda ser apreciado considerando-se que uma alta sensibilidade é alcançada através do exame de um só fragmento de biópsia, em contraste com o exame histopatológico, que requer o exame de 3 a cinco fragmentos para produzir resultados confiáveis.

Estudos de expressão gênica em células mononucleares de amostras de sangue colhidas no momento da realização de biópsia mostrou que durante os episódios de rejeição ocorria um aumento dos níveis de mRNA TNF- α e IL-8, enquanto que havia diminuição dos níveis de mRNA de TIRC7, perforina, granzima B e IFN- γ . ³⁷ É interessante notar que todas as moléculas cujos níveis de mRNA aumentaram durante a rejeição correspondem a moléculas que são principalmente, ou exclusivamente, produzidas por monócitos/macrófagos, enquanto que aquelas cujos níveis de mRNA eram menores durante a rejeição correspondiam a produtos de linfócitos T ativados. Uma possível explicação para esta última observação é que durante a rejeição haja uma maciça migração de linfócitos T ativados da periferia para o enxerto, resultando em uma redução destas células no sangue periférico.

Os resultados obtidos até o momento parecem indicar que a utilização de marcadores no sangue periférico na monitoração imunológica pós-transplante é dificultada pela grande variabilidade individual nos níveis de mRNA, o que torna impossível o estabelecimento de pontos de corte para serem utilizados na clínica.^{34, 37} Além disto, os níveis de mRNA de células mononucleares do sangue parecem sofrer a influência de outros fatores além da rejeição, tais como níveis de imunossuppressores e ocorrência de infecção. Acreditamos, entretanto, que a análise seriada e combinada de vários marcadores no sangue ainda possa vir a representar uma ferramenta útil na monitoração pós-transplante.

Monitoração imunológica e predição de rejeição

Com o objetivo de investigar marcadores com valor preditivo para a ocorrência de rejeição a curto prazo (15 dias), comparamos a expressão de genes em biópsias sem alterações histológicas que foram seguidas (biópsias pré-rejeição) ou não (biópsias sem rejeição) por um episódio de rejeição comprovado por biópsia em um intervalo de 7 a 15 dias. Os resultados mostraram expressão aumentada dos genes de IFN- γ , TIRC7, perforina, granzima B e FasL em biópsias pré-rejeição.³⁴⁻³⁶ Ainda que outros estudos sejam necessários para avaliar a propriedade de instituição de tratamento contra a rejeição com base no aumento dos níveis de mRNA destas moléculas em biópsias, este fenômeno poderia pelo menos indicar a necessidade de uma nova biópsia em intervalo menor do que o que seria respeitado dentro do esquema rotineiro de biópsias.

Valor preditivo de rejeição a longo prazo foi descrito em relação a níveis de expressão de mRNA de bFGF (*basic fibroblast growth factor*) em biópsia colhida ao final da primeira semana pós-transplante.³⁸ Dados de nosso laboratório sugeriram associação entre ausência de expressão intra-enxerto do gene da

molécula co-estimulatória CD27 e a não ocorrência de rejeição aguda nos seis primeiros meses pós-transplante.³⁹

Descoberta de possíveis alvos para modulação in vivo da resposta imune

Resultados promissores em termos de sobrevida do enxerto foram obtidos em modelos experimentais de transplantes através da utilização de anticorpos ou de moléculas solúveis capazes de bloquear a co-estimulação de linfócitos T. O sucesso de medidas semelhantes em transplantes no homem pode ser antecipado, desde que as moléculas-alvo do bloqueio estejam expressas em linfócitos T ativados, mesmo em pacientes que estejam submetidos à imunossupressão. Os estudos que realizamos envolvendo uma série de moléculas co-estimulatórias sugerem que seria interessante tentar o bloqueio de CD40L e TIRC7.^{34, 35} Por outro lado, não parece promissor o bloqueio de 4-1BB ou de CD70, uma vez que não detectamos nenhuma destas duas moléculas em biópsias, talvez porque sua expressão tenha sido eficientemente bloqueada pelas drogas imunossupressoras de uso corrente.³⁹

A Tecnologia de cDNA array na monitoração imunológica

Em contraste com métodos como o RTPCR que permitem a investigação de um número relativamente pequeno de genes, a tecnologia de cDNA *array* oferece a possibilidade de uma análise simultânea da expressão de centenas a milhares de diferentes genes. Neste método, o RNA é inicialmente transformado (transcrição reversa) em cDNA marcado com fluorocéina ou com isótopos radioativos. Este cDNA é então hibridizado com uma matriz onde estão dispostas as sondas complementares aos diversos genes sob investigação. As matrizes podem ser membranas de náilon ou lâminas de vidro ou de plástico. Após a hibridização, a matriz é lavada e escaneada para detecção de sinais de

radioatividade ou de corantes fluorescentes, através de sistemas automáticos de detecção. O sinal gerado em cada ponto será proporcional à quantidade de cDNA derivado da amostra.⁴⁰

O interesse desta tecnologia para a monitoração pós-transplante é muito grande porque a comparação do padrão de expressão dos genes em amostras de biópsias com e sem rejeição, por exemplo, permitiria a identificação de genes, ou conjuntos de genes, que apresentam as maiores amplitudes de variação de expressão entre as duas condições. Estes genes, incluindo genes que codificam para moléculas envolvidas na resposta imune ou não, para moléculas conhecidas ou não, seriam candidatos a marcadores de rejeição.

Até o presente, há poucos estudos em que a tecnologia de cDNA array tenha sido utilizada para explorar a resposta imune ao enxerto. Em um estudo recente, nós utilizamos esta tecnologia para investigar o nível de expressão de 268 genes da resposta imune em respostas alogênicas *in vitro* (cultura mista de linfócitos) e *in vivo* (transplante cardíaco).⁴¹ Este estudo revelou uma série de genes cujos níveis de expressão poderiam ser úteis como marcadores de rejeição. Além disto, evidenciou que o nível de expressão de alguns genes foi maior em biópsias sem do que com rejeição, o que está de acordo com o conceito que os períodos sem rejeição não representam períodos de ausência de atividade imunológica e sim períodos em que circuitos imunológicos antagônicos à rejeição estejam atuando. A investigação das moléculas que participam destes circuitos também poderia gerar conhecimentos importantes para o desenvolvimento de novas perspectivas no campo da imunossupressão.

Considerações Finais

A monitoração imunológica de receptores de transplante cardíaco representa uma ferramenta muito interessante, tanto no sentido de entendimento da reação de rejeição no homem como para estabelecimento de marcadores que possam aumentar a sensibilidade do diagnóstico histológico de rejeição. Entretanto, há ainda peculiaridades e dificuldades que devem ser consideradas, tais como: a utilidade de cada marcador deve ser validada para cada esquema imunossupressor; a importante variabilidade interindividual em relação aos níveis de expressão dos diferentes genes torna difícil estabelecer limites de normalidade; a ocorrência de infecções pode afetar os níveis dos marcadores, especialmente quando avaliados no sangue periférico.

Referências Bibliográficas

1. Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Boucek MM, Novick RJ. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Seventeenth Official Report-2000. *J Heart Lung Transplant.* 2000; 19: 909-931
2. Kubo SH, Naftel DC, Mills RM Jr, O'Donnell J, Rodeheffer RJ, Cintron GB, Kenzora JL, Bourge RC, Kirklin JK. Risk factors for late recurrent rejection after heart transplantation: a multiinstitutional, multivariable analysis. *Cardiac Transplant Research Database Group. J Heart Lung Transplant.* 1995; 14:409-418.
3. Billingham ME, Cary NR, Hammond ME, Kemnitz J, Marboe C, McCallister HA, Snovar DC, Winters GL, Zerbe A. A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group. *The International Society for Heart Transplantation. J Heart Lung Transplant.* 1990; 9: 587-593

4. Zerbe TR, Arena V. Diagnostic reliability of endomyocardial biopsy for assessment of cardiac allograft rejection. *Hum Pathol.* 1988; 19: 1307-1314.
5. Kemkes BM, Schutz A, Engelhardt M, Brandl U, Breuer M. Noninvasive methods of rejection diagnosis after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 1992; 11: 221-231
6. Topalidis T, Warnecke H, Muller G, Hetzer R. Endomyocardial biopsies - the potential margin of error. *Transplant Proc.*1990; 22:1443
7. Nakhlen RE, Jones J, Gostwitz JJ, Anderson EA, Titus J. Correlation of endomyocardial biopsy findings with autopsy findings in human cardiac allografts. *J Heart Lung Transplant.* 1992; 11: 479-485
8. Winters GL, McManus BM. Consistencies and controversies in the application of the International Society for Heart and Lung Transplantation working formulation for heart transplant biopsy specimens. Rapamycin Cardiac Rejection Treatment Trial Pathologists. *J Heart Lung Transplant.* 1996; 15: 728-735
9. Ballester M, Bordes R, Tazelaar HD, Carrio I, Marrugat J, Narula J, Billingham ME. Evaluation of biopsy classification for rejection: relation to detection of myocardial damage by monoclonal antimyosin antibody imaging. *J Am Coll Cardiol.* 1998; 6:1357-1361
10. Freeman W, Walker S. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 1999; 26: 112-122.
11. Kamula US, Marincola FM, Rosenberg SA. Real-time quantitative polymerase chain reaction assessment of immune reactivity in melanoma patients after peptide vaccination. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92: 1336-1344

12. Clement MV, Haddad P, Soulie A, Benvenuti C, Lichtenheld MG, Podack ER, Sigaux N. Perforin and granzyme B as markers for acute rejection in heart transplantation. *Int Immunol.* 1991; 3: 1175-1181
13. Griffiths GM, Namikawa R, mueller C, Liu CC, Young JD, Billingham, M, Weissman I. Granzyme A and perforin as markers for rejection in cardiac transplantation. *Eur J Immun.* 1991; 21: 687-693
14. Ruan XM, Qiao JH, Trento A, Czer LS, Blanche C, Fishbein MC. Cytokine expression and endothelial cell and lymphocyte activation in human cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant.* 1992; 11: 1110-1116
15. Wu CJ, Lovett M, Wong-lee J, Moeller F, Kitamura M, Goralski TJ, Billingham ME, Starnes VA, Clayberger C. Cytokine gene expression in rejecting cardiac allografts. *Transplantation.* 1992; 54: 326-332
16. Wijngaard PLG, Tuijnman WB, Meyling FHJG, Van der meulen A, Huytink M, Jambroes G, Schuurman HJ. Endomyocardial biopsies after heart transplantation. *Transplantation.* 1993; 55: 103-110.
17. Zhao XM, Frist WH, Yeoh TK, Miller GG. Expression of cytokine genes in human cardiac allografts: correlation of IL-6 and transforming growth factor-beta (TGF-beta) with histological rejection. *Clin Exp Immunol.* 1993 ; 93: 448-451
18. Baan CC, van Emmeric NEM, Balk AHMM, Quint WGV, Mochtar B, Jutte, NHPM, Niester HGM & Weimar W. Cytokine mRNA expression in endomyocardial biopsies during acute rejection from human heart transplants. *Clin Exp Immunol.* 1994; 97: 293-298

19. Cunningham DA, Dunn MJ, Yacoub MH, ROSE ML. Local production of cytokines in the human cardiac allograft. *Transplantation*. 1994; 57:1333-1337
20. Legros-Maida S, Soulie A, Benvenuti C, Wargnier A, Vallee N, Berthou C, Guillet J, Sasportes M, Sigaux N. Granzyme B and perforin can be used as predictive markers in heart transplantation. *Eur J Immun*. 1994; 24: 229-233
21. Alpert S, Lewis NP, Fowler M & Valentine HA. The relationship of granzyme A and perforin expression to cardiac allograft rejection and dysfunction. *Transplantation*. 1995; 60: 1478-1485
22. Kummer JA, Wever PC, Kamp AM, Temberge IJ, Hack CE, Weening JJ. Expression of granzyme A and B proteins by cytotoxic lymphocytes involved in acute renal allograft rejection. *Kidney Int*. 1995; 47:70-77
23. Grant SCD, Guy SP, Lamb WR, Brooks NH, Brenchley PES, Hutchinson IV. Expression of cytokine messenger RNA after heart transplantation. *Transplantation*. 1996; 62: 910-916
24. Kimball PM, Radovancevic B, Isom T, Spickard A, Frazier OH. The paradox of cytokine monitoring - predictor of immunologic activity as well as immunologic silence following cardiac transplantation. *Transplantation*. 1996; 61: 909-915
25. Lagoo AS, George JF, Naftel D, Griffin AK, Kirklin JK, Lagoo-deenadayalan S, Hardy KJ, Savunen T, McGiffin DC. Semiquantitative measurement of cytokine messenger RNA in endomyocardium and PBMCs from human heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 1996; 15: 206-217
26. Van Hoffen, E.; Van wichen, D, Stuij I, De jonge N, Klopping C, Lahpor J, Van den tweel J, Gmelig Meyling F, De weger R. *In situ* expression of cytokines in human heart allografts. *Am J Pathol*. 1996; 149: 1991-2003

27. Abdallah AN, Billes MA, Attia Y, Doutremepuich C, Cassaigne A, Iron A. Evaluation of plasma levels of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 as rejection markers in a cohort of 142 heart-grafted patients followed by endomyocardial biopsy. *Eur Heart J.* 1997; 18:1024-1029
28. Reul RM, Fang JC, Denton MD, Geehan C, Long C, Mitchell RN, Anz P, Briscoe DM. CD40 and CD40 ligand (CD154) are coexpressed on microvessels *in vivo* in human cardiac allograft rejection. *Transplantation.* 1997; 64:1765-1774
29. Zhang XP, Kelemen SE, Eisen HJ. Quantitative assessment of cell adhesion molecule gene expression in endomyocardial biopsy specimens from cardiac transplant recipients using competitive polymerase chain reaction. *Transplantation.* 2000; 70:505-513
30. Alvarez CM, Fernandez D, Builes M, Zabaleta J, Restrepo LM, Villegas A, Garcia LF. Intragraft cytokine expression in heart transplants with mild or no histological rejection. *Clin Transplant.* 2001; 15: 228-235
31. Oh SI, Kim IW, Jung HC, Seo JW, Chae IH, Kim HS, Oh BH. Correlation of Fas and Fas ligand expression with rejection status of transplanted heart in human. *Transplantation.* 2001; 71: 906-909
32. de Groot-Kruseman HA, Klepper M, Mol WM, Niesters HG, van Gelder T, Maa AP, Balk A, Weimar W, Baan C. Intragraft mRNA expression of the novel cytokine IL-21 during acute rejection after clinical heart transplantation *J Heart Lung Transplant.* 2002; 21:165

33. Shulzhenko N, Morgun A, Franco M, Souza MM, Almeida DR, Diniz RVZ, Carvalho ACC, Pacheco-Silva A, Gerbase-DeLima M. Expression of immune activation genes in biopsies after cardiac transplantation. *Brazilian Pediatric News*, 2 (serial online). www.brazilpednews.org.br/mar2000
34. Shulzhenko N, Morgun A, Rampim GF, Franco M, Almeida DR, Diniz RVZ, Carvalho ACC, Gerbase-DeLima M. Monitoring of intragraft and peripheral blood TIRC7 expression as a diagnostic tool for acute cardiac rejection in humans. *Hum Immunol*. 2001; 62: 342-347
35. Shulzhenko N, Morgun A, Franco M, Souza MM, Almeida DR, Diniz RVZ, Carvalho ACC, Pacheco-Silva A, Gerbase-DeLima M. Expression of CD40 ligand, interferon- γ and Fas ligand genes in endomyocardial biopsies of human cardiac allografts: correlation with acute rejection. *Braz J Med Biol Res*. 2001; 34: 779-784
36. Shulzhenko N, Morgun A, Zheng XX, Diniz RVZ, Almeida DR, Ma N, Strom TB, Gerbase-DeLima M. Intragraft activation of genes encoding cytotoxic T lymphocyte effector molecules precedes the histological evidence of rejection in human cardiac transplantation. *Transplantation*. 2001; 72: 1705-1708
37. Morgun A, Shulzhenko N, Diniz RVZ, Almeida DR, Carvalho ACC, Gerbase-DeLima M. Cytokine and TIRC7 mRNA expression during acute rejection in cardiac allograft recipients. *Transplant Proc*. 2001; 33: 1610-1611
38. de Groot-Kruseman HA, Baan CC, Loonen EH, Mol WM, Niesters HG, Maat AP, Balk AH, Weimar W. Failure to down-regulate intragraft cytokine mRNA expression shortly after clinical heart transplantation is associated with high incidence of acute rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2001; 20:503-510

39. Shulzhenko N, Morgun A, Chinellato AP, Rampim GF, Diniz RVZ, Almeida DR, Gerbase-DeLima M. CD27 but not CD70 and 4-1BB intragraft gene expression is a risk factor for acute cardiac allograft rejection in humans. *Transplant Proc.* 2002; 34: in press
40. Freeman WM, Robertson DJ, Vrana KE. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *BioTechniques.* 2000; 29:1042-1055
41. Morgun A, Shulzhenko N, Silva IDCG, Rampim GF, Chinellato AP, Borra RC, Gerbase-DeLima M. Expressão diferencial de genes em biópsias de transplantes cardíacos com e sem rejeição e em linfócitos estimulados ou não por células alogênicas *in vitro*. *Jornal Brasileiro de Transplantes.* 2001; 4: 5-7