SIMONE MARTINS DE CASTRO

SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS DURANTE A DOENÇA POR CITOMEGALOVIRUS EM TRANSPLANTADOS RENAIS

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

ORIENTADOR: PROFA. DRA. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA

CAMPINAS

2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

SIMONE MARTINS DE CASTRO

SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS DURANTE A DOENÇA POR CITOMEGALOVIRUS EM TRANSPLANTADOS RENAIS

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Simone Martins de Castro.

Campinas, 13 de julho de 2001.

Sandra cecília Botelho costa

Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa
- Orientadora -

ORIENTADOR: PROFA. DRA. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA

CAMPINAS

2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Castro, Simone Martins de

C279a "Subpopulações linfocitárias durante a doença por CMV em transplantados renais" / Simone Martins de Castro. Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Sandra Cecília Botelho Costa
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Vírus. 2. Transplante de rim. 3. Infecção. I. Sandra Cecíla Botelho Costa. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
C279a
V ____ EX ____
TOMBO BC/ 49353
PROC 16-837/02
C ____ DX ____
PREÇO R$ 11,00
DATA 04/06/02
Nº CPD ____

CM00168299-5

BIB ID 242712

UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

Membros:

Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa Sandra Cecília Botelho Costa

Profa. Dra. Maria Aparecida Barone Teixeira MABarone

Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela Marluce Vilela

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 13/07/01

200224633

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original"

Albert Einstein

Às minhas filhas Luisa e Laura, que me estimulam, diariamente a conquistar um espaço profissional melhor.

Ao meu marido Marco, pai Antonio e mãe Olga, que sem o apoio deles este trabalho não teria sido realizado.

AGRADECIMENTOS

A todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa, orientadora deste trabalho, pelo apoio, confiança e estímulo.

Ao Dr. Jorge Neumann, pela amizade, estímulo e ajuda inestimável em todas as fases de realização deste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa de Porto Alegre, especialmente às bioquímicas Heloisa Sporleder, Raquel Canabarro e à bióloga Regina Schöreder.

Ao Serviço de Nefrologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, em especial ao Dr. Auri Ferreira dos Santos, pela colaboração técnica prestada.

Ao Prof. Dr. Mário Wagner, pela amizade e assessoria na análise estatística.

Aos pacientes pela colaboração.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS ..... **XI**
SUMÁRIO ..... **XIII**
LISTA DE ABREVIAÇÕES ..... **XVII**
LISTA DE TABELAS ..... **XXI**
LISTA DE FIGURAS ..... **XXV**
RESUMO ..... **XXIX**
ABSTRACT **31**
1 INTRODUÇÃO **35**
1.1 ASPECTOS GERAIS DO TRANSPLANTE RENAL 35
1.2 CITOMEGALOVÍRUS (CMV) 37
1.2.1 Características do vírus *37*
1.2.2 Epidemiologia *40*
1.2.3 Manifestações clínicas *41*
1.2.4 Diagnóstico Laboratorial *42*
1.3 SISTEMA IMUNE 44
1.3.1 Citometria de Fluxo *44*
1.3.2 Linfócitos *46*
1.4 IMUNIDADE AOS VÍRUS 53
1.5 INFECÇÃO POR CMV EM TRANSPLANTADOS RENAIS 55
1.6 CMV X CÉLULAS NK X SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS 57
2 OBJETIVOS **62**
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS **64**
3.1 CASUÍSTICA 64

3.1.1 IMUNOSSUPRESSÃO E TRATAMENTO ANTIVIRAL 67
3.1.2 Critérios de inclusão dos pacientes no estudo *68*
3.1.3 Critérios para detecção de infecção ativa pelo CMV *68*
3.1.4 Critérios para caracterização de provável doença por CMV *68*
3.2 MÉTODOS 69
3.2.1 Determinação da antigenemia para CMV *69*
3.2.1.1 Separação das células *69*
3.2.1.2 Kit Clonab CMV – APAAP Kit, Art. No 812680 (Biotest) *69*
3.2.2 Imunofenotipagem de linfócitos *71*
3.2.2.1 Reagentes utilizados *71*
3.2.2.2 Técnica *72*
3.2.3 Testes para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-CMV *73*
3.2.3.1 Determinação de IgM anti-CMV por EIA (enzima imunoensaio) *73*
3.2.3.2 Determinação de IgG anti-CMV por EIA (enzyme immunoassay) *73*
3.2.4 Métodos Estatísticos *74*
RESULTADOS **76**
3.3 INFECÇÃO E PROVÁVEL DOENÇA PELO CMV 76
3.4 IMUNOFENOTIPAGEM DE SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS 84
3.4.1 Valores absolutos das subpopulações linfocitárias e de células NK no momento do pré-transplante dos receptores de rim *84*
3.4.2 Valores absolutos das subpopulações linfocitárias e de células NK nas doze semanas posteriores ao transplante de rim *85*
3.4.2.1 Linfócitos T (CD3+) *85*
3.4.2.2 Linfócitos T helper (CD3+CD4+) *87*
3.4.2.3 Linfócitos T citotóxicos (CD3+CD8+) *89*
3.4.2.4 Linfócitos B (CD19+) *91*
3.4.2.5 Linfócitos T ativados (CD3+HLA-DR+) *93*
3.4.3 Células NK (CD3-CD(16+56)+) *95*
4 DISCUSSÃO **98**
CONCLUSÕES **111**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **114**

LISTA DE ABREVIAÇÕES

CMV	Citomegalovirus
DNA	Ácido desoxiribonucleico
UL	Sequência única longa
US	Sequência única curta
Kda	Kilodaltons
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
TGO	Transaminase oxalacética
TGP	Transaminase pirúvica
IL	Interleucina
IFN	Interferon
IFNγ	Interferon gama
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
CsA	Ciclosporina
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NK	Células natural killer
LTCs	Linfócitos T citotóxicos
Ig	Imunoglobulina
RCT	Receptor de célula T
CD	Cluster de diferenciação

LAK	Células matadoras ativadas por linfocinas
Th	Linfócito T helper
ATG	Globulina antitimócito
OKT3	Anticorpo antilinfocitário
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
^{51} Cr	Cromo radioativo 51
UCA	Unidade cirúrgica
IgG	Imunoglobulina de classe G
IgM	Imunoglobulina de classe M
HLA	Antígeno leucocitário humano
PBS	Tampão salina fosfato
TBS	Tampão trizma
APAAP	Fosfatase alcalina antifosfatase alcalina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Tx	Transplante
LGLs	Linfócitos grandes e granulares
EBV	Epstein-barr virus
IFI	Imunofluorescência indiresta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características gerais dos transplantados renais participantes do estudo (sexo, idade, tipo de transplante, imunossupressão realizada para episódios de rejeição e sorologia do doador e receptor para CMV, pré-transplante 65

Tabela 2 - Anticorpos monoclonais usados para a imunofenotipagem de linfócitos. 72

Tabela 3 - Perfil sorológico pré-tx do doador e receptor e presença ou ausência de provável doença por CMV nas 12 semanas pós-tx dos 61 pacientes adultos transplantados de rim estudados 77

Tabela 4 - Manifestações clínicas, tratamento e funcionamento do enxerto dos 20 pacientes com provável doença pelo CMV 78

Tabela 5 - Valores absolutos de linfócitos T (CD3+)/μl em pacientes transplantados renais sem e com provável doença por CMV. Os resultados estão expressos em mediana 86

Tabela 6 - Valores absolutos de linfócitos Th (CD3+CD4+)/μl em pacientes transplantados sem e com provável doença por CMV. Os resultados estão expressos em mediana 88

Tabela 7 - Valores absolutos de linfócitos Tc (CD3+CD8+)/µl em pacientes transplantados sem e com provável doença por CMV. Os resultados estão expressos em mediana 90

Tabela 8 - Valores absolutos de linfócitos B (CD19+)/µl em pacientes transplantados renais sem e com provável doença por CMV. Os resultados estão expressos em mediana 92

Tabela 9 - Valores absolutos de linfócitos CD3+HLA-DR+/µl em pacientes transplantados sem e com provável doença por CMV. Os resultados estão expressos em mediana 94

Tabela 10 - Valores absolutos de células NK CD(16+56)+ em pacientes transplantados renais sem e com provável doença por CMV. Os resultados estão expressos em mediana 96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do Citomegalovirus Humano 38

Figura 2 - Citometria de Fluxo 45

Figura 3 - Ontogenia das Células T 47

Figura 4 - Representação tridimensional das moléculas HLA de classe I e II e os respectivos sítios de ligação com o CD8 e o CD4 48

Figura 5 - Ontogenia da Célula B 50

Figura 6 - Subpopulações linfocitárias 54

Figura 7 - Leucócitos humanos infectados com CMV (pp65) e não infectados. (1) 71

Figura 8 - Número de casos com provável doença pelo CMV versus semanas pós-transplante 79

Figura 9 - Número absoluto de linfócitos T totais (CD3+) e a incidência de Doença pelo CMV. As colunas brancas representam o número absoluto de linfócitos T no grupo de pacientes sem doença pelo CMV. As colunas pretas representam este mesmo número no grupo com doença pelo CMV e as colunas cinzas representam a incidência da doença pelo CMV entre os nossos pacientes nas 12 semanas pós-transplante 80

Figura 10 - Correlação entre a antigenemia e a presença ou ausência de manifestações clínicas atribuíveis à provável doença por CMV nos 61 pacientes receptores de transplante renal estudados 81

Figura 11 - Representação gráfica do número de células positvas/100.000 leucócitos, ao longo das 12 semanas de estudo, dos 20 pacientes com provável doença por CMV 84

Figura 12 - Representação gráfica dos valores absolutos de linfócitos T (CD3+) entre os transplantados renais com provável doença por CMV (vermelho) e entre os sem doença (azul) *p<0,05 86

Figura 13 - Representação gráfica dos valores absolutos de linfócitos Th (CD3+CD4+) entre os transplantados renais com provável doença por CMV (vermelho) e entre os sem doença (azul). *p<0,05 88

Figura 14 - Representação gráfica dos valores absolutos de linfócitos Tc (CD3+CD8+) entre os transplantados renais com provável doença por CMV (vermelho) e entre os sem doença (azul) *p<0,05 91

Figura 15 - Representação gráfica dos valores absolutos de linfócitos B (CD19+) entre os transplantados renais com provável doença por CMV (vermelho) e entre os sem doença (azul) *p<0,05 92

Figura 16 - Representaçâo gráfica dos valores absolutos de linfócitos T ativados (CD3+HLA-DR+) entre os transplantados renais com provável doença por CMV (vermelho) e entre os sem doença (azul) *p<0,05 94

Figura 17 - Representação gráfica dos valores absolutos de células NK (CD3-CD(16+56)+) entre os transplantados renais com provável doença por CMV (vermelho) e entre os sem doença (azul) p<0,05 96

RESUMO

Foram examinadas alterações no número absoluto de células T, B e NK circulantes para determinar se mudanças significativas acontecem após o transplante renal e durante a infecção por citomegalovirus (CMV). Foram analisadas amostras consecutivas de sangue de 61 pacientes transplantados renais e em terapia padrão de immunossupressão tríplice. Foram determinados, usando-se dupla marcação por citometria de fluxo, os números absolutos de linfócitos CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD3+HLADR+ e CD16+56+. Quarenta e oito pacientes (78,7%) desenvolveram infecção ativa por CMV, e todos recuperaram. Vinte destes pacientes infectados (32,8%) contrairam doença por CMV durante o processo infeccioso. O número de linfócitos e o de suas principais subpopulações eram normais antes do episódio de doença por CMV. Durante a doença houve uma diminuição, seguida de um crescimento significante ($P < 0,005$) no número de linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e CD3+HLADR+. Nenhuma mudança significativa foi observada no número absoluto de células NK e nos linfócitos B durante a doença. Nós concluímos, uma vez que todos os pacientes com viremia desenvolveram uma resposta celular, que esta recuperação está associada com crescimento no número de subpopulações de células T.

ABSTRACT

We examined changes in the number of circulating T, B and NK cells to see if consistent changes occur following renal transplantation, during cytomegalovirus (CMV) infection. Serial blood samples were taken from 61 patients on standard triple immunossuppression therapy. Using two-color flow cytometry analysis, the absolute number of CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD3+HLADR+ and CD16+56+ were determine. Forty-eight (78,7%) patients developed active CMV infection, and all of them subsequently recovered. Twenty of these infected patients (32,8%) developed disease during the infectious process. The number of lymphocytes and their main subpopulations was normal before the onset of CMV disease. During the disease there was a decrease followed for significant growth (P<0,005) in the number of CD3+, CD4+, CD8+ and CD3+HLADR+. No significant changes were seen in natural killer cells and B lymphocytes during disease. We conclude, as all viraemic patients recovering from the infection developed a celular response, this recovery is associated with growth in the number of T subsets.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DO TRANSPLANTE RENAL

Atualmente, o transplante renal é a melhor opção terapêutica para milhares de pacientes com diagnóstico de uremia. O sucesso desse procedimento depende de um estado de equilíbrio entre uma imunossupressão suficiente para evitar rejeição ao enxerto, mas capaz de permitir que o sistema imune do receptor proteja-o de uma infecção, que continua sendo a principal causa de morbidade e mortalidade nesses pacientes (Aguado et al., 1995).

Aproximadamente, 58% dos pacientes apresentam infecção nos primeiros 6 meses após o transplante, sendo que 50% dessas infecções são causadas por vírus, 30% por bactérias, 5% por fungos e, nos 15% restantes, a infecção é polimicrobiana (Morris et al.,1982).

Pacientes receptores de transplante renal estão sujeitos a infecções por três motivos principais: 1) Foram submetidos a uma cirurgia de grande porte com envolvimento do sistema vascular e urológico. 2) São urêmicos. 3) Recebem drogas imunossupressoras, que exercem um grande efeito sobre o sistema imune (Mocelin et al., 1997).

Quanto à prevenção das infecções, nos transplantados renais, três momentos devem ser ressaltados: 1) Antes do transplante: Tanto o receptor como o doador, seja ele vivo ou cadáver, devem ser submetidos a testes para se determinar a presença de doenças

infecciosas ativas ou alguma evidência de exposição anterior que possa causar problemas após o transplante. 2) Durante a cirurgia: Existe um consenso de que o uso profilático de antibióticos no transoperatório é benéfico em reduzir a incidência de infecções na ferida operatória, embora exista uma considerável variação dessa medida na prática dos vários serviços de transplante renal. 3) Após o transplante: Com poucas exceções, as infecções causadas neste período são decorrentes de (a) reativação de organismos endógenos e (b) falta de técnicas preventivas convencionais no controle de infecções, como lavagens de mãos realizadas adequadamente (Goodman e col., 1990).

Geralmente, o principal fator determinante de infecção no pós-transplante é a intensidade da imunossupressão a que é submetido o transplantado: Quanto mais intensa a imunossupressão, maior o número de infecções e maior a gravidade (Van Dorp et al., 1989). Tratando-se de infecção, o pós-transplante pode ser dividido em três períodos: 1) O primeiro de 0 a 6 semanas. Normalmente, as infecções, neste perído, são decorrentes de complicações no procedimento cirúrgico, sendo as feridas e o trato urinário os principais locais e S. aureus e E. coli os germes mais isolados. 2) O segundo de aproximadamente 6 semanas a 6 meses após a cirurgia. Neste período, predominam os patógenos oportunistas clássicos. Como exemplo, temos: tuberculose, listeriose criptococose e outras infecções por fungos, infecção primária, reativação ou reinfecção pelo citomegalovirus (CMV). 3) O terceiro período, de 6 a 12 meses. Normalmente, após os seis meses, a imunossupressão é reduzida, começando então a aparecer patógenos comumente encontrados na comunidade. Ex. Pneumonia por pneumococo ou influenza (Rubin et al., 1981; Mocelin et al., 1997).

A infecção é a causa mais comum de febre em receptores de transplante renal (Peterson et al., 1981; Keitel et al.,1997). Além da infecção, outras causas devem ser lembradas, como rejeição, hematoma e trombose venosa pulmonar ou periférica. As características clínicas e epidemiológicas das infecções ajudam na investigação de um diagnóstico diferencial.

As infecções virais nos pacientes transplantados de rim podem ser divididas em dois grupos: 1) As associadas a infecções graves, causadas normalmente por vírus que estão

latentes ou persistentes no indivíduo, mas são reativados após o transplante. Neste grupo, estão os herpesvírus (CMV), os vírus das hepatites B, C e D e os retrovírus. Estes vírus podem ser também transmitidos ao receptor pelo órgão doado ou por transfusão sangüínea. 2) As que são autolimitadas ocorrem esporadicamente na comunidade e podem afetar os pacientes transplantados da mesma forma. Encontram-se neste grupo os myxovirus, paramyxovirus e picornavirus (Mocelin et al., 1997).

É de importância fundamental o conhecimento das infecções virais mais freqüentes nos transplantados e os métodos de diagnóstico destas infecções. Em primeiro lugar, a existência de uma infecção viral pré-existente, por exemplo, Vírus da Imuno Deficiência Humana (HIV) ou hepatite B, poderá influenciar na decisão se determinado paciente poderá ou não receber um determinado órgão. Testes para medir a susceptibilidade a determinados vírus e como preveni-los, determinarão o uso profilático de medicamentos antivirais ou de imunoglobulinas no período pós-transplante. Terapias antivirais já são disponíveis no nosso meio e quanto mais rápido o diagnóstico mais precoce poderá ser o tratamento, beneficiando o transplantado (Schmidt et al., 1991; Goodrich et al., 1991; Gotti et al., 1996; Jong et al., 1998).

1.2 CITOMEGALOVÍRUS (CMV)

1.2.1 Características do vírus

O CMV é um patógeno humano comum, infectando 0.5 a 1.0% de todos os recém-nascidos e mais ou menos 50% da população adulta em países desenvolvidos e 80-100% da população adulta em países em desenvolvimento, como o Brasil. Torna-se um patógeno muito importante em pacientes imunodeprimidos (Jong et al., 1998).

O CMV pertence ao gênero β-Herpes vírus, da família dos Herpesviridae. Sua estrutura é semelhante à de outros Herpesvírus, sendo considerado o maior membro desta família, com 200 nm de diâmetro.

O genoma do CMV é composto por Ácido Desoxirribonucleico DNA de fita dupla, contendo mais ou menos 240 kilobases, que se organizam em uma sequência longa (UL – "Unique Long") e outra curta (US – "Unique Short"), ambas únicas e limitadas por sequências repetitivas terminais. A junção entre os componentes UL e US é composta de sequências repetitivas internas (Mustafa, 1994; Holberg-Petersen, 2000).

O cerne do DNA é circundado por um capsídio icosaédrico, contendo 162 capsômeros. Este é revestido por um envelope composto por glicoproteínas. O espaço entre o envelope e o capsídio é denominado tegumento e contém proteínas virais e enzimas conforme apresentado na figura 1.

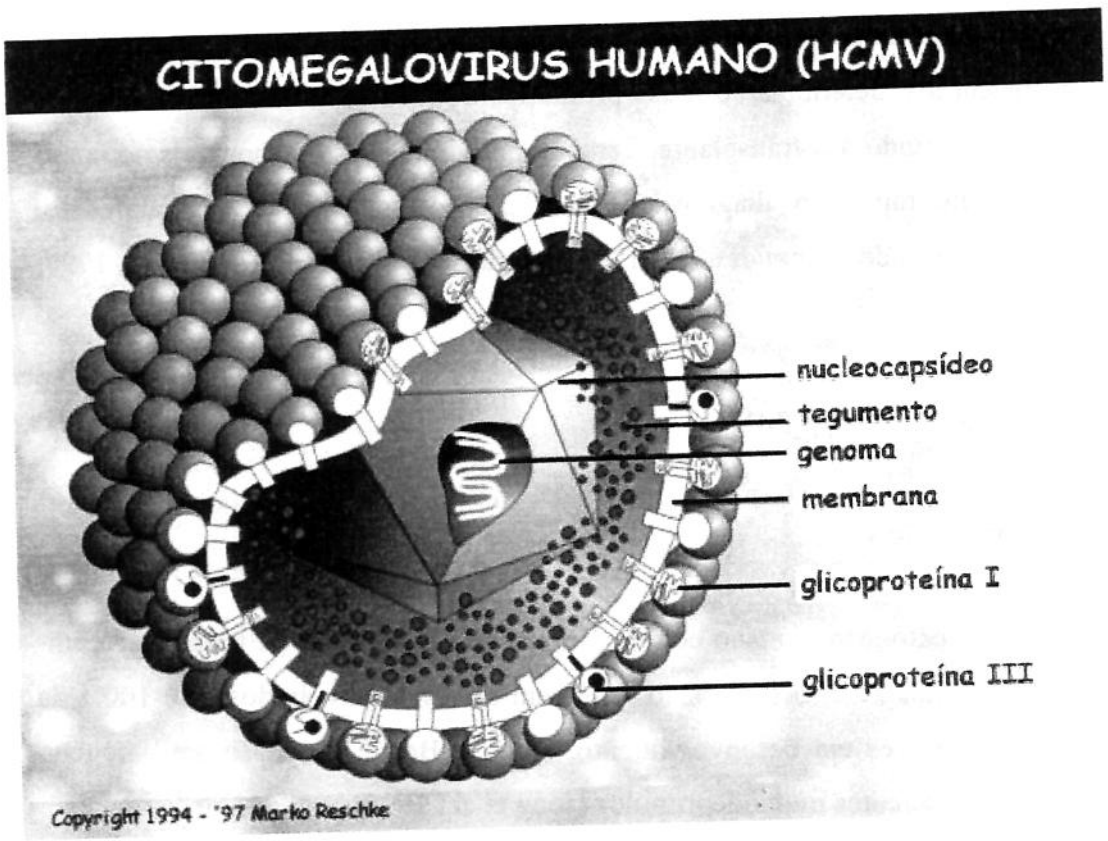


Figura 1 - Estrutura do Citomegalovirus Humano
Fonte: Copidado com permissão do Dr. Reschke, Institut für Virologie, Philipps-Universität, Marburg, Germany.

O CMV tem por característica a replicação lenta em cultura celular e no hospedeiro infectado, no qual pode manter a infecção por períodos prolongados e, após ela, permanecer latente. O genoma viral é transcrito lentamente e o ciclo replicativo pode ser dividido em três períodos, baseados no aparecimento sequencial de classes diferentes de proteínas virais específicas: precoce imediato, precoce e tardio. O período precoce imediato acontece durante as primeiras quatro horas após a infecção, com a transcrição restrita de fragmentos específicos do DNA genômico e a produção de certas proteínas regulatórias, que permitem ao vírus ganhar o controle da síntese de macromoléculas da célula hospedeira. Neste primeiro período são observados os antígenos chamados precoces imediatos, sendo estas proteínas regulatórias de 75, 72 e 68 kD, necessárias para a multiplicação do DNA viral. O período seguinte é o precoce, ele persiste por mais de 24 horas e é caracterizado pela replicação contínua de grande parte do DNA viral. Proteínas necessárias à replicação do genoma, como a DNA polimerase, são sintetizadas nesta fase. O período tardio ocorre de 36 a 48 horas após a infecção. São produzidas, nesta fase, proteínas estruturais do vírus e nela ocorrem a montagem e a liberação dos novos *virions* (Stenberg et al., 1984; Meringan e Resta, 1990; The et al., 1992; Holberg-Petersen, 2000).

O CMV compartilha, com outros herpesvírus, a capacidade de (1) disseminar célula-a-célula na presença de anticorpos circulantes, (2) permanecer em estado latente no hospedeiro, (3) reativar-se em condições de imunossupressão e (4) induzir imunossupressão transitória no receptor.

À entrada no organismo, o CMV infecta linfócitos e leucócitos, sendo dissseminado para todo o organismo nestas células. As células podem ser infectadas com vírus livre ou através da disseminação célula-a-célula. Na maioria dos casos, o vírus multiplica-se sem causar sintomas e estabelece uma infecção latente em monócitos, macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e em tecidos, como os túbulos renais. O vírus pode ser ativado, multiplicar-se e ser eliminado durante longos períodos sem causar sintomas.

O CMV foi isolado da urina, sangue, lavados da garganta, saliva, lágrimas, leite, sêmen, fezes, líquido amniótico, secreções vaginais e cervicais e tecidos retirados para

transplante. As principais formas de transmissão do CMV ocorrem: via congênita, oral e sexual e por transfusão sangüínea ou transplante tecidual órgãos (Jong et al.,1998; Costa et al., 1999; Drago et al., 2000).

1.2.2 Epidemiologia

O CMV, juntamente com os vírus: herpes simples tipos 1 e 2, varicela zoster, Epstein Barr (EBV) e vírus humano B linfotrópico, pertencem à família Herpesviridae. A ocorrência de infecção pelo CMV é descrita em praticamente todas as regiões do mundo. A prevalência de anticorpos contra o CMV, a exemplo do que se observa em outras doenças virais, aumenta com a idade, atingindo níveis máximos após os 25 anos. Existe uma nítida relação entre a prevalência de anticorpos numa determinada população adulta e seu nível socioeconômico. Em populações de alto nível socioeconômico, a prevalência tem variado de 40 a 60%, nos diversos países estudados, enquanto que, em populações de nível socioeconômico mais baixo, ela é maior, variando de 80 a 100% (Pannuti et al., 1987; Ho, 1990; Jong et al., 1998).

Além das várias formas de transmissão natural da infecção (cérvix uterino, sêmem, leite materno, banco de leite, contatos hetero ou homossexuais), o CMV pode ser transmitido iatrogenicamente por tranfusões de sangue (Pannuti et al., 1987) ou transplante de órgãos (Jong et al.,1998; Costa et al., 1994; Drago et al., 2000).

Existem três padrões epidemiológicos da infecção pelo CMV: infecção primária, reativação de infecção pré-existente e reinfecção. Como acontece com outros herpes vírus, a infecção primária pelo CMV é freqüentemente seguida por infecção persistente e (ou) recorrente. Esta última é, em geral, causada pela reativação do vírus latente. A reinfecção também ocorre, provavelmente, devido às características de diversidade antigênica do CMV (Rubin et al., 1979; Drago et al., 2000).

1.2.3 Manifestações clínicas

Na maioria dos casos, a infecção pelo CMV é subclínica. No entanto, sob certas condições específicas, como aquelas encontradas em pacientes com deficiência imunológica ou em crianças com infecções congênitas, a apresentação clínica pode ser grave e, muitas vezes, fatal (Ho, 1990). Entre os pacientes que apresentam elevado risco de contrair doença disseminada pelo CMV, incluem-se aqueles submetidos a transplantes (renal, hepático, coração, coração-pulmão, medula óssea), à quimioterapia antineoplásica, especialmente para tratamento de leucemias e linfomas, e os portadores da Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida (AIDS). O emprego cada vez mais comum de medicamentos imunodepressores constitui um dos fatores que mais tem contribuído para o aumento da ocorrência de infecções por citomegalovírus (Rubin et al., 1977; Tegmeier, 1989).

A maioria das infecções adquiridas pelo CMV são subclínicas ou acompanhadas de manifestações clínicas não características. O quadro clínico destas infecções, quando se expressam clinicamente, é similar ao da mononucleose (mononucleose símile). Ocorre, principalmente, em adultos, caracterizando-se por quadro febril prolongado, astenia, sudorese e hepatoesplenomegalia em cerca de 50% dos casos. Icterícia e exantema podem ser eventualmente observados. Polirradiculoneurite, encefalite, pneumonia intersticial, anemia hemolítica, púrpura trombocitopênica imunológica e miocardite podem ocorrer mais raramente. As enzimas hepáticas (TGO e TGP) costumam encontrar-se elevadas em aproximadamente 80% dos casos (Pannuti et al., 1987; Alfort e Britt, 1990).

Por sua vez, nos pacientes transplantados, nos com AIDS, nos com câncer e em outros grupos de imunocomprometidos, a frequência e gravidade da infecção, bem como a de suas manifestações clínicas, são bastante variáveis. O envolvimento do trato gastrointestinal pelo CMV, que era relativamente raro no passado, vem gradativamente ganhando importância, principalmente nos pacientes com AIDS. O diagnóstico clínico da infecção pelo CMV é difícil de ser firmado e depende, em última análise, de confirmação laboratorial (Jong et al., 1998).

1.2.4 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico precoce da infecção ativa por CMV é importante, uma vez que estudos recentes mostram que o tratamento precoce de uma infecção ativa assintomática reduz efetivamente quadros de pneumonia e morte causados pelo CMV em transplantados renais (Schmidt et al., 1991; Goodrich et al., 1991; Gotti et al., 1996; Jong et al., 1998).

Os métodos sorológicos são frequentemente de valor limitado no diagnóstico da citomegalovirose em transplantados, porque dependem de resposta imunológica humoral adequada. Depender de um teste baseado na produção de anticorpos em pacientes imunossuprimidos não é o ideal. A grande utilidade e aplicação dos métodos sorológicos ocorre na fase de preparação para o transplante. Pacientes que não tiveram contato com o CMV apresentam risco de desenvolver infecções primárias. Pacientes com contato prévio com o vírus desenvolvem infecções secundárias, que podem ser reativações ou reinfecções (The et al., 1994).

Existem vários métodos, descritos na literatura, para isolar o vírus. Classicamente, o vírus pode ser isolado em cultura de células de fibroblastos humanos, mas este método é demorado, podendo levar até 28 dias para produzir o efeito citopático característico (Farrugia e Schwab, 1992). Outros métodos de detecção do CMV podem dar um diagnóstico mais rápido, tais como 1) a reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método de biologia molecular que permite a produção de grande quantidade de fragmentos específicos de DNA a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas na amostra (Demmler et al.,1988; Shibata et al., 1988); 2) detecção de CMV em cultura de células infectadas no perídodo de 24 a 48 horas (Griffiths et al., 1984); 3) a detecção direta do antígeno-CMV em leucócitos de sangue periférico (Antigenemia) ou em amostras de biópsias obtidas por aspiração com agulha fina tem se mostrado confiável e com uma alta correlação com doença por CMV (van der Bij et al., 1988a; van der Bij et al., 1988b).

A célula infectada pelo CMV sintetiza precocemente o antígeno pp65. Este antígeno detecta-se em grandes quantidades após 48 a 72 horas após a infecção. *In vivo*, o antígeno

pp65 é a proteína viral dominante que se pode detectar nos leucócitos de sangue periférico durante as infecções ativas (Grefte et al., 1992).

Em citocentrifugados de leucócitos, pode-se detectar a presença de antígenos pp65 mediante procedimentos imunocitológicos. O antígeno localiza-se preferencialmente nos núcleos dos granulócitos. As células mononucleares raramente são positivas para o antígeno pp65. O número de leucócitos positivos para pp65 pode variar de 1 a 100 x 10^5 leucócitos positivos em infecções sintomáticas. Na infecção ativa (pacientes sintomáticos e assintomáticos), a especificidade e sensibilidade é de aproximadamente 90% (van der Bij et al., 1988b; van den Berg et al., 1989).

Nos últimos anos, a antigenemia tem demonstrado uma eficácia extraordinátia no diagnóstico precoce de infecções ativas pelo CMV (The et al., 1992). É um teste rápido, sensível e específico (Gotti et al., 1996) e altamente adequado para receptores de órgãos por não ser dependente de uma resposta imune (Grossi et al., 1995). Em geral, o procedimento permite realizar um diagnóstico precoce antes do aparecimento dos sintomas clínicos, possibilitando uma intervenção profilática ou terapêutica em pacientes de risco (Schröeder et al., 1999).

A evolução típica de uma infecção ativa pelo CMV em pacientes imunodeprimidos caracteriza-se por uma fase de antigenemia com a presença da proteína pp65 em leucócitos, que pode durar algumas semanas e que, em infecções sintomáticas, inicia-se antes do surgimento dos sintomas clínicos. À medida que a enfermidade evolui, não existe a formação de anticorpos até o aparecimento dos sintomas clínicos e, em alguns casos isolados, pode não ocorrer a soroconversão em conseqüência da imunodepressão (Drago et al., 2000).

A implantação de um programa semanal de detecção do vírus seja por antigenemia ou PCR, durante os primeiros três meses pós-transplante, é de grande valia. Ambos os testes são capazes de detectar a presença de infecção ativa antes do aparecimento da doença

por CMV, permitindo, assim, o início de um tratamento antiviral precoce (The et al., 1992; Jong et al.,1998).

1.3 SISTEMA IMUNE

1.3.1 Citometria de Fluxo

No início dos anos 80, com a introdução do Citômetro de Fluxo nos laboratórios de análises clínicas e o desenvolvimento da indústria dos anticorpos monoclonais, o estudo das diversas propriedades fisico-químicas e biológicas das células, entre elas os linfócitos, recebeu um novo impulso. O citômetro de fluxo é capaz de examinar propriedades de uma célula isoladamente (Shapiro, 1995). O advento de anticorpos monoclonais específicos para a determinação de subpopulações linfocitárias tem permitido a monitorização imunológica de células de sangue periférico numa grande variedade de condições, incluindo transplantes (Ramos et al., 1989).

Uma suspensão de células é isolada do sangue ou de outros tecidos e marcada com anticorpos fluorescentes. As células a serem analisadas são forçadas sob pressão através de um capilar, envolvidas por um jato de solução isotônica, sendo interceptadas, uma a uma, por uma fonte luminosa monocromática de um laser e monitorizadas por um detector de luz emitida que gera informações sobre diferenças morfológicas e estruturais das partículas contidas neste fluxo. Características fisicas como tamanho, volume, índice de refração, viscosidade e características químicas como a presença ou ausência de RNA ou DNA, moléculas de superfície da membrana, podem ser detectadas (Shapiro, 1995).

Todos os sinais luminosos que transmitem distintos tipos de informações de cada célula – absorção, dispersão da luz e intensidade das emissões fluorescentes – são convertidos em impulsos elétricos (ou sinais analógicos), amplificados e transformados em códigos digitais que serão analisados por um microprocessador. Um histograma é produzido entre células marcadas e não marcadas. Células maiores ou menores que os linfócitos podem ser excluídas eletronicamente da análise, concentrando-se somente na

observação dos linfócitos (McCoy, 1994; Stites e col., 1994 e Shapiro, 1995). Com o citômetro de fluxo, uma suspensão de células pode ser analisada numa velocidade de 5.000 células por segundo, através da combinação de um dispersor de luz, um medidor de volume e a associação dos anticorpos monoclonais marcados. Assim subpopulações celulares podem ser facilmente identificadas (Orfao e Ruiz-Arguelles, 1992; Stites et al., 1994) (Fig. 2).

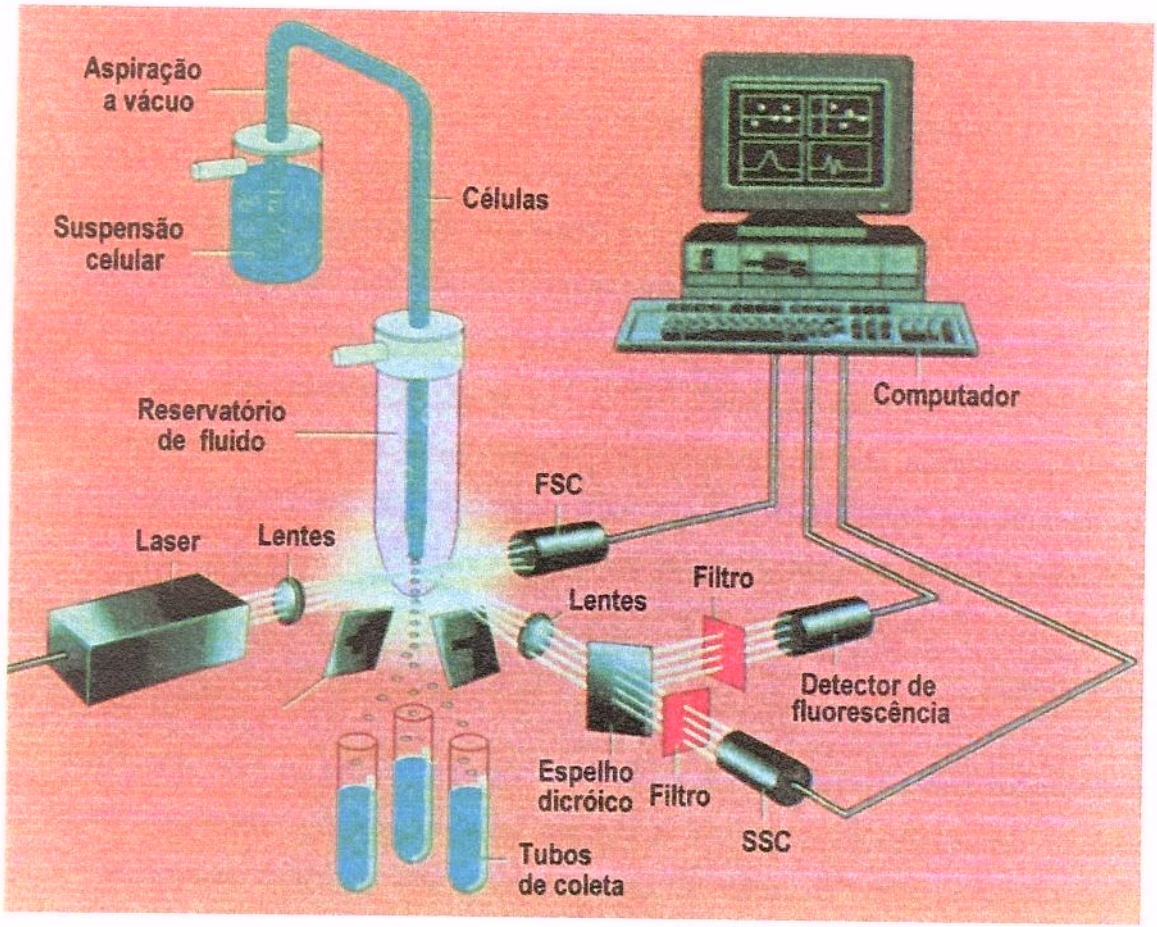


Figura 2 - Citometria de Fluxo
Fonte: Pesquisadora

Em 1975, é dado um grande passo na imunologia com o desenvolvimento da técnica dos anticorpos monoclonais por Milstein e Köhler, que permitiu a identificação dos vários grupamentos de células imunes e de suas etapas de ativação através de suas próprias

moléculas de superfície, que podiam ser reconhecidas pelos anticorpos desenvolvidos por esta técnica (Köhler e Milstein, 1975).

Linfócitos e outros leucócitos expressam um grande número de moléculas diferentes em suas membranas, que podem ser utilizadas como marcadores para distinguir várias de suas subpopulações. Estas moléculas de superfície (marcadores) podem ser reconhecidas pelos anticorpos monoclonais (Cosomi et al., 1981).

Diferentes moléculas podem ser características de linhagens específicas (marcadores de linhagem) ou de estágios de maturação celular (marcadores de maturação) e há, ainda, alguns marcadores que aparecem apenas após a ativação por um estímulo (marcadores de ativação). Assim, um marcador de superfície que identifique uma linhagem ou um estágio de diferenciação particular, tendo uma estrutura definida e que seja reconhecido por um grupo ("cluster") de anticorpos monoclonais é denominado "membro" do grupo de diferenciação ("Cluster de Diferenciação" – CD). Um grupo de diferenciação define-se caracterizando a molécula que o constitui. Esta caracterização deve incluir a natureza bioquímica da molécula, seu tamanho, sua estrutura e sua expressão nos vários estágios de sua diferenciação (Stites et al., 1994; Abbas et al., 1997).

1.3.2 Linfócitos

Os linfócitos T originam-se da maturação de células primordiais no timo. As células T adquirem os marcadores de superfície (CD) que caracterizam seu amadurecimento, próximo da 14ª semana de gestação. Estes marcadores são proteínas ancoradas na membrana da célula e cada um deles apresenta uma ou mais funções, sendo que a maior parte deles funciona como receptores. Algumas destas moléculas aparecem em estágios particulares de diferenciação celular, quando ativadas, ou ainda com características de linhagens celulares diferentes entre si. A figura 3 apresenta a ontogenia dos linfócitos T, desde a sua formação a partir de células primordiais na medula óssea até a sua fase final de diferenciação no sangue periférico.

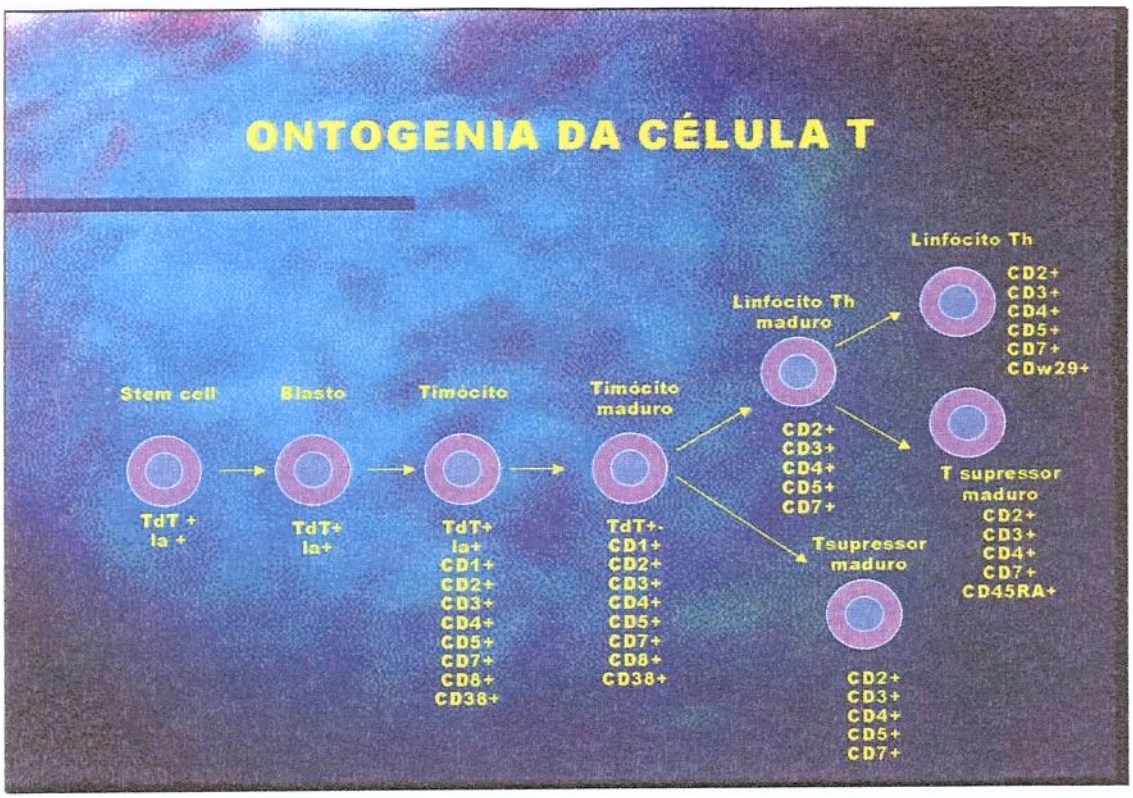


Figura 3 - Ontogenia das Células T
Fonte: Pesquisadora

As células que apresentam receptor de célula T (RCT) e expressam o marcador CD3 dividem-se em duas populações distintas. Uma é caracterizada pela presença do marcador de superfície CD4 e a outra pela presença do marcador CD8. As células T CD4+ agem predominantemente como células T auxiliares (Th – "helper"), enquanto as células T CD8+ agem como células T citotóxicas (LTCs). A presença das moléculas CD4 dirige o reconhecimento antigênico do linfócito T apenas aos peptídios antigênicos associados às moléculas HLA (Antígeno Leucocitário Humano) de classe II, ao passo que a presença de CD8 orienta este reconhecimento apenas aos antígenos associados às moléculas HLA de classe I (Fig. 4).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

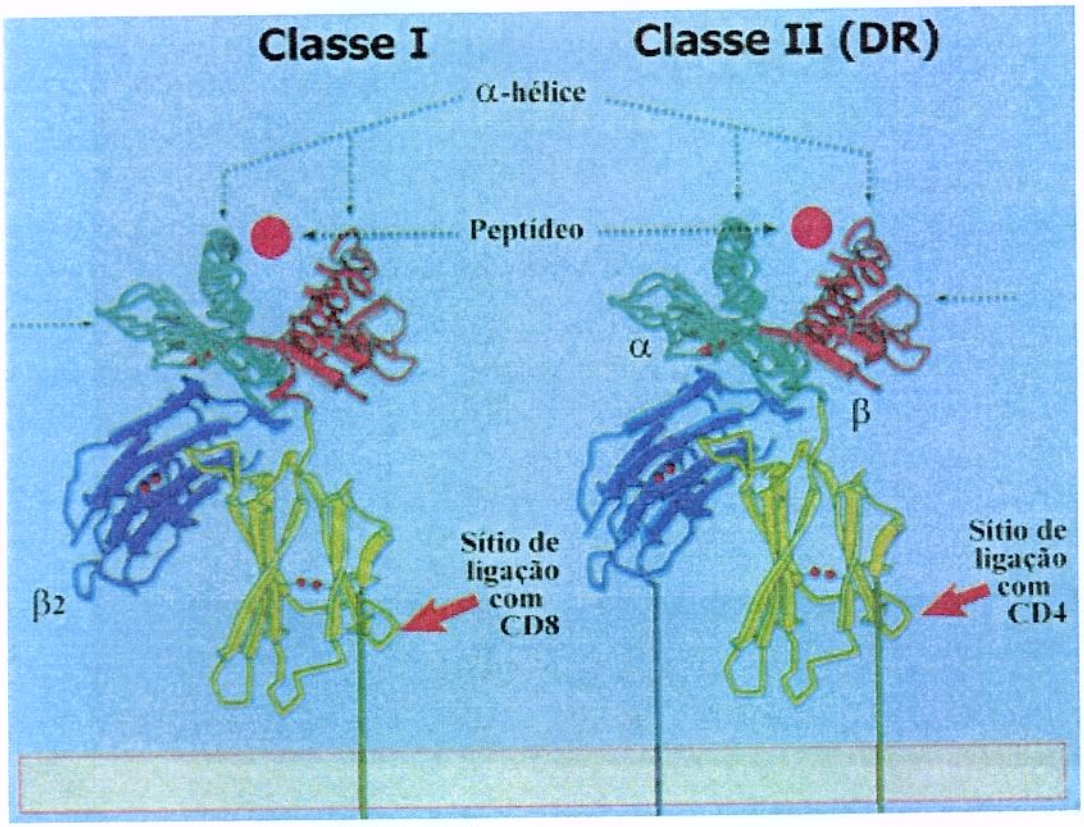


Figura 4 - Representação tridimensional das moléculas HLA de classe I e II e os respectivos sítios de ligação com o CD8 e o CD4
Fonte: Pesquisadora

A ativação dos linfócitos T altera o fenótipo da célula. A expressão de novos marcadores de superfície celular é induzida, alguns marcadores são perdidos e a concentração de outros pode aumentar ou diminuir. Assim o fenótipo das células T pode refletir o estágio de diferenciação ou ativação da célula. Como exemplo, podemos citar a molécula de HLA-DR presente em linfócitos T somente em situações de ativação.

As funções detectáveis da célula T aparecem nos linfócitos de sangue periférico próximo do nascimento.

Os linfócitos B, por sua vez, surgem a partir de uma célula primordial comum, derivada de uma célula primordial pluripotente. Durante os estágios iniciais de maturação, estas células rearranjam primeiro os genes de cadeia pesada das imunoglobulinas e, a seguir, os genes de cadeias leves. As células pré-B são células grandes que se dividem rapidamente e contêm cadeias μ citoplasmáticas, mas não apresentam cadeias leves nem imunoglobulinas de superfície. O marcador CD19 aparece já numa fase bem precoce da diferenciação de células B, permanecendo até a fase final de diferenciação. Com o seguimento da maturação, surgem células pré-B, menores, que expressam inicialmente cadeias leves citoplasmáticas e, finalmente, imunoglobulinas de superfície, responsávies pelas ligações com antígenos e conseqüente ativação celular. Neste estágio, as células migram da medula óssea para o sangue e tecidos linfóides periféricos. Uma dada célula B expressa uma única especificidade em seus anticorpos ao longo de sua existência, mas pode mudar de isotipo por recombinação somática (Castro et al., 1997).

Após a interação com o antígeno, as células B são ativadas e amadurecem em plasmócitos, que são as células responsáveis pela produção de grandes quantidades de imunoglobulina. Além de plasmócitos são geradas células B de memória. Estas são as células responsáveis pela rápida resposta anamnéstica observada após a reexposição a antígenos previamente reconhecidos pelo sistema imune. A figura 5 apresenta a ontogenia dos linfócitos B desde a sua formação a partir de células primordiais na medula óssea até a sua fase final no sangue periférico.

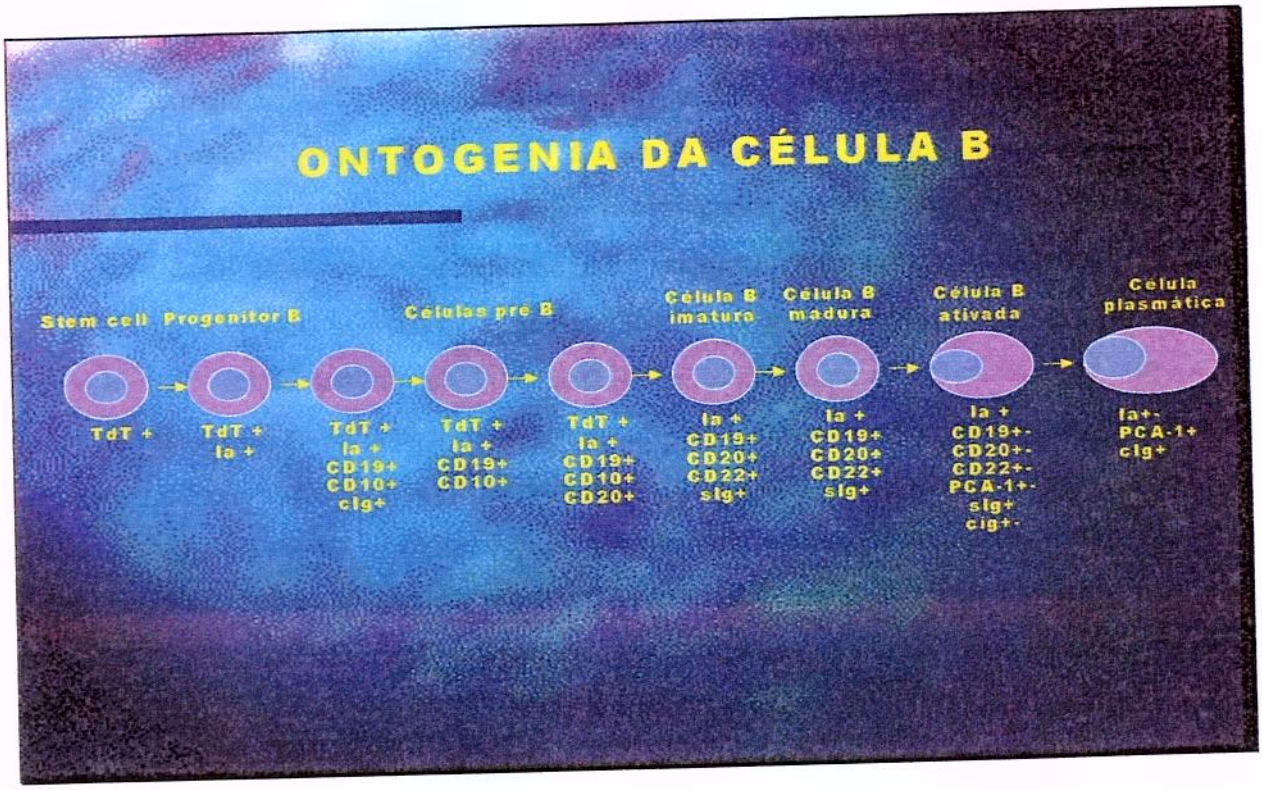


Figura 5 - Ontogenia da Célula B
Fonte: Pesquisadora

As células Natural Killers (NK) são uma subpopulação de linfócitos encontradas no sangue e tecidos linfóides, especialmente no baço. São derivadas da medula óssea e apresentam-se como linfócitos grandes com numerosos grânulos citoplasmáticos, sendo por isto, muitas vezes, denominadas Linfócitos Grandes e Granulares (LGLs). As células NK possuem a habilidade de matar certas células tumorais e células normais infectadas por vírus. As células NK não são específicas para um determinante antigênico particular do vírus e não são restritas a moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH). Esta morte não é induzida por um antígeno específico, pertencendo mais à imunidade natural do que à específica. Embora a capacidade lítica das células NK seja maior do que a dos linfócitos T citotóxicos (LTCs) ela não é ao acaso. As células NK podem lisar alguns tipos de células normais infectadas por alguns vírus e não outras, e não irão lisar células não infectadas (Moretta et al., 1996).

Fenotipicamente e quanto à linhagem, as células NK não são células T nem células B. As células NK não passam pelo processo de maturação no timo e podem proliferar em animais que perderam este órgão. Elas não sofrem rearranjo gênico de imunoglobulina (Ig) nem de RCT e não expressam móleculas CD3 em sua superfície. As células NK expressam moléculas CD2, um receptor de baixa afinidade para porção Fc da IgG chamado FcγRIII ou CD16 e CD56, este último aumenta sua densidade antigênica quando células NK são ativadas. As células NK podem ser induzidas a se proliferarem e secretar citocinas pela ligação cruzada tanto com CD2 ou CD16. Sob este aspecto, apesar das células NK não expressarem CD3, elas expressam homodímeros de cadeia ζ idênticos a aqueles associados com o complexo RCT nas células T que sofrem restrição ao CPH (Hercend et. al., 1985; Lanier et al., 1986).

Recentemente, foi descrito o mecanismo de reconhecimento das células infectadas por vírus, pela célula NK: As células NK humanas expressam proteínas que pertencem à família das imunoglobulinas, que contêm de dois a três domínios na região extracelular. Células NK individuais expressam 1 ou mais destes receptores. Cada receptor reconhece uma série alélica específica de molécula do CPH de classe I (HLA-B ou C) complexado com peptídeos derivados de proteínas próprias. Dois grupos de receptores foram descritos: o primeiro grupo são receptores inibitórios e o segundo grupo são receptores ativadores. A maioria dos receptores são inibitórios, ativando uma tirosina fosfatase que impede a resposta lítica da célula NK. Conseqüentemente, a ativação das células NK acontece quando uma célula alvo não é capaz de se ligar ao receptor inibitório. Logo a célula NK reconhece a ausência de um peptídeo próprio apresentado por formas alélicas de moléculas do CPH de classe I (Moretta et al., 1996).

Uma vez que alguns vírus podem alterar a expressão de proteínas de classe I e assim escapar da supervisão de células T, as células NK possuem uma função importante na defesa do hospedeiro através da eliminação de células MHC-negativas (Moretta et al., 1996).

O papel das células NK, ainda, não foi totalmente estabelecido. Os raros indivíduos deficientes de células NK parecem ser mais suscetíveis a infecções virais Acredita-se que as células NK lisam as células alvo infectadas por vírus durante os primeiros dias de infecção, ou seja, o tempo necessário para que ocorra a diferenciação de linfócitos T citotóxicos (Herberman et al., 1986; Trinchieri, 1989; Versteeg, 1992; Castro e col., 1997).

Parte da dificuldade em identificar a estrutura alvo da célula NK começa na possibilidade das células NK serem heterogêneas, ou seja, diferentes populações de células NK reconheceriam diferentes classes de moléculas e diferentes tipos de células alvo (Moretta et al., 1997; Abbas, 1997).

Diferente do que acontece com os LTCs, as células NK não parecem necessitar de um contato anterior com o antígeno para desenvolver sua capacidade citolítica. As células NK podem aumentar sua capacidade de lisar células alvo na presença de Interferon (IFN) tipo I, IFN-γ, IL-2 ou IL-12 e Fator de Necrose Tumoral (TNF). As células NK são as principais mediadoras das reações de citotoxicidade mediadas por anticorpos, onde elas podem adquirir especificidade adicional pelo reconhecimento, mediado por CD16, de alvos já reconhecidos por anticorpos de classe IgG (Castro e col.,1997).

O mecanismo de morte da célula alvo causado pelas células NK é o mesmo mecanismo que acontece com os LTCs, chamado exocitose granular e indução da fragmentação do DNA da célula alvo e apoptose. As células NK possuem grânulos que contêm proteínas formadoras de poros, citotoxinas, esterases e proteoglicanos. Não se sabe se a apoptose induzida por células NK é a mesma ou não da produzida por LTCs. As células NK são ativadas por citocinas produzidas por células T CD4+. Em resposta a altos níveis de IL-2, as células NK diferenciam-se em células matadoras ativadas por linfocinas (LAK) que possuem uma capacidade citolítica aumentada (Castro e col., 1997).

1.4 IMUNIDADE AOS VÍRUS

Os vírus são, obrigatoriamente, microorganismos intracelulares. Desencadeiam diferentes tipos de respostas imunes no hospedeiro, que podem ser relacionadas à imunidade inata ou à específica (Castro e col., 1997).

Existem dois mecanismos principais envolvidos na imunidade inata aos vírus: 1) a infecção viral estimula diretamente a produção de IFN tipo I que inibe a replicação viral e 2) células (NK) reconhecem e lisam as células infectadas nas quais os vírus inibiram a apresentação de antígenos e a expressão de moléculas do CPH de classe I. As células NK são um dos principais mecanismos da imunidade contra vírus antes que uma resposta específica seja desencadeada (Castro e col., 1997; ABBAS, 1997).

A imunidade específica contra as infecções virais é mediada por uma combinação de mecanismos humorais e celulares. Anticorpos específicos são importantes na defesa contra vírus em dois momentos: na fase inicial da infecção, são efetivos antes que o organismo entre na célula, ou evitando a disseminação de célula para célula. No entanto, vírus que ficam latentes são inacessíveis aos anticorpos (ABBAS, 1997).

O principal mecanismo da imunidade específica contra uma infecção viral estabelecida são os linfócitos T citotóxicos. A maioria dos LTCs específicos são células CD8+ que reconhecem, na superfície da célula, o CPH de classe I associado a antígenos virais que foram processados e degradados no citossol. A completa diferenciaçao dos LTCs CD8+ necessita de citocinas produzidas pelos linfócitos Th CD4+. Assim, tanto os anticorpos como os LTCs trabalham em cooperação para proteger o hospedeiro contra os vírus. Os anticorpos bloqueando a ligação e entrada do vírus na célula e os LTCs inibindo a replicação viral, lisando a célula infectada através da introdução de enzimas que degradam o genoma viral e secretando citocinas com atividade interferon (ABBAS, 1997) (Fig.6).

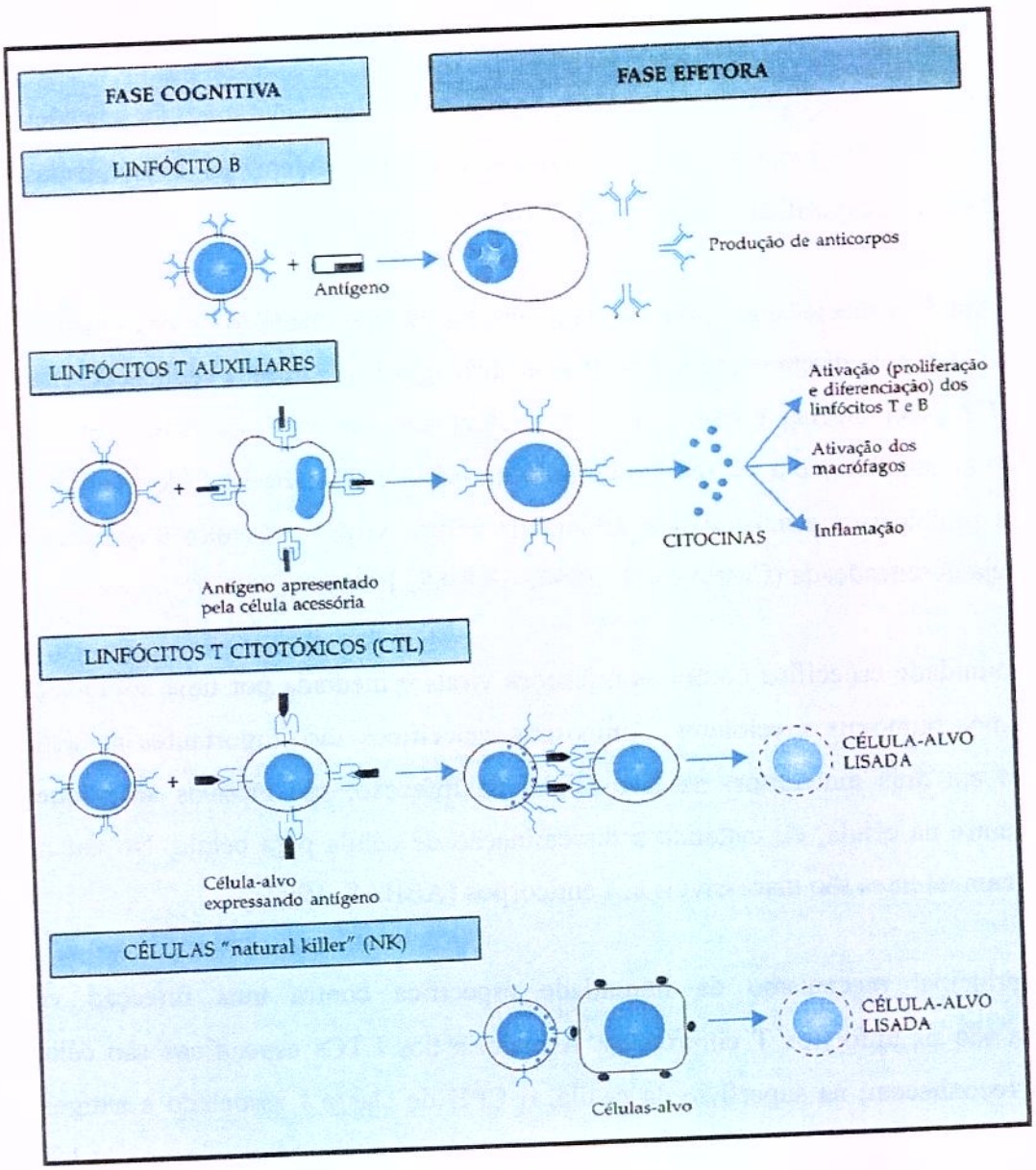


Figura 6 - Subpopulações linfocitárias
Linfócitos B reconhecem antígenos solúveis e evoluem para células produtoras de anticorpos. Linfócitos T auxiliares reconhecem antígenos na superfície de células apresentadoras de antígenos e secretam citocinas, as quais estimulam diferentes componentes da imunidade. Linfócitos T citotóxicos reconhecem antígenos na célula-alvo e as lisam. Células NK usam receptores específicos para reconhecer e lisar alvos. Fonte: Castro et al. (1997)

1.5 INFECÇÃO POR CMV EM TRANSPLANTADOS RENAIS

O CMV é o agente infeccioso mais frequente que afeta receptores de transplantes. Em países em desenvolvimento, como o Brasil, aproximadamente 80 a 100% dos pacientes em lista de espera para transplante foram infectados no passado e possuem anticorpos contra o CMV da classe IgG. Dependendo do estado sorológico do doador/receptor e do tipo de imunossupressão utilizado, 60% a 100% dos transplantados renais apresentam infecção ativa por CMV (Ho et al., 1975; Pass, et al., 1978; Peterson et al., 1980; Pollard, 1988) que se manifesta, na maioria dos casos, nos primeiros quatro meses após o transplante (Craihead et al., 1967; Fiala et al., 1975, Morris,1994; Gotti et al., 1996; Jong et al., 1998; Costa et al.,1999).

A infecção ativa por CMV em receptores de rim é, freqüentemente, pouco sintomática, mas pode ser grave ou mesmo fatal. A infecção primária ocorre em pacientes soronegativos e a infecção secundária ocorre em pacientes soropositivos por uma reativação do vírus do próprio paciente ou por uma reinfecção. Diversos fatores contribuem na incidência da doença por CMV no período pós-transplante, que pode variar de 20% a 60% (Fryd et al., 1980; Smiley et al., 1985; Singh et al., 1988).

As infecções primárias estão associadas com 60% de morbidade em pacientes transplantados de rim. Embora as infecções secundárias sejam, normalmente, pouco sintomáticas, quando ocorre doença por CMV, ela costuma ser mais grave em receptores de rins soropositivos. A gravidade da infecção está diretamente relacionada ao nível de imunossupressão a que o paciente é submetido; a adição de globulina antitimócito (ATG) ou globulina antilinfócito T (OKT3) aos protocolos de imunossupressão tem aumentado esta gravidade (Rubin et al., 1981; Chou e Norman, 1985; Guerin et al., 1988; Versteeg, 1992; Jong et al., 1998).

Tanto as interações imunológicas do receptor com o rim transplantado como a terapia imunossupressora necessária para manter o enxerto funcionante podem ativar o CMV latente. Atualmente, para evitar a rejeição do enxerto, usa-se como

imunossupressores uma combinação de corticosteróides, azatioprina e ciclosporina. Pacientes em regimes de altas doses de imunossupressão e com doença por CMV, apresentam uma redução significativa na sobrevida do enxerto em 1 ano, comparados com aqueles que não apresentam doença. As terapias para tratar episódios de rejeição também aumentam o risco de desenvolvimento de doença grave por CMV (Fryd et al., 1980; Portela et al., 1995).

A infecção por CMV compromete a resposta imune: 1- Possui um efeito imunossupressor, que pode ser devido à redução da produção de interleucina-1 (Kapasi e Rice, 1988) e está relatada uma inversão da relação CD4/CD8. Isto aumenta o risco de outras infecções oportunistas, especialmente por fungos (Grattan et al., 1989; Drago et al., 2000). 2- Possui um efeito imunoestimulador por aumentar a expressão de antígenos de superfície nas células infectadas, aumentando a expressão de moléculas do CPH de classe II nas células CD8 (Van Es et al., 1984) e moléculas do CPH de classe I e classe II nas células do rim (Von Willebrand et al., 1986). Este último estudo sugere que o aumento da expressão destas moléculas nas células renais pode aumentar os episódios de rejeição no enxerto.

As manifestações clínicas atribuíveis a uma infecção sintomática por CMV (doença) são: febre entre 4 a 10 semanas após o transplante, e/ou leucopenia, e/ou trombocitopenia e/ou linfócitos atípicos nesta fase. Alguns dias após a febre, surge um aumento nos níveis séricos da aspartato aminotransferase e o aparecimento de sintomas respiratórios, dispnéia, com alteração dos gases sanguíneos (hipoxemia). Podem ocorrer, também, em menor frequência, artralgias, franca hepatite, esplenomegalia, mialgias, ulcerações gastrointestinais com sangramento e encefalites. A febre pode persistir por um mês ou mais, sendo que a maioria dos pacientes recuperam-se. Aproximadamente, 2% desenvolvem uma doença fatal disseminada. A causa usual de morte, por doença causada por CMV, é pneumonia grave, que, muitas vezes é acompanhada por ulcerações gastrointestinais e hemorragia (Simmons et al., 1977; Warrell et al., 1980; Drago et al., 2000).

A maioria dos transplantados renais, em países em desenvolvimento, apresenta anticorpos da classe IgG contra o CMV, detectáveis antes do transplante, estando, portanto, infectados por este vírus. Após o transplante, esses pacientes costumam apresentar infecção ativa, ou seja, o CMV encontra-se replicando e circulando no organismo. Tal fato deve-se, em grande parte, à reativação do CMV latente endógeno.

A infecção ativa após o transplante acontece, geralmente, entre o primeiro e o sexto mês, entretanto, as manifestações clínicas da citomegalovirose ocorrem, mais comumente, de 1 a 3 meses após o implante do enxerto (Peterson et al., 1980; Gotti et al., 1996; Drago et al., 2000).

Tanto a resposta celular como a humoral são importantes no controle da infecção pelo CMV e para manter a sua latência. Alguns mecanismos foram descritos para que o CMV escape ao controle do sistema imune: 1) as células humanas infectadas pelo CMV são resistentes a lise pelas células NK através da expressão em sua superfície de moléculas semelhantes a moléculas do MHC de classe I; 2) o CMV remove moléculas do CPH de classe I recentemente sintetizadas no retículo endoplasmático e aparentemente as deposita no citoplasma, onde elas não serão funcionais, resultando numa redução na expressão destas moléculas e na impossibilidade desta célula ser lisada por LTCs; 3) o CMV inibe a expressão de moléculas do CPH de classe II, através da degradação das mesmas, impedindo uma resposta dos linfócitos Th (Riddell e Greenberg, 1997; Riddell e Greenberg, 2000; Holberg-Petersen, 2000; Farrell et al., 2000).

1.6 CMV X CÉLULAS NK X SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS

A importância da imunidade celular no controle da infecção ou reativação do CMV é evidente pelo fato de que o desenvolvimento de doença grave está quase sempre associado a indivíduos que possuem a imunidade celular comprometida. Esta imunidade celular envolve a resposta de LTCs e linfócitos Th. Em receptores de órgãos e pacientes soropositivos para o HIV, o desenvolvimento de doença, por exemplo, pneumonias ou

retinites, está claramente correlacionado com a diminuição ou ausência de uma resposta CMV-específica de LTCs e linfócitos Th (Jong et al., 1998; Riddell e Greenberg, 2000).

A utilização da monitorização imunofenotípica de subpopulações de células T, durante a infecção por CMV, ainda não foi claramente definida na era da ciclosporina. Torna-se difícil encontrar diferenças significativas na contagem destas células entre uma fase de repouso e uma fase ativa de rejeição ou infecção. Além disso, muitos trabalhos foram realizados somente durante o período ativo e não possuem parâmetros anteriores ao episódio de infecção (Takahara et al., 1989). Alguns trabalhos indicam que este tipo de análise pode ser útil para prever uma recaída da infecção, após um tratamento antiviral (Van den Berg et al., 1993a) e mostram que estudos longitudinais podem refletir melhor o perfil de cada paciente, eliminando grandes variações, tais como histocompatibilidade do doador-receptor, sistema imune e idade do hospedeiro (Ramos et al., 1989).

Modelos murinos e observações em humanos têm mostrado que LTCs e células NK exercem um papel fundamental na recuperação da infecção por CMV. Embora, pouco se saiba sobre os mecanismos envolvidos, a deficiência de células NK foi associada com infecção primária grave aos herpes vírus, incluindo o CMV, assim como a atividade da mesma está diminuída em pacientes transplantados renais com doença grave ao CMV, comparados com aqueles que tiveram infecção leve ou assintomática (Rook et al., 1984; Bukowski et al., 1984; Reddehase et al., 1985; Bukowski et al., 1985; Biron et al., 1989; Reusser et al., 1991; Aguado et al., 1995).

Venema et al. (1994) demonstraram que apenas a análise por citometria de fluxo de subpopulações linfocitárias pode ser suficiente para acompanhar a evolução da infecção por CMV de pacientes imunossuprimidos, sem a necessidade de testes mais elaborados como a atividade das células NK que requerem maior disponibilidade de tempo, espaço e têm custo elevado. O método de quantificação da atividade da células NK baseia-se na medida da liberação de cromo radioativo (^{51}Cr). O ^{51}Cr, sendo um metal radioativo, liga-se a proteínas intracelulares e é usado na ligação a células alvo. As células alvo usadas nestes ensaios são as células K562. A liberação de proteínas intracelulares ocorre rapidamente quando

acontece a lise de células alvo e a quantidade de metal liberado é diretamente proporcional à quantidade de células lisadas. A medida da liberação de ^{51}Cr permitiu a descoberta de vários tipos de linfócitos com atividade citolítica entre eles os LTCs e as células NK.

A correlação entre a atividade das células NK e o número das mesmas foi demonstrado ser estatisticamente significativo, apesar da medida da lise celular variar substancialmente para um dado número absoluto de células NK ativadas. A partir destes resultados, foi sugerido que o número absoluto de células NK, em alguns casos, estimaria melhor uma reatividade imune à infecção por CMV do que a medida funcional das mesmas (Venema et al., 1994).

Van den Berg et al. (1992) demonstraram que a melhora espontânea da infecção primária por CMV coincide com um aumento marcante do número de linfócitos CD56+ em sangue periférico, que expressam o marcador de ativação HLA-DR. Tal aumento não ocorreu em pacientes com doença progressiva e risco de vida.

Enquanto a imunidade celular já está bem caracterizada na infecção pelo CMV, outros estudos têm demonstrado evidências da importância da imunidade humoral na prevenção ou modulação da doença pelo CMV. Estudos em animais sugerem que muito mais do que controlar a infecção, a imunidade humoral parece atuar na remoção e redução da disseminação do vírus (Jonjic et al., 1994).

Considerando-se a importância das infecções após os transplantes renais em nosso meio, em particular as atribuíveis ao CMV, torna-se cada vez mais necessário um diagnóstico sensível, específico e rápido destas infecções no sentido de aumentar a sobrevida do enxerto e do paciente. Paralelamente ao diagnóstico, é de fundamental importância o prognóstico desta infecção viral, pois a agressividade do tratamento depende deste fator, correlacionando-se diretamente com a sobrevida tanto do enxerto como do paciente. Principalmente, nas infecções em imunossuprimidos, os novos conhecimentos nesta área podem propiciar importantes avanços na monitorização destes pacientes. Deste modo, a correlação entre as subpopulações linfocitárias e a infecção pelo CMV pode

acrescentar mais um subsídio no sentido de fornecer informações diagnósticas e prognósticas a este grupo de indivíduos.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Devido ao exposto sobre a infecção pelo CMV em transplantados renais, os objetivos deste trabalho foram:

1. Estudar prospectivamente um grupo de transplantados renais em seguimento na Santa Casa de Porto Alegre e determinar a incidência de infecção ativa e da doença por CMV pelo método de antigenemia.

2. Determinar as subpopulações linfocitárias, através das quantificações de células CD3+ (linfócitos T totais), CD3+CD4+ (linfócitos Th), CD3+CD8+ (LTCs), CD19+ (linfócitos B) e CD3+HLA-DR+ (linfócitos T ativados) e CD (16+56)+ (células NK) nos transplantados renais aqui estudados, traçando os perfis de sua evolução e correlacionando estes resultados com presença ou ausência de provável doença por CMV.

Casuística e Métodos

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foram estudados prospectivamente 61 pacientes submetidos a transplante renal no Serviço de Nefrologia da Santa Casa de Porto Alegre, de janeiro a dezembro de 1996. Destes, 26 (42,6%) pertenciam ao sexo feminino e 35 (57,4%) ao sexo masculino. A idade dos pacientes variou de 15 a 68 anos, tendo como média 39 anos. Quanto ao tipo de transplante, 40 (65,6%) receberam rim de doador cadáver e 21 (34,4%) de doador vivo relacionado. Entre os receptores de rim, 90,2% (55/61) eram soropositivos para o CMV e 9,8% (6/61) eram soronegativos no dia do transplante. Entre os doadores, 71,1% (32/45) eram soropositivos para o CMV e 2,22% (1/45) eram soronegativos. Nos 26,7% (12/45) remanescentes, a sorologia não pode ser determinada. Estes dados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Características gerais dos transplantados renais participantes do estudo (sexo, idade, tipo de transplante, imunossupressão realizada para episódios de rejeição e sorologia do doador e receptor para CMV, pré-transplante.

Paciente (receptor)	Sexo	Idade	Transplante		Imunossupressão p/ rejeição	Sorologia Doador/Receptor pré-tx
			Data	Tipo	solumedrol(g)	ELISA
1 GT	M	39	11/01/96	C	3,0	+/+
2 RS	M	37	11/01/96	C	3,0	+/+
3 AT	M	68	21/01/96	C	0	ND/+
4 SP	F	55	21/01/96	C	1,5	ND/+
5 JK	M	43	30/01/96	C	2,5	ND/-
6 VK	M	48	30/01/96	C	0	ND/+
7 JD	F	65	06/02/96	V	0	+/+
8 JV	M	39	13/02/96	V	3,5	+/+
9 CM	F	23	22/02/96	C	3,0	ND/+
10 LF	M	34	29/02/96	C	2,75	+/+
11 CR	F	26	29/02/96	C	2,0 + OKT3	+/+
12 MR	F	25	05/03/96	V	0	ND/+
13 CM	F	26	13/03/96	C	0	ND/+
14 LM	M	60	14/03/96	C	1,75	ND/+
15 AM	F	28	02/04/96	V	3,0	+/+
16 OP	F	67	13/04/96	C	2,25	+/+
17 MD	F	33	14/04/96	C	1,875	+/+
18 JM	M	46	17/04/96	C	3,75	ND/+
19 EC	M	38	17/04/96	C	3,0	ND/+
20 FN	M	53	22/04/96	C	2,25	+/+
21 IC	F	25	22/04/96	C	3,75	+/+
22 AV	M	28	07/05/96	V	1,75	+/-
23 JX	M	37	09/05/96	V	4,75	+/+
24 MS	F	34	21/05/96	V	3,5 + OKT3	+/+
25 AC	M	64	28/05/96	V	3,75	+/+
26 AS	M	41	10/06/96	C	6,0	ND/+
27 AP	F	22	18/06/96	V	0	+/+
28 MP	M	20	26/06/96	C	4,5	ND/-
29 ER	M	21	12/07/96	C	4,0	+/-
30 BA	F	57	12/07/96	C	2,25	+/+
31 MS	F	28	18/07/96	V	0	+/+
32 LO	F	19	23/07/96	V	0	+/+
33 CL	M	46	29/07/96	C	2,25	+/+
34 AM	M	45	30/07/96	V	3,75	+/+
35 NR	F	24	13/08/96	V	0	+/+
36 CM	M	23	28/08/96	C	1,5	+/+
37 TS	F	40	28/08/96	C	1,5	+/+
38 AM	M	55	10/09/96	V	0	+/+
39 SR	F	15	17/09/96	V	1,5	+/+
40 MA	F	36	23/09/96	C	3,0	+/+
41 AF	M	60	26/09/96	C	3,75	-/+
42 AF	M	42	01/10/96	V	0	+/+
43 LS	M	54	12/10/96	C	1,5	+/-
44 SG	F	18	13/10/96	C	0,75	+/-
45 CF	M	48	15/10/96	V	0,75	+/+

Continuação da tabela 1

Paciente (receptor)	Sexo	Idade	Transplante		Imunossupressão p/ rejeição	Sorologia Doador/Receptor pré-tx
			Data	Tipo	solumedrol(g)	ELISA
46 AD	F	27	18/10/96	C	4,75	+/+
47 AO	F	56	18/10/96	C	0	+/+
48 JA	F	43	29/10/96	V	0,75	+/+
49 SS	F	19	11/11/96	C	0,75	ND/+
50 IB	F	52	20/11/96	C	0	ND/+
51 PL	M	55	20/11/96	C	2,0	ND/+
52 VG	M	37	26/11/96	V	0	+/+
53 MS	M	49	04/12/96	C	2,25	+/+
54 RS	F	31	05/12/96	C	0	+/+
55 CB	M	29	08/12/96	C	3,25	ND/+
56 AG	M	61	08/12/96	C	0,375 + OKT3	ND/+
57 MM	M	16	10/12/96	V	2,875 + OKT3	+/+
58 DM	M	44	14/12/96	C	0	ND/+
59 EL	M	29	17/12/96	V	0	+/+
60 CF	M	31	31/12/96	C	2,5	+/+
61 AM	M	24	31/12/96	C	1,875	+/+

M: masculino; F: feminino; V: doador vivo relacionado; C: doador cadáver
OKT3: antilinfócito T; (+): sorologia positiva para o CMV; (-) sorologia negativa para o CMV; ND: não determinado

Os pacientes transplantados com doador vivo relacionado foram internados na UCA (Unidade Cirúrgica) da Santa Casa de Porto Alegre um dia antes do transplante e os transplantados com doador cadáver no dia do transplante. Após a cirurgia, os pacientes permaneceram internados no mínimo por 2 semanas, dependendo da evolução clínica. Após a alta, os mesmos retornavam para seguimento ambulatorial de rotina. No início, este retorno ocorria duas vezes por semana, por um período de, aproximadamente, 1 mês e dependendo da evolução, este seguimento passava a ser semanal, depois quinzenal e, finalmente, mensal.

Antes do transplante, foram colhidas amostras de soro e sangue total dos pacientes. Nestas amostras, foram testados a presença de anticorpos séricos anti-CMV de classe IgG e IgM por ELISA e, no sangue total, foi determinada a antigenemia e a quantificação de subpopulações linfocitárias. Posteriormente, os pacientes foram monitorizados semanalmente, com coletas de sangue total, para a determinação de antigenemia e subpopulações linfocitárias por um período de 12 semanas pós-transplante.

3.1.1 Imunossupressão e tratamento antiviral

O esquema de imunossupressão padronizado no setor de transplante renal da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre seguiu os seguintes parâmetros:

A administração de drogas imunossupressoras para pacientes com doador vivo relacionado foi iniciada 1 dia antes do transplante. Para aqueles com sistema HLA de classe I e II idênticos foi iniciado Prednisona via oral na dosagem de 2 mg/kg/dia, com redução gradual a partir do 1° dia de pós-operatório. Outra droga utilizada foi a Azathioprina na dosagem de 2 mg/kg/dia. Para aqueles pacientes com sistema HLA não-idêntico foram administrados o mesmo esquema anterior, além de Ciclosporina na dosagem de 8 mg/kg/dia.

O esquema de drogas para pacientes receptores de órgãos de doador cadáver foi iniciado no dia do transplante com Prednisona, Azathioprina e Ciclosporina nas dosagens já descritas, com redução gradual. A partir do transplante, as 3 drogas eram administradas diariamente nas seguintes doses: azathioprina, 2 mg/kg/dia; ciclosporina A, 8mg/kg/dia com redução semanal de 1 mg/kg/dia mantendo-se ao final 4 mg/kg/dia; prednisona 1 mg/kg/dia por 10 dias, quando, então, a dose era reduzida para 0,75 mg/kg/dia e mantida nos próximos 20 dias, em seguida passava-se a 0,5 mg/kg/dia por mais 30 dias sendo finalmente reduzida e mantida a 0,25 mg/kg/dia.

Pacientes que apresentaram crise de rejeição ao enxerto renal, diagnosticada por biópsia, receberam metilprednisolona na dosagem de 500 mg/dia por via endovenosa, durante 3 dias. Casos em que a rejeição do enxerto mantinha-se após o tratamento com corticosteróides, receberam anticorpos monoclonais contra linfócitos CD3+ (OKT3), na dose de 5 mg/dia, durante 10 dias.

Pacientes diagnosticados pelo corpo clínico como tendo doença grave por CMV, receberam pela via intravenosa 10 mg/kg/dia de ganciclovir, dividido em 2 doses, por pelo menos 14 dias.

3.1.2 Critérios de inclusão dos pacientes no estudo

Os critérios para inclusão dos pacientes nesse estudo foram: 1) sobrevida do paciente e do rim transplantado de pelo menos 4 semanas, 2) imunossupressão mantida, 3) disponibilidade de amostras seriadas adequadas de sangue para a realização dos testes laboratoriais.

Todos os pacientes (receptores de rim) que participaram desse trabalho e seus doadores foram informados sobre os procedimentos a serem adotados e concordaram com a sua realização. Nos casos de doador cadáver, a família concordou com a colheita do material necessário ao estudo.

3.1.3 Critérios para detecção de infecção ativa pelo CMV

O critério utilizado nesse trabalho para detecção de infecção ativa pelo CMV foi a presença de antigenemia positiva. A antigenemia foi considerada positiva a partir de 1 célula positiva para 100.000 leucócitos contados.

3.1.4 Critérios para caracterização de provável doença por CMV

Para a caracterização de provável doença por CMV, além da antigenemia positiva, fazia-se necessária a presença de manifestações clínicas compatíveis com aquelas sabidamente causadas pelo CMV (Pannuti et al., 1987; Alfort e Britt, 1990): 1) febre (acima de 38^0C) com duração mínima de 3 dias, após a exclusão de outras causas, podendo estar associada a um dos seguintes sintomas: dores mioarticulares, leucopenia ($< 4X10^9$ leucócitos/L), trombocitopenia ($< 150 \text{ X } 10^9$ plaquetas/L), hepatite, pneumonia sem outra causa, ou ulcerações gastrointestinais confirmadas por biópsia, encefalite ou mielite transversa com detecção de CMV no liquor por PCR, antigenemia ou cultura.

Pacientes sem doença por CMV foram indivíduos com ausência dos sinais clínico-laboratoriais citados acima, podendo apresentar ou não antigenemia positiva.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Determinação da antigenemia para CMV

3.2.1.1 Separação das células

Adicionou-se a 4 ml de dextran 2,5% igual volume de sangue total coletado com EDTA a fim de se obter os granulócitos. Após incubação por 45 minutos, em ângulo de 45° a 37°C, em tubo plástico, aspirou-se o plasma sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento com PBS até 10 ml. A seguir, após centrifugação por 10 minutos a 1600 rpm, aspirou-se o sobrenadante e 5 ml de solução de lise foram adicionados ao sedimento e incubado a 4°C por 7 minutos. Centrifugou-se durante 8 minutos a 1600 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado com PBS por três vezes. Após a última lavagem o sobrenadante foi aspirado e o botão ressuspendido em 0,5 ml de PBS. A concentração de células foi ajustada em 100.000 leucócitos/ml. Lâminas foram obtidas após citocentrifugação de 100 µl da suspensão de leucócitos e fixadas em acetona por 5 minutos, para posterior congelamento, se a lâmina não fosse processada no mesmo dia. A lâmina pode ser conservada a -80°C até o momento do uso.

3.2.1.2 Kit Clonab CMV – APAAP Kit, Art. No 812680 (Biotest)

As lâminas foram fixadas em metanol/acetona 1:1 por 90 segundos deixando secar durante 5 minutos. 50µl de CLONAB – CMV (1:10 em tampão TBS) foram acrescentados aos citocentrifugados por 30 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida. As lâminas foram lavadas duas vezes com TBS durante 1 minuto, e secas ao redor do citocentrifugado. Em câmara úmida, 50µl de anticorpo ponte (1:50 em TBS) foram adicionados ao citocentrifugado durante 30 minutos à temperatura ambiente. Lavou-se 2 vezes com TBS durante 1 minuto. Incubou-se com 50µl do complexo APAAP (puro) por 30 minutos à temperatura ambiente. Lavou-se 2 vezes com TBS, durante 1 minuto. Incubou-se com anticorpo ponte (1:50) por 10 minutos. Lavou-se 2 vezes com TBS durante 1 minuto.

Incubou-se com complexo APAAP (puro) por 10 minutos. Lavou-se 2 vezes com TBS durante 1 minuto.

Preparou-se antes do uso: reação do substrato com reativos corantes (reativo substrato cromógeno):

a) Introduziu-se 2 gotas do concentrado de tampão (frasco A) num tubo e adicionou-se água destilada até 2ml. Adicionou-se 1 gota do concentrado do substrato (frasco B) e agitou-se no Vórtex.

b) Em um segundo frasco adicionou-se 1 gota de Neofucsina (frasco C) e uma gota do reativo de ativação (frasco D) e deixou-se em repouso por 3 minutos.

c) Misturou-se o conteúdo do A+B no tubo C+D, e agitou-se no Vortex.

Incubou-se os citocentrifugados com o reativo substrato - cromógeno por 20 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida no escuro. Lavou-se de 2 a 3 vezes com água destilada ou TBS. Corou-se com Hematoxilina de Mayer diluida 1:10 em TBS por 7 minutos. Lavou-se com água ou TBS. A leitura foi realizada em um microscópio óptico com aumento de 50x, usando óleo de imersão.

O resultado foi expresso em contagem total de células positivas em 100.000 leucócitos, ou seja, leucócitos com núcleo corado de vermelho no citocentrifugado. Conforme figura 7.

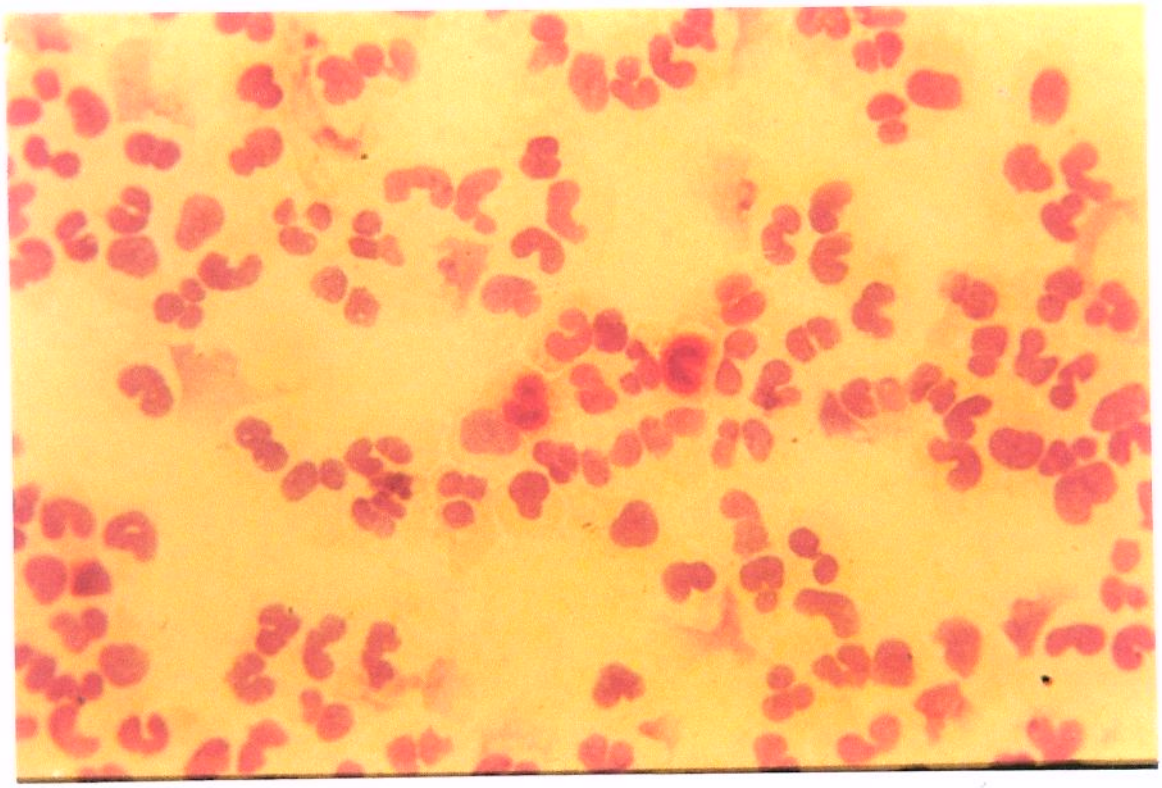


Figura 7 – Leucócitos humanos infectados com CMV (pp65) e não infectados. (1)

3.2.2 Imunofenotipagem de linfócitos

3.2.2.1 Reagentes utilizados

Foi utilizado o método de dupla marcação de sangue total, usando-se os seguintes anticorpos monoclonais (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA): anti-CD3-FITC (células T), anti-CD4-PE (células T^h), anti-CD8-PE (células T citotóxicas/supressoras ou células NK), anti-CD19-PE (células B), anti-CD16+56-PE (células NK) e anti – HLA-DR-PE. Estes reagentes estão listados na tabela 2.

Controle isotípicos IgG1/IgG2a (Becton Dickinson, San Jose, CA) foi utilizado como controle negativo.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Tabela 2 - Anticorpos monoclonais usados para a imunofenotipagem de linfócitos.

Anticorpos monoclonais	Fluorocromo	Distribuição
anti-CD3	FITC	Células T
anti-CD4	PE	Células Th, monócitos
anti-CD8	PE	Células T citotóxicas/supressoras, Células NK
anti-CD19	PE	Células B
anti-CD16+56	PE	Células NK
anti-HLA-DR	PE	Células B, monócitos, células T ativadas

3.2.2.2 Técnica

Incubou-se, durante 20 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, 10µl de anticorpo monoclonal com 100 µl de sangue total periférico coletados com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), 2 ml de solução de lise (FACS Lysing Solution, Becton Dickison número de catálogo 349202 [92-0002]) foram acrescentados à mistura e incubados durante 15 minutos ao abrigo da luz. Desprezou-se o sobrenadante após centrifugação a 1.500 rpm. Lavou-se o sedimento com 1 ml de paraformaldeído a 1%. No final o sedimento foi ressuspendido em 1 ml de paraformaldeído a 1%. A amostra foi lida, dentro de 24 horas no citômetro de fluxo.

Foram analizados um total de 2.500 células dentro da região de linfócitos no citômetro de fluxo Ortho Cytoron Absolute (Ortho Diagnostic Systems Inc., Raritan, NJ, USA) O programa Immunocount II, versão 2.0 foi utilizado para aquisição e análise dos resultados.

3.2.3 Testes para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-CMV

3.2.3.1 Determinação de IgM anti-CMV por EIA (enzima imunoensaio)

As determinações de anticorpos IgM anti-CMV por EIA foram realizadas utilizando-se kits comerciais "COBAS CORE (Roche) baseados na captura de anticorpos de classe IgM, segundo as especificações do fabricante.

Resumidamente, 10 µl de amostras de soros diluídos a 1:50, foram adicionadas a um tubo contendo esferas revestidas, sensibilizadas com anticorpo monoclonal de camundongo IgG anti-IgM humana. Após incubação por 15 minutos a 37°C os tubos foram lavados 3 vezes com água destilada. A seguir, concentrações apropriadas de antígeno de CMV e conjugado (anticorpo monoclonal de camundongo IgG anti-CMV marcado com peroxidase) foram misturados, e 200 µl dessa solução foram adicionados aos tubos e deixados em repouso durante 60 min a 37°C. Os tubos foram então lavados por três vezes com água destilada e 250 µl do sistema substrato (tetrametilbenzidina-peróxido de hidrogênio) foram adicionados aos orifícios. Quinze minutos após a adição do sistema substrato, as reações foram bloqueadas adicionando-se aos tubos de ensaio 1 ml de ácido sulfúrico 5%. As absorbâncias das reações foram lidas a 450 nm, utilizando-se uma leitora de EIA (Cobas EIA Instruments). Os cálculos foram realizados automaticamente através de um programa de computação específico (Cobas Core Immunoassay Analyser). Todas as reações foram realizadas em duplicata e as médias das densidades ópticas foram consideradas. Em cada ensaio, soros controles foram incluídos para o cálculo do "valor limite". Amostras cujas absorbâncias foram maiores que o "valor limite" foram consideradas reagentes.

3.2.3.2 Determinação de IgG anti-CMV por EIA (enzyme immunoassay)

As determinações de anticorpos IgG anti-CMV por EIA foram realizadas utilizando-se kits comerciais da marca Cobas Core (Roche), segundo as especificações do fabricante.

Resumidamente, 10 µl de amostras de soros diluídas a 1:50, foram adicionadas a um tubo contendo esferas revestidas, sensibilizadas com anticorpo monoclonal de camundongo IgG anti-IgG humana. Após incubação por 15 minutos a 37°C, os tubos foram lavados 3 vezes com água destilada. A seguir, concentrações apropriadas de antígeno de CMV e conjugado (anticorpo monoclonal de camundongo IgG anti-CMV marcado com peroxidase) foram misturados, e 200 µl dessa solução foram adicionados aos tubos e deixados em repouso durante 60 min a 37°C. Os tubos foram então lavados por três vezes com água destilada e 250 µl do sistema substrato (tetrametilbenzidina-peróxido de hidrogênio) foram adicionados aos orifícios. Quinze minutos após a adição do sistema substrato, as reações foram bloqueadas adicionando-se aos tubos de ensaio 1 ml de ácido sulfúrico 5%. As absorbâncias das reações foram lidas a 450 nm, utilizando-se uma leitora de EIA (Cobas EIA Instruments). Todas as reações foram realizadas em duplicata e as médias das densidades ópticas foram consideradas. As absorbâncias das reações foram convertidas automaticamente em U/ml através de um programa específico (Cobas Core Immunoassay Analyser). Amostras com atividade específica maiores que 5 U/ml foram consideradas reagentes.

3.2.4 Métodos Estatísticos

As variáveis quantitativas foram descritas através da mediana e amplitude interquartil. Esta abordagem foi adotada uma vez que os dados não apresentaram uma distribuição normal. Diferenças entre dois grupos foram comparadas pelo teste U de Mann-Whitney. Quando foram comparados 3 ou mais grupos, foi usado o teste de Kruskal-Wallis. As eventuais diferenças estatisticamente significativas foram localizadas através do teste de DUNN.

O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$. Todos os dados foram processados e analizados com a ajuda dos programas Epi Info V6.04 e SPSS V6 (Statistical Package for the Social Sciences).

Resultados

RESULTADOS

3.3 INFECÇÃO E PROVÁVEL DOENÇA PELO CMV

Foram estudados, no período pré-transplante e durante 12 semanas pós-transplante, 61 pacientes adultos transplantados de rim do Serviço de Nefrologia da Santa Casa de Porto Alegre, de janeiro a dezembro de 1996. Dos 61 pacientes estudados, 41 (67,2%) não apresentaram evidências de doença por CMV no primeiro trimestre pós-transplante e 20 (32,8%) apresentaram sintomas compatíveis com provável doença leve ou grave pelo CMV em algum momento dos três meses de estudo. O tempo mediano de ocorrência da doença por CMV foi na 6ª semana pós-transplante, variando entre a 2ª e a 11ª semanas. Entre os 41 pacientes que não apresentaram evidências de doença por CMV, 28 (68,3%) apresentaram antigenemia positiva em algum momento do estudo e os outros 13 (31,7%) nunca positivaram a antigenemia. Dos 20 pacientes com provável doença por CMV, 8 (40,0%) tiveram doença leve com quadros de leucopenia, febre e plaquetopenia e 12 (60,0%) apresentaram provável doença grave por CMV, com episódios de febre e/ou leucopenia e/ou pericardite e/ou plaquetopenia e/ou hepatite e/ou gastroenterite e/ou rejeição, sendo necessário o uso de ganciclovir. Todos os pacientes com infecção sintomática curaram-se espontaneamente ou após tratamento com droga antiviral. As tabelas 3 e 4 sumarizam os resultados da infecção por CMV nos transplantados estudados.

Tabela 3 - Perfil sorológico pré-tx do doador e receptor e presença ou ausência de provável doença por CMV nas 12 semanas pós-tx dos 61 pacientes adultos transplantados de rim estudados

Pre´- tx (IgG)	Sem doença		Com provável doença	
	Sem infecção ativa	Com infecção ativa	Doença leve	Doença grave
D-/R-	0	0	0	0
D-/R+	1	0	0	1
D+/R-	0	0	0	4
D+/R+	10	14	6	7
Doador não deter/R+	2	12	2	0
Doador não deter/R-	0	2	0	0
Total	13	28	8	12

D=Doador; R=Receptor

Tabela 4 - Manifestações clínicas, tratamento e funcionamento do enxerto dos 20 pacientes com provável doença pelo CMV

Paciente	Sinais, sintomas e alterações laboratoriais	Tempo pós-tx de início do quadro clínico (semanas)	Tratamento (ganciclovir) 10mg/kg/dia (dias)	Funcionamento do enxerto
02	Febre, leucopenia, gastroenterite	8	24	Funcionante
10	Febre, leucopenia	7	21	Funcionante
11	Febre, leucopenia, pericardite	4	21	Funcionante
16	Leucopenia, plaquetopenia	2	Não tratou	Funcionante
17	Leucopenia, colite	9	Não tratou	Funcionante
20	Febre, leucopenia, plaquetopenia	4	14	Funcionante
22	Febre, lesões bolhosas na pele	7	14	Funcionante
24	Febre, leucopenia	4	14	Funcionante
25	Leucopenia	6	Não tratou	Funcionante
28	Febre, leucopenia, dor epigástrica	4	14	Funcionante
29	Febre, leucopenia, gastrite	7	14	Funcionante
30	Leucopenia	8	Não tratou	Funcionante
40	Leucopenia	11	Não tratou	Funcionante
43	Leucopenia, hepatite	7	14	Funcionante
44	Febre, leucopenia, mialgias	4	14	Funcionante
46	Febre, leucopenia	5	21	Funcionante
47	Leucopenia	6	Não tratou	Funcionante
53	Leucopenia	4	Não tratou	Funcionante
56	Leucopenia	5	Não tratou	Funcionante
58	Febre, leucopenia	5	Não tratou	Funcionante

Pela análise da tabela 4, podemos observar que o dado clínico predominante nos pacientes com manifestações clínicas atribuíveis à doença pelo CMV foi o de síndrome febril (55%). O início dos sintomas ocorreu em média 6 semanas após o transplante renal e

está representado graficamente na figura 8. Analisando a figura 9 observamos que a diminuição do número de linfócitos T totais precede o aparecimento da doença pelo CMV.

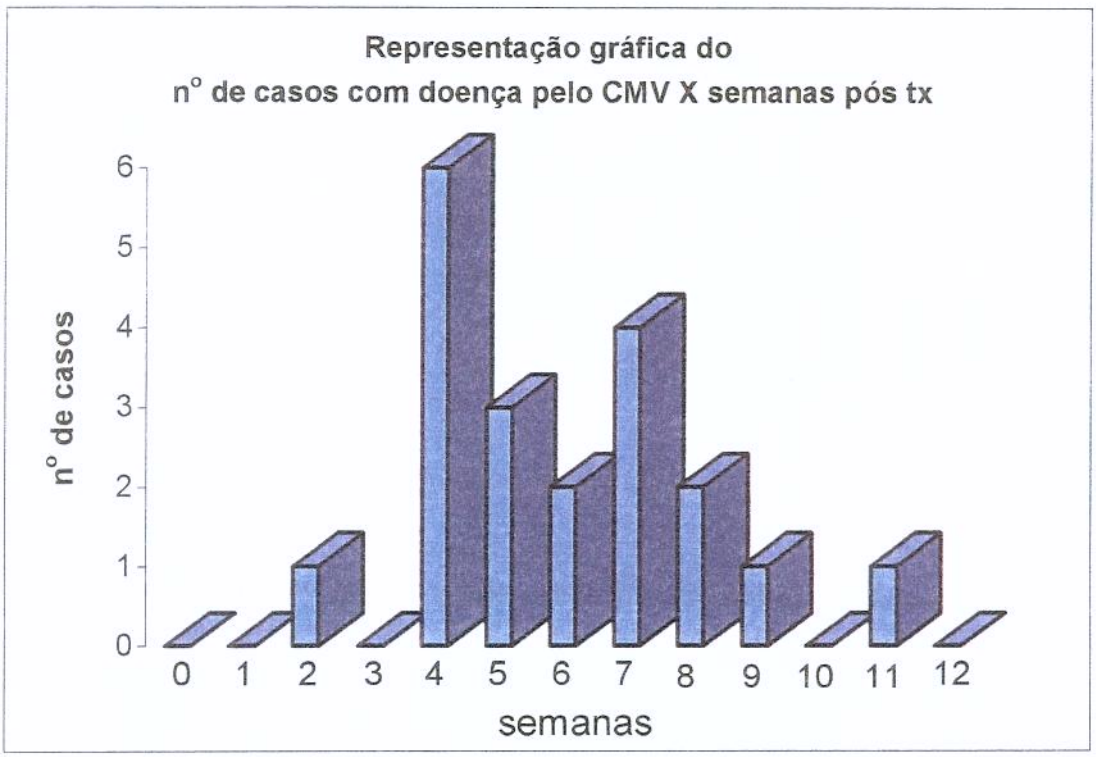


Figura 8 - Número de casos com provável doença pelo CMV versus semanas pós-transplante

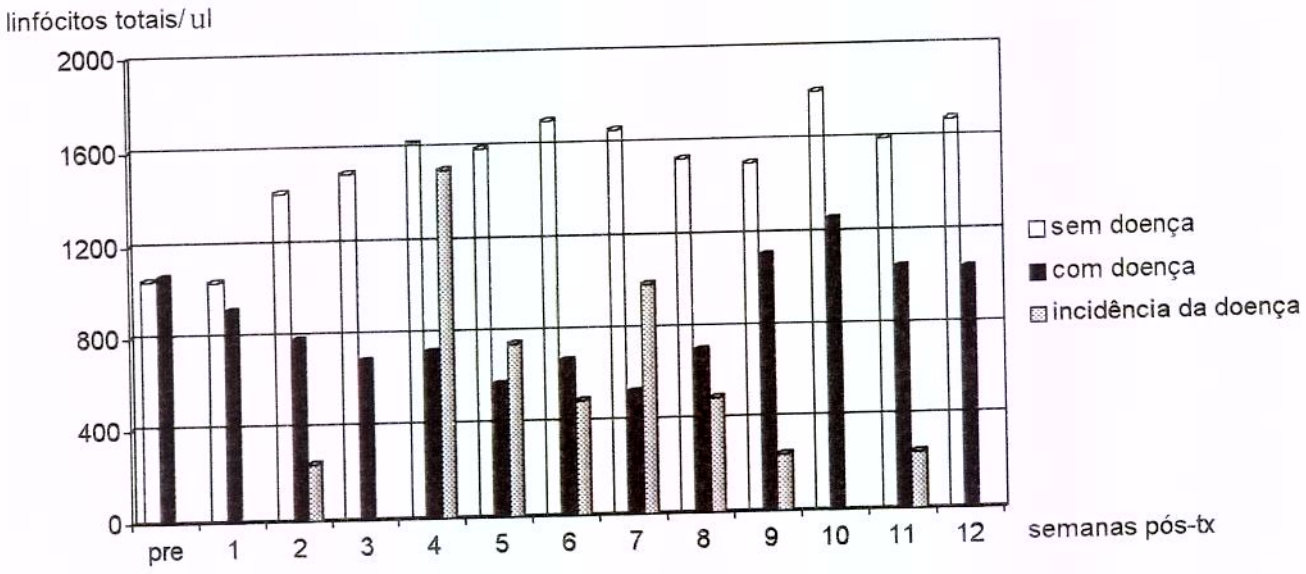
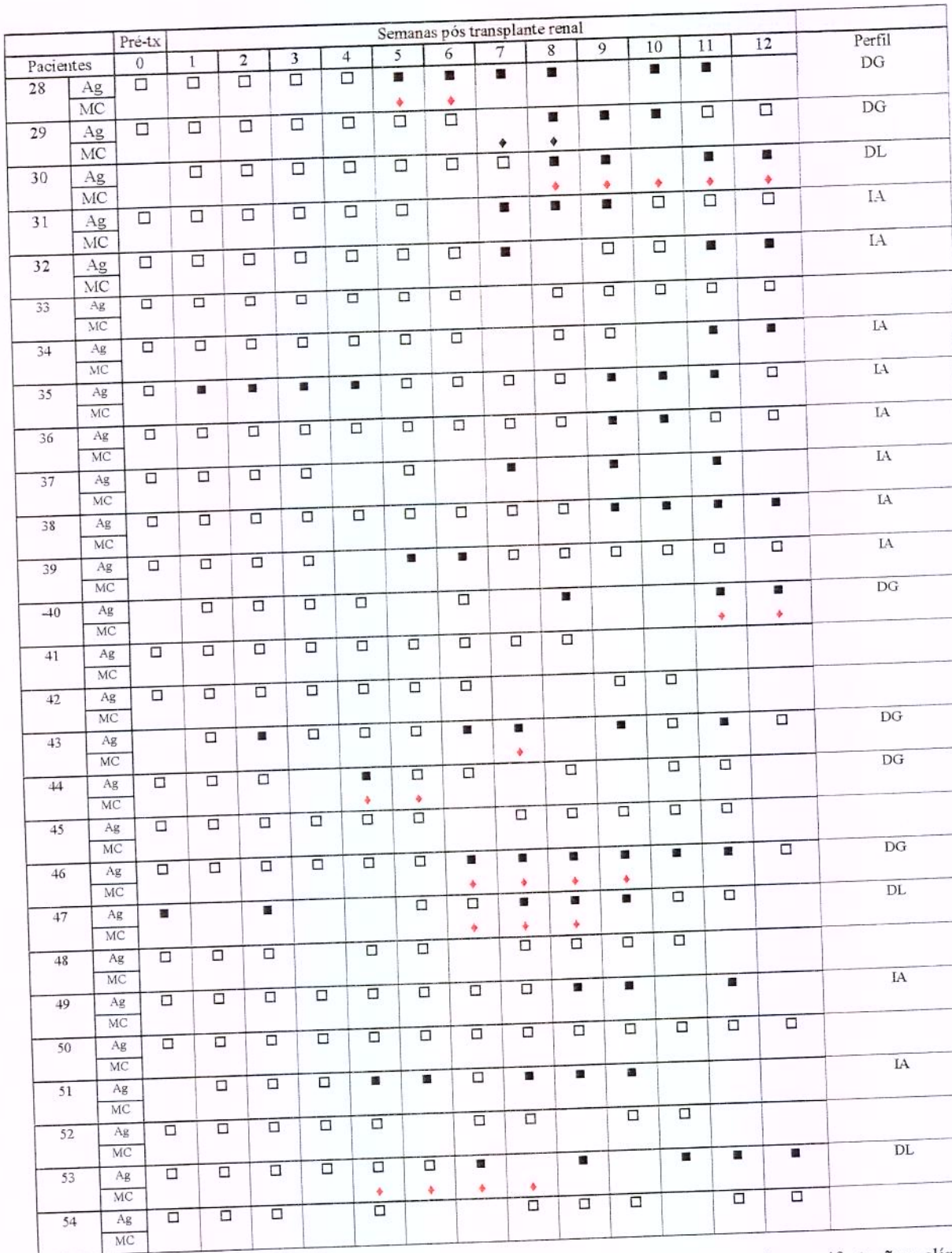


Figura 9 – Número absoluto de linfócitos T totais (CD3+) e a incidência de Doença pelo CMV.

As colunas brancas representam o número absoluto de linfócitos T no grupo de pacientes sem doença pelo CMV. As colunas pretas representam este mesmo número no grupo com doença pelo CMV e as colunas cinzas representam a incidência da doença pelo CMV entre os nossos pacientes nas 12 semanas pós-transplante

Pacientes		Pré-tx	Semanas pós transplante renal												
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Perfil
1	Ag	□	■	■	■	■	■	■		■		□			
	MC														IA
2	Ag	□	□	□	□	□		□		□	■	■	■	■	DG
	MC									♦	♦	♦			
3	Ag	■	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	IA
	MC														
4	Ag	■	■	■	■	■		■		■			■		IA
	MC														
5	Ag			■	■	■	□	□	□	□	■	■	□	□	
	MC														IA
6	Ag		□	□	□	■	■	■	□	□	■	■	□	□	IA
	MC														IA
7	Ag	□	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	
	MC														
8	Ag	□	□	□	□	□	■	□	□	■	■	□	□		IA
	MC														
9	Ag	□	□	□	□	□	□		□	□	□	□	□		
	MC														
10	Ag	□	□	□	■	■	■	□	□	■	□	□	□	■	DG
	MC								♦	♦					
11	Ag	□	□	□	□	■	■	■	■	□	□		■	□	DG
	MC					♦	♦	♦							
12	Ag	■	■	□	□	□	□	□	□		□	□	■	■	IA
	MC														
13	Ag	□	□	■	■		■				□	□	□	□	
	MC														IA
14	Ag		□	□	□	□	□	■	■	■	□	□	■	■	IA
	MC														IA
15	Ag	□	□	□			□				■	■	■	■	
	MC														
16	Ag		■	■	■	■	■			□		□			DL
	MC			♦	♦	♦									
17	Ag	■	■		■	□			□	□	■	■	■	■	DL
	MC										♦	♦	♦		
18	Ag	□	□	□	□	□			■		■	■	■		IA
	MC														
19	Ag	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■			IA
	MC														
20	Ag	□	□	□	□	□	□	■	■	□	□	■	■	■	DG
	MC								♦	♦					
21	Ag	□	□	□	□	□	■		□	■	■		■	■	IA
	MC														
22	Ag	□	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□			DG
	MC									♦	♦				
23	Ag	□	□	□	□	□	□	■	■	■	□	□	■	□	IA
	MC														
24	Ag	■	■	□	□	■	■	■	■	□		□	□	□	DG
	MC						♦	♦	♦						
25	Ag	□	□	□	■	□				■	■	■	□	□	DL
	MC							♦	♦	♦	♦				
26	Ag		□	□	□	□	□	□	□		□	□	■	□	IA
	MC														
27	Ag	□	□	□	□	□	□	□	□	■	■	■	□		IA
	MC														

Figura 10 - Correlação entre a antigenemia e a presença ou ausência de manifestações clínicas atribuíveis à provável doença por CMV nos 61 pacientes receptores de transplante renal estudados



Cont. figura 10 - Correlação entre a antigenemia e a presença ou ausência de manifestações clínicas atribuíveis à provável doença por CMV nos 61 pacientes receptores de transplante renal estudados

Pacientes		Pré-tx	Semanas pós transplante renal												Perfil
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
55	Ag	□	□		□	□	□		■	■		□			IA
	MC														
56	Ag	□	□	□	□	□	□	■	■	■			■		DL
	MC							♦	♦	♦					
57	Ag	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	
	MC														
58	Ag		□	□	□	□	■	■	■	■		□			DL
	MC						♦	♦	♦						
59	Ag	□	□	□	□	□		□	□		□		□	□	
	MC														
60	Ag	□	□	□		□		□		□		□	□		
	MC														
61	Ag	□	□	□	□		□	□		□	□	□			
	MC														

Cont. figura 10 - Correlação entre a antigenemia e a presença ou ausência de manifestações clínicas atribuíveis à provável doença por CMV nos 61 pacientes receptores de transplante renal estudados

Ag = antigenemia (quadrado cheio (+); quadrado vazio (-)); MC = Manifestações Clínicas atribuíveis à provável doença pelo CMV (losângulo vermelho cheio (+)); DG = Doença grave; DL = Doença leve, IA = infecção ativa

Pela análise da figura 10, podemos observar que, dos 61 pacientes estudados, 20 (32,8%) apresentaram provável doença pelo CMV e 48 (78,7%) positivaram a antigenemia em algum momento do estudo. Dos 20 pacientes com provável doença pelo CMV, 17 (85,0%) positivaram a antigenemia antes ou durante o aparecimento de qualquer manifestação clínica atribuível à doença pelo CMV, demonstrando que a antigenemia foi capaz de fazer diagnóstico precoce na maioria dos pacientes. Em alguns pacientes, existem semanas em branco, pois as coletas não foram possíveis de serem realizadas para a determinação da antigenemia.

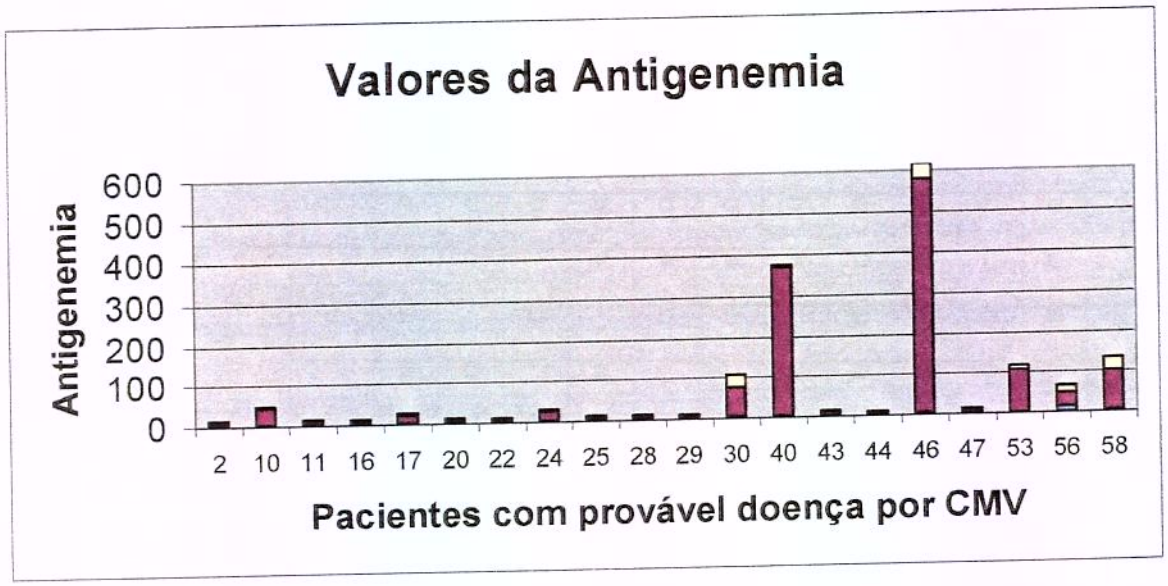


Figura 11 - Representação gráfica do número de células positvas/100.000 leucócitos, ao longo das 12 semanas de estudo, dos 20 pacientes com provável doença por CMV

Pela análise da figura 11, podemos observar que o número de células positivas/100.000 leucócitos estudados, ao longo das doze semanas de estudo, variou de 3 a 573 células nos 20 pacientes com provável doença por CMV.

3.4 IMUNOFENOTIPAGEM DE SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS

3.4.1 Valores absolutos das subpopulações linfocitárias e de células NK no momento do pré-transplante dos receptores de rim

Nenhuma população de células estudadas apresentou diferença estatisticamente significativa nos seus valores absolutos no momento pré-transplante.

3.4.2 Valores absolutos das subpopulações linfocitárias e de células NK nas doze semanas posteriores ao transplante de rim

3.4.2.1 Linfócitos T (CD3+)

Durante a primeira semana pós-transplante, não ocorreram alterações na população de linfócitos T totais (CD3+) quanto aos valores absolutos em relação ao pré-transplante em ambos os grupos. A partir da 2ª até a 12ª semanas pós-tx, o grupo com provável doença por CMV apresentou valores de linfócitos T menores que o grupo sem doença. Esta diferença, entre os dois grupos, foi estatisticamente significativa da 2ª à 8ª semanas. No segundo mês pós-tx, o grupo com provável doença por CMV apresentou os seus menores valores de linfócitos T (CD3+), coincidindo com o período de maior incidência da doença no nosso estudo. A partir da 8ª semana, os valores de linfócitos T (CD3+) começaram a se elevar no grupo com provável doença, atingindo seu máximo na 10ª semana, retornando aos valores basais na 12ª semana de estudo. O grupo sem doença por CMV sempre apresentou, a partir da 2ª semana pós-tx, valores de linfócitos T (CD3+) 50% mais elevados que o pré-tx. Esses dados podem ser observados na Tabela 5 e Figura 12.

Tabela 5 - Valores absolutos de linfócitos T (CD3+)/μl em pacientes transplantados renais sem e com provável doença por CMV. Os resultados estão expressos em mediana

	Sem Doença	n	P25-P75	Com Doença	n	P25-P75	*p*
Pré-tx	1052,5	36	731-1305	1066	16	876-1534	0,6627
Semana 1	1040	41	678-1598	922	18	499-1409	0,3035
Semana 2	1412	41	982-1882	785,5	18	510-1469	0,0121*
Semana 3	1492,5	38	878-2088	692,5	17	269-1738	0,0127*
Semana 4	1619,5	36	1172-2241	726	19	354-1149	0,0002*
S7emana 5	1592,5	36	984-2314	573,5	16	272-1132	0,0046*
Semana 6	1702,5	30	1004-2174	671	17	412-1500	0,0065*
Semana 7	1657,5	32	1086-2505	531	15	361-730	0,0005*
Semana 8	1527	33	1032-2105	703	19	458-1740	0,0204*
Semana 9	1501	34	1136-2323	1114,5	12	617-1532	0,0678
Semana 10	1802	31	1138-2267	1258	15	713-1379	0,0302*
Semana 11	1600	29	919-2221	1051	16	530-1749	0,0715
Semana 12	1676	25	1104-2251	1046	17	647-2056	0,1150

*$p<0,05$

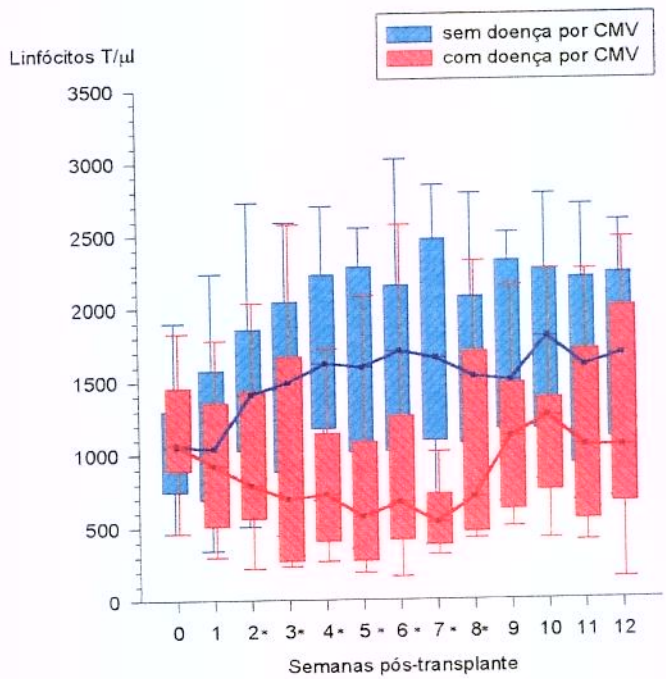


Figura 12 - Representação gráfica dos valores absolutos de linfócitos T (CD3+) entre os transplantados renais com provável doença por CMV (vermelho) e entre os sem doença (azul) *$p<0,05$

3.4.2.2 Linfócitos T helper (CD3+CD4+)

Antes da segunda semana pós-transplante também não ocorreram alterações significativas quanto aos valores de linfócitos Th em ambos os grupos. A partir da 2ª até a 12ª semana pós-tx, o grupo com provável doença por CMV apresentou valores de linfócitos Th (CD3+CD4+) absolutos menores que o grupo sem doença e esta diferença foi estatisticamente significativa. Entre a 5ª e a 7ª semana, o grupo doente atingiu seus valores mínimos de linfócitos Th, coincidindo com o período de maior incidência da doença por CMV no nosso estudo. A partir da 8ª semana, os valores de linfócitos Th começaram a se elevar no grupo doente, permanecendo significativamente menor que o grupo sem doença até a 12ª semana de estudo. Esses dados podem ser observados na Tabela 6 e Figura 13.

Tabela 6 - Valores absolutos de linfócitos Th (CD3+CD4+)/µl em pacientes transplantados renais sem e com provável doença por CMV. Os resultados estão expressos em mediana

	Sem Doença	n	P25-P75	Com Doença	n	P25-P75	*P*
Pré-tx	649,5	36	469-793	719,5	16	567-847	0,5066
Semana 1	717	41	436-1110	726,5	18	261-944	0,4588
Semana 2	948	41	660-1290	596,5	18	286-1058	0,0280*
Semana 3	982,5	38	537-1324	477	17	174-1323	0,0346*
Semana 4	1114	36	734-1323	479	19	295-786	0,0003*
Semana 5	1039	36	648-1519	368	16	140-756	0,0013*
Semana 6	1115	30	676-1431	431	17	270-844	0,0021*
Semana 7	1108	32	695-1648	370	15	243-458	0,0003*
Semana 8	960,5	33	619-1317	446	19	277-1089	0,0113*
Semana 9	972	34	758-1455	539	12	433-982	0,0277*
Semana 10	1125	31	845-1424	597	15	483-1005	0,0059*
Semana 11	1011	29	577-1419	714	16	304-959	0,0201*
Semana 12	1045	25	702-1418	614	17	383-1072	0,0391*

*$p<0,05$

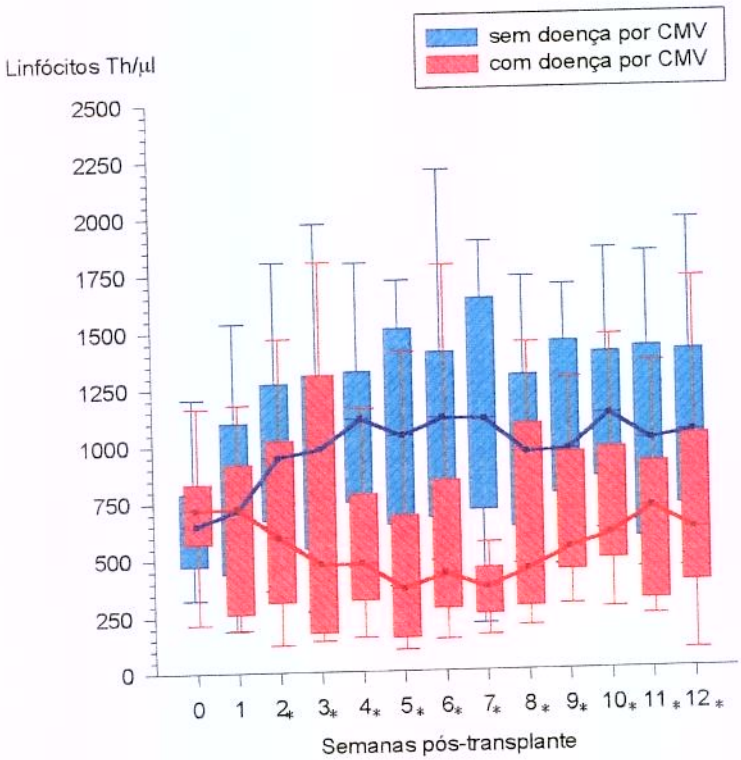


Figura 13 - Representação gráfica dos valores absolutos de linfócitos Th (CD3+CD4+) entre os transplantados renais com provável doença por CMV (vermelho) e entre os sem doença (azul). *$p<0,05$

3.4.2.3 Linfócitos T citotóxicos (CD3+CD8+)

Na primeira semana pós-transplante, houve uma diminuição na contagem absoluta de LTCs em ambos os grupos. A partir da 2ª semana pós-tx, o grupo com provável doença diminuiu seus valores de LTCs, atingindo o seu mínimo valor na 7ª semana. As diferenças entre os dois grupos são estatisticamente significativas da 2ª à 7ª semanas. A partir da 8ª semana, os valores de LTCs do grupo doente começaram a se elevar, atingindo os valores próximos aos basais na 12ª semana. O grupo sem doença apresentou valores superiores aos basais a partir da 2ª semana de estudo até o final dos 3 meses pós-transplante. Esses dados podem ser observados na Tabela 7 e Figura 14.

Tabela 7 - Valores absolutos de linfócitos Tc (CD3+CD8+)/μl em pacientes transplantados sem e com provável doença por CMV. Os resultados estão expressos em mediana

	Sem Doença	n	P25-P75	Com Doença	N	P25-P75	*p*
Pré-tx	411	36	258-598	381,5	16	278-579	0,9763
Semana 1	350	41	219-514	274,5	18	202-472	0,4199
Semana 2	432	41	308-601	251,5	18	137-452	0,0182*
Semana 3	471,5	38	277-650	235	17	102-564	0,0228*
Semana 4	478	36	362-746	251	19	129-452	0,0012*
Semana 5	460	36	306-722	170	16	117-364	0,0056*
Semana 6	477	30	300-760	236	17	143-482	0,0326*
Semana 7	610,5	32	365-787	162	15	118-324	0,0012*
Semana 8	539	33	352-675	324	19	169-573	0,0788
Semana 9	524,5	34	332-742	401,5	12	156-733	0,3050
Semana 10	569	31	360-775	476	15	235-633	0,1934
Semana 11	538,5	29	345-737	357	16	197-743	0,2304
Semana 12	455	25	319-740	324	17	198-768	0,3630

$p<0,05$

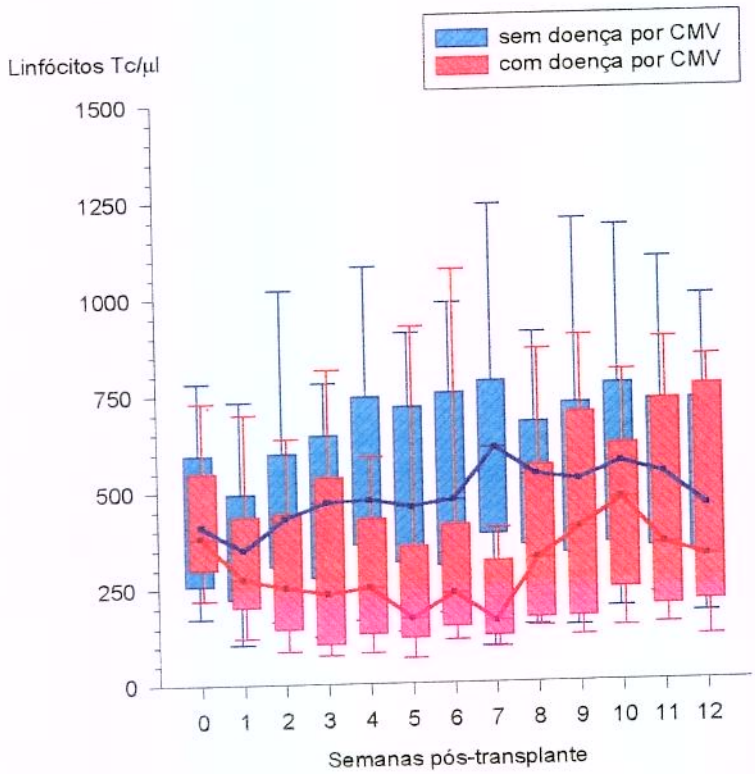


Figura 14 - Representação gráfica dos valores absolutos de linfócitos Tc (CD3+CD8+) entre os transplantados renais com provável doença por CMV (vermelho) e entre os sem doença (azul) *p<0,05

3.4.2.4 Linfócitos B (CD19+)

Na primeira e segunda semanas após o transplante, observamos um aumento no número absoluto de linfócitos B, tanto no grupo sem como no grupo com provável doença por CMV. A partir da 3ª semana, ocorreu uma diminuição em ambos os grupos, nos valores de linfócitos B (CD19+). No grupo sem doença, os valores mantiveram-se acima dos basais nos 3 meses de estudo e, no grupo doente, os valores mantiveram-se abaixo dos basais da 3ª à 12ª semanas pós-tx. Houve diferenças significativas nos valores de linfócitos B, entre os dois grupos, na 4ª e 7ª semanas de estudo. Esses dados podem ser observados na Tabela 8 e Figura 15.

* * * * * *

Tabela 8 - Valores absolutos de linfócitos B (CD19+)/μl em pacientes transplantados renais sem e com provável doença por CMV. Os resultados estão expressos em mediana

	Sem Doença	n	P25-P75	Com Doença	n	P25-P75	*p*
Pré-tx	126,5	36	76-154	119	16	95-253	0,3829
Semana 1	213	41	104-392	183	18	114-222	0,4998
Semana 2	267	41	167-417	186,5	18	92-274	0,0899
Semana 3	225,5	38	179-372	102	17	74-320	0,0728
Semana 4	258,5	36	134-377	120	19	69-171	0,0055*
Semana 5	237	36	151-379	109	16	84-207	0,0570
Semana 6	210	30	134-363	107	17	67-298	0,1159
Semana 7	229	32	132-294	98	15	32-113	0,0076*
Semana 8	200	33	108-310	100	19	60-280	0,1742
Semana 9	197	34	119-315	97	12	54-209	0,0641
Semana 10	209	31	142-251	134	15	49-272	0,1192
Semana 11	212	29	103-284	108	16	62-226	0,0834
Semana 12	174	25	99-216	111	17	49-229	0,2334

P<0,05

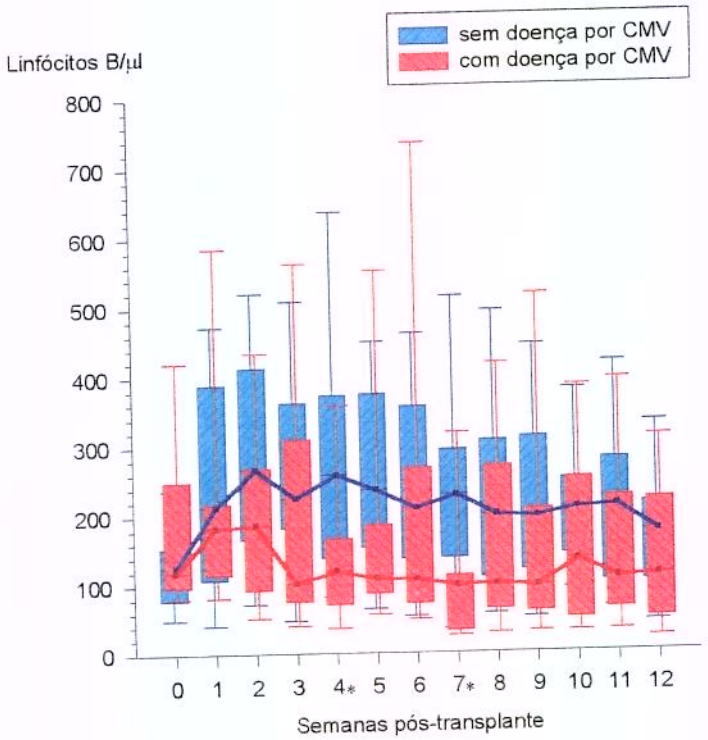


Figura 15 – Representação gráfica dos valores absolutos de linfócitos B (CD19+) entre os transplantados renais com provável doença por CMV (vermelho) e entre os sem doença (azul) *p<0,05

3.4.2.5 Linfócitos T ativados (CD3+HLA-DR+)

No grupo com provável doença por CMV, os níveis de linfócitos T ativados (CD3+HLADR+) tenderam a diminuir da 1ª à 7ª semana pós-tx. A partir da 8ª semana, os valores aumentaram, chegando aos mesmos níveis do momento pré-tx na 12ª semana de estudo. O grupo sem doença permaneceu com valores próximos aos basais ao longo dos três meses. Na 6ª e 7ª semanas pós-tx, os dois grupos apresentaram diferenças nos valores absolutos de linfócitos T ativados estatisticamente significativas. Esses dados podem ser observados na Tabela 9 e Figura 16.

Tabela 9 - Valores absolutos de linfócitos CD3+HLA-DR+/µl em pacientes transplantados sem e com provável doença por CMV. Os resultados estão expressos em mediana

	Sem Doença	n	P25-P75	Com Doença	n	P25-P75	*p*
Pré-tx	134,5	36	91-214	201	16	142-344	0,0554
Semana 1	117,5	41	65-190	153,5	18	54-326	0,3641
Semana 2	139	41	72-214	114	18	39-225	0,4083
Semana 3	149	38	78-222	96	17	46-149	0,1971
Semana 4	133	36	62-256	85	19	43-124	0,1194
Semana 5	140	36	83-200	81,5	16	46-218	0,3991
Semana 6	164	30	110-200	94	17	64-155	0,0422*
Semana 7	173,5	32	117-263	82	15	43-192	0,0590
Semana 8	168	33	94-273	120	19	58-292	0,5598
Semana 9	137	34	79-380	222	12	72-386	0,8694
Semana 10	200	31	73-427	165	15	89-413	0,9220
Semana 11	133	29	98-368	231,5	16	137-373	0,3339
Semana 12	143,5	25	84-375	204	17	78-334	0,9184

P<0,05

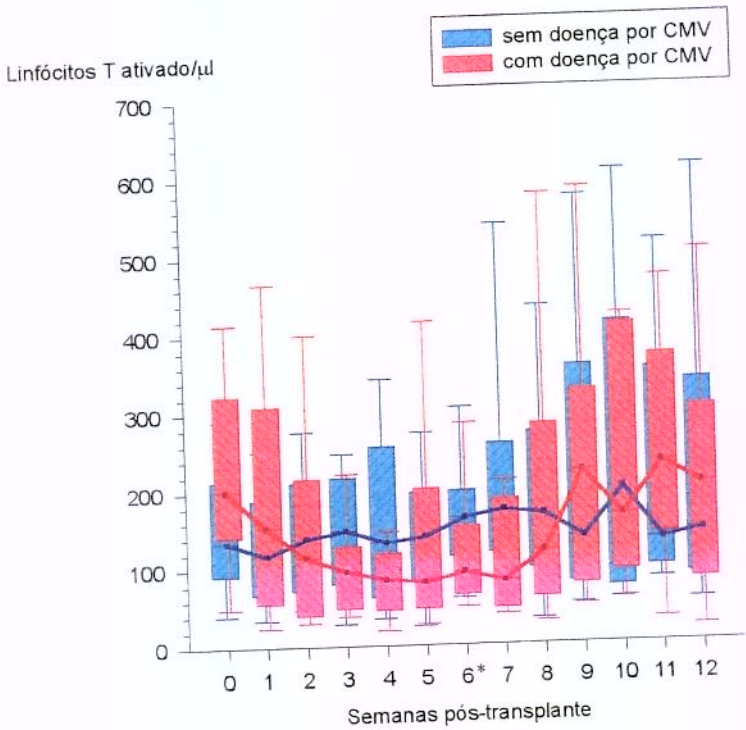


Figura 16 - Representaçâo gráfica dos valores absolutos de linfócitos T ativados (CD3+HLA-DR+) entre os transplantados renais com provável doença por CMV (vermelho) e entre os sem doença (azul) *p<0,05

3.4.3 Células NK (CD3-CD(16+56)+)

Os valores de células NK apresentaram uma queda de aproximadamente 50% dos seus valores basais na primeira semana pós-transplante, mantendo-se baixo até a 12ª semana de estudo em ambos os grupos. Na 7ª semana, os níveis de células NK diminuíram significativamente no grupo com provável doença pelo CMV (46 X 26; *P*=0,0155). Os dados podem ser observados na Tabela 10 e Figura 17.

Tabela 10 - Valores absolutos de células NK CD(16+56)+ em pacientes transplantados renais sem e com provável doença por CMV. Os resultados estão expressos em mediana

	Sem Doença	n	P25-P75	Com Doença	n	P25-P75	*p*
Pré-tx	116,5	36	80-189,5	113	16	75-209,5	0,7064
Semana 1	51	41	38-78	65,5	18	47-128	0,1298
Semana 2	64	41	34-98	51,5	18	36-95	0,5813
Semana 3	48,5	38	32-78	52	17	27-97	0,8128
Semana 4	50,5	36	37-80	47	19	19-95	0,4625
Semana 5	46,5	36	27,5-75	42	16	22-75,5	0,8661
Semana 6	50,5	30	27-80	41	17	30-90	0,9735
Semana 7	46	32	31,5-91,5	26	15	11-59	0,0155*
Semana 8	48	33	35-60	53	19	14-110	0,9318
Semana 9	49	34	29-90	33,5	12	8-100,5	0,2709
Semana 10	45	31	25-83	55	15	30-121	0,3668
Semana 11	37	29	24-56	40	16	15-125,5	0,7759
Semana 12	39	25	25-55	50	17	18-109	0,4194

$p<0,05$

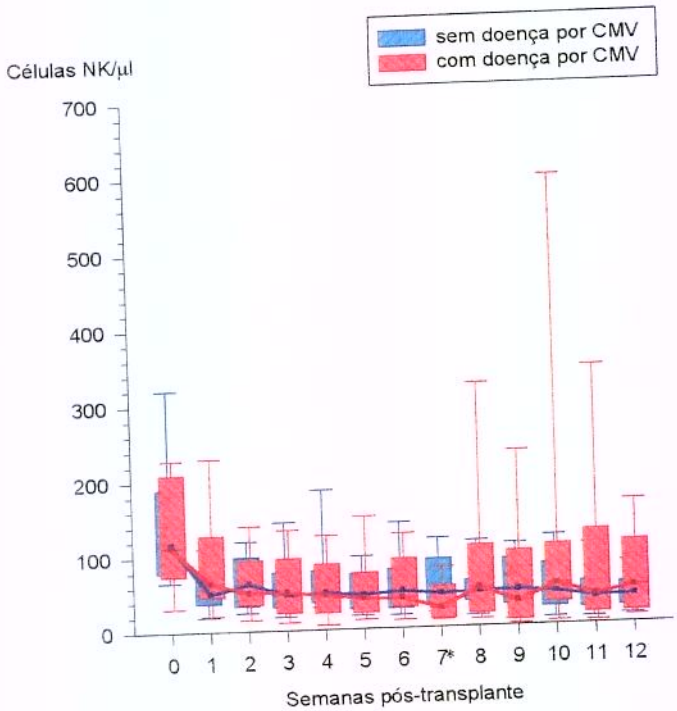


Figura 17 - Representação gráfica dos valores absolutos de células NK (CD3-CD(16+56)+) entre os transplantados renais com provável doença por CMV (vermelho) e entre os sem doença (azul) $p<0,05$

Discussão

4 DISCUSSÃO

O citomegalovírus é um dos agentes infecciosos mais importantes que acometem pacientes transplantados e é responsável pela significante morbidade e mortalidade apresentada pelos receptores de órgãos (Rubin, 1993; St. George e Rinaldo CR, 1999).

O advento de drogas específicas eficazes para o tratamento das infecções causadas pelo CMV, e o estudo das interações entre o sistema imunológico do transplantado na presença do vírus têm como objetivo reduzir o impacto clínico desta infecção nos grupos de risco.

Um dos métodos utilizados para o diagnóstico da infecção ativa pelo CMV é a detecção de anticorpos específicos de classe IgG e IgM. Contra o CMV, em geral, essa detecção, em pacientes que pela primeira vez entraram em contato com o vírus, pode ser efetuada em poucas semanas após a infecção e persiste indefinidamente. A presença pregressa de anticorpos confere certo grau de proteção contra subseqüente doença por CMV, mas não protege contra reativação endógena do vírus latente ou de reinfecção por cepa exógena (Smiley et al., 1985; ABBAS, 1997)

Duas importantes razões para o uso clínico de testes sorológicos detectores de anticorpos contra o CMV no receptor de transplante incluem a identificação de indivíduos susceptíveis à infecção primária e rastreamento de doadores de sangue e órgãos, pelo risco da transmissão acarretada por portadores do CMV latente (Grundy et al., 1988; Rubin, 1990).

A partir da década de 80, foi introduzido o método imunoenzimático – ELISA – para diagnóstico da infecção pelo CMV. Esse tipo de reação sorológica mostrou-se mais sensível e específica quando comparada a técnicas como a IFI (imunofluorescência indireta) (Moore et al., 1985; Demmler et al., 1988; Miller et al., 1989).

Os resultados do presente trabalho, para a detecção de anticorpos anti-CMV, com o método ELISA, mostraram que 56 receptores dos 61 estudados eram soropositivos (91,8%) para o CMV antes do transplante.

Na análise do perfil sorológico dos receptores de rim, no momento do transplante, nossos resultados mostraram que os pacientes 5, 22, 28, 29, 43 e 44, soronegativos em relação ao CMV, encontravam-se sob risco de contrair infecção primária pelo CMV, após o transplante, pois seus doadores eram soropositivos.

Este estudo não utilizou a análise sorológica para o diagnóstico de infecção ativa por o CMV no período pós-transplante, pela limitação desse método em transplantados, devido à significativa imunossupressão a que estes pacientes são submetidos, o que pode interferir na produção de imunoglobulinas e resultar em dados incorretos (Drago et al., 2000). Além disso, Vendrell e col. (1991) demonstraram que a secreção *in vitro* de anticorpos anti-CMV de classe IgM em sobrenadantes só pode ser observada de 2 a 3 semanas após o aparecimento de manifestações clínicas, tornando o diagnóstico da doença muito tardio.

Além da sorologia, dispomos de outras técnicas para o diagnóstico da infecção pelo CMV, tais como cultura viral, antigenemia e PCR.

A técnica da antigenemia para a monitorização da infecção pelo CMV tem-se mostrado de grande valia no seguimento de pacientes com doença pelo CMV (van den Berg et al., 1992), por ser um teste capaz de detectar a infecção, em leucócitos circulantes, particularmente nos granulócitos, mesmo antes da doença estar clinicamente aparente (Gotti et al., 1996) e de monitorizar os mesmos durante a infecção (St. George and Rinaldo CR, 1999).

É uma técnica rápida, sensível e específica (Bittsch et al., 1993; Gotti et al., 1996; Schröeder e col., 1999). A detecção precoce de antígenos virais em leucócitos de sangue periférico parece se adequar melhor para orientar o início de um tratamento precoce do que a cultura viral, uma vez que, nos estudos de Winston et al. (1995), 60% dos pacientes que desenvolveram doença por CMV não apresentaram culturas positivas antes dos sintomas clínicos, mostrando que culturas semanais além de laboriosas podem ser falso negativas (St. George and Rinaldo CR, 1999).

Nossos achados estão de acordo com estudos prévios, mostrando que a antigenemia é um método adequado para diagnóstico da infecção ativa pelo CMV. Nenhum paciente com antigenemia negativa, ao longo dos três meses de estudo, desenvolveu doença pelo CMV (Gómez et al., 1999; Schröedet e col., 1999).

Quanto a ser um marcador precoce de infecção, somente o paciente 53 apresentou sintomas clínicos associados à doença pelo CMV anteriores à antigenemia tornar-se positiva. Já os pacientes 10, 11, 16, 17, 20, 22, 24, 25, 28, 30, 40, 43, 44, 46, 47, 56, 58 positivaram a antigenemia antes do aparecimento de qualquer sintoma clínico. Nos pacientes número 2 e 29, a antigenemia não foi determinada em algumas semanas anteriores ao aparecimento dos sintomas clínicos. Estes resultados demonstram que a antigenemia foi um marcador precoce de infecção ativa pelo CMV na maioria dos pacientes estudados.

Poucos são os estudos que comparam os resultados quantitativos da antigenemia entre diferentes laboratórios. Uma vez que cada laboratório usa uma metodologia diferente, torna-se cada vez mais necessário uma padronização destas medidas. A variação intralaboratório na leitura das lâminas para a quantificação do número de células positivas varia de 9-101%, dependendo do grau de positividade. Alguns fatores podem ser responsáveis por isto: a baixa frequência de células positivas e sua grande variabilidade, a perda de leucócitos durante o procedimento de centrifugação (perdas na ordem de 35-65%) ou em alguma outra etapa da técnica (The et al., 1995).

Rubin (1993) demonstrou que os níveis de antigenemia estão correlacionados positivamente com a sintomatologia. Em 357 amostras de sangue examinadas o risco de doença por CMV foi zero na ausência de antigenemia, 10% em associação com níveis de 0,5 a 5 células positivas em 50.000 leucócitos estudados e de 70% em casos de mais de 50 células positivas em 50.000 leucócitos.

Quando observamos os estudos de St George and Rinaldo CR (1999), constatamos uma mediana baixa de células positivas (15 células positivas/200.000 leucócitos) em transplantados de rim, quando comparados com outros tipos de transplante, tais como pulmão (689 células positivas/200.000 leucócitos), coração (80 células positivas/200.000 leucócitos) e medula óssea (16 células positivas/200.000 leucócitos).

O número de células positivas, encontrado no nosso estudo, variou de 3 a 573, não tendo nenhuma correlação com a gravidade da doença pelo CMV. Como exemplo, podemos citar os pacientes 2, 11, 20, 22, 28, 29 e 44 com doença grave e um baixo número de células positivas (de 3 a 6) e os pacientes com doença leve 30, 53 e 58 que apresentaram até 107 células positivas. Estes resultados diferem dos achados de Schröeder et al. (1999) em que o grupo de pacientes com doença ativa pelo CMV apresentou uma média de células pp65 positivas de 158 ± 298 (variando de 2 a 1350), comparado com 9,5 ± 13,6 (1 a 69) no grupo com antigenemia positiva, mas sem nenhum sinal ou sintoma de doença ativa pelo CMV.

Existem algumas etapas dos procedimentos técnicos da antigenemia que poderiam interferir, significativamente, na diminuição do número de células positivas, ou seja, a sensibilidade do teste. Entre os fixadores que podem ser usados, estudos demonstram que formaldeido/NP40 daria um número de células maiores que outros fixadores, tais como a acetona usada em nosso estudo. O formaldeído/NP40 preserva muito bem a morfologia da célula, produz o mínimo de coloração de fundo e artefatos e um sinal específico (Gerna et al.,1992; Boeckh et al., 1994). Quanto aos anticorpos monoclonais usados, eles devem ser específicos contra a proteína pp65. Recomenda-se usar uma combinação de diferentes anticorpos monoclonais contra diferentes epítopos para se obter uma melhor sensibilidade

do método (isto é C10/C11 (Biotest, Dreieich, Germany) ou 2A6/1C3). Gerna et al. (1992) demonstraram um número maior de células positivas usando os anticorpos 2A6/1C3 ao invés dos anticorpos C10/C11. Além do que a técnica de coloração por imunofluorescência poderia apresentar melhores resultados que a imunoperoxidase usada em nosso trabalho (St. George and Rinaldo CR, 1999).

Nossos resultados de infecção e doença por CMV em receptores de rim (78,7% X 32,8% respectivamente) estão de acordo com dados de literatura nacional (Costa et al., 1999), mostrando uma alta incidência de infecção ativa por CMV em transplantados de rim.

Dos 41 pacientes que não apresentaram nenhum sinal de doença nos três meses pós-tx, 28 positivaram a antigenemia em algum momento do estudo, confirmando estudos anteriores de que CMV viremia/antigenemia pode ocorrer em pacientes assintomáticos (Drago et al., 2000).

Entre os pacientes que apresentaram doença pelo CMV, podemos dividi-los em dois grupos: os pacientes com doença leve (16, 17, 25, 30, 47, 53, 56 e 58) e os pacientes com doença grave (2, 10, 11, 20, 22, 24, 28, 29, 40, 43, 44 e 46).

A infecção primária pelo CMV em receptores de rim, normalmente, ocorre em pacientes soronegativos para o CMV que receberam um rim de um paciente soropositivo. A forma primária de infecção é mais virulenta que a forma de reativação do vírus. Os pacientes (22, 29, 43 e 44) que eram soronegativos no pré-transplante e foram transplantados com doadores soropositivos desenvolveram doença grave pelo CMV. A sorologia dos doadores dos pacientes 5 e 28 (soronegativos no pré-transplante) não foi determinada no momento pré-transplante. Uma vez que o paciente 28 desenvolveu doença grave pelo CMV após o transplante e não tenha sido exposto a nenhum outro fator de risco, supomos que ele tenha recebido o rim de um doador soropositivo.

O tempo mediano de ocorrência da doença por CMV foi na 6ª semana pós-transplante, variando entre a 2ª e a 11ª semanas, confirmando o primeiro trimestre pós-

transplante como o período de maior risco de contrair a doença pelo CMV (Rook et al., 1984; Dafoe et al., 1987).

A detecção rápida do CMV em sangue periférico tem sido objeto de vários estudos, com o objetivo de correlacionar a viremia com uma resposta clínica, mas no seguimento da doença pelo CMV devemos, também, considerar o quanto a resposta celular imune está comprometida. A utilização da monitorização de subpopulações linfocitárias para este fim ainda não foi claramente definida na era da utilização da ciclosporina como droga imunossupressora.

A infecção pelo CMV é conhecida por provocar alterações nas subpopulações linfocitárias no sangue periférico (Wramner et al., 1995).

Vários grupos demonstraram que a ausência de uma imunidade celular em receptores de órgãos é um importante fator para o desenvolvimento de doença pelo CMV (Rook et al., 1984; Reusser et al., 1991; Aguado et al., 1995; Zeevi et al., 1998; Zaia et al., 2000).

A hipótese de que a resposta imune celular possa ser monitorada *in vivo* por imunofenotipagem é de grande interesse prático. O uso de anticorpos monoclonais e a introdução dos citômetros de fluxo nos laboratórios tornou possível uma monitorização rápida e não invasiva das populações linfocitárias em uma grande variedade de situações. A reprodutibilidade deste método permite a análise de amostras em série, como foi realizado neste estudo. Além do que, as técnicas de medida da atividade de linfócitos T citotóxicos ou de células NK são mais laboriosas e requerem maior disponibilidade de tempo e espaço, sendo, também, de custos mais elevados.

Vários estudos em sangue periférico foram realizados para o diagnóstico de rejeição e infecção após o transplante de rim (Trinidade et al., 1992; Beik et al., 1998). No entanto, torna-se difícil encontrar diferenças proeminentes nos valores absolutos destas subpopulações entre uma fase latente e uma fase ativa de rejeição ou infecção (Takahara et al., 1989). Além disso, as determinações quantitativas destas subpopulações foram

realizadas somente durante o período ativo, não tendo dados sobre os períodos anteriores ao episódio de rejeição ou infecção. Infelizmente, estudos anteriores encontraram correlações entre subpopulações linfocitárias e eventos clínicos que são significativos somente em um senso estatístico e que possuem um valor prático muito pequeno, quando aplicado a um paciente individual. Também, variações nos protocolos de drogas imunossupressoras usadas, variações nas técnicas de quantificação das células, heterogeneidade dos anticorpos monoclonais usados e diferentes métodos de análise destes achados tornou a interpretação e correlação destes dados problemáticos. Conseqüentemente, muitos resultados conflitantes apareceram na literatura (Siegel et al., 1989).

Neste estudo, nós medimos a evolução das quantidades de diferentes populações linfocitárias, incluindo as células NK em sangue periférico nos três primeiros meses pós-transplante renal, independente da presença ou ausência de doença por CMV. Examinamos somente alterações fenotípicas de diferentes populações de células e não tivemos como objetivo medir a especificidade ou as funções das mesmas.

O número de linfócitos T totais foi caracterizado pelo marcador CD3+. A vantagem da realização da análise multiparamétrica pela citometria de fluxo permitiu a identificação de subpopulações linfocitárias, tais como linfocitos T auxiliares pela presença de CD3+CD4+ e linfócitos T citotóxicos CD3+CD8+. Linfócitos B foram caracterizados pelo marcador CD19+, linfócitos T ativados pelos marcadores CD3+HLA-DR+ e células NK pela presença de CD3-CD(16+56)+.

O número absoluto das células estudadas não diferiu entre os grupos com e sem doença no momento pré-transplante. Logo, não houve diferença nos níveis de nenhuma célula que pudesse predizer algum comportamento no pós-transplante, tais como tendência à doença ou não pelo CMV.

Logo após o transplante, nossos resultados demonstraram uma redução do número absoluto de subpopulações de células T, podendo ser atribuída às altas doses de drogas imunossupressoras usadas, as quais são reduzidas gradualmente com o passar do tempo. As

variações apresentadas nas duas primeiras semanas após o transplante renal estão de acordo com dados de literatura (Trinidade et al., 1992), e não variaram entre os dois grupos.

Rook et al. (1984) demonstraram a diminuição, também, da atividade de LTCs e de células NK neste mesmo período. A diminuição do número absoluto e da resposta citotóxica específica e não específica ao vírus, imediatamente após o transplante, refletem o efeito das drogas imunossupressoras e deve estar relacionada à alta freqüência de reativação da infecção pelo CMV em receptores de rim.

O aumento de linfócitos B imediatamente após o transplante, enquanto valores de linfócitos T diminuem, pode ser uma conseqüência do uso de terapia imunossupressora com metilprednisolona, uma vez que está descrito que esta droga induz o aumento de linfócitos B circulantes (Trinidade et al., 1992).

Quanto às células NK, muitos são os fatores que podem explicar a diminuição do valor absoluto das mesmas após o transplante renal. O *stress* da cirurgia pode alterar a imunocompetência. Os corticosteróides são conhecidos depressores da atividade das células NK, assim como o uso da ciclosporina através da inibição de IL-2 (Cooksey et al.,1984).

Como a azatioprina induz uma grave depressão na atividade de células NK circulantes, não é surpresa que os níveis das células NK dos nossos pacientes permaneçam baixos uma vez que eles estão em protocolo de imunossupressão tríplice (Siegel et al., 1989).

Entre a 2ª e 7ª semanas pós-transplante, o número absoluto dos linfócitos T totais, linfócitos Th e LTCs do grupo com doença pelo CMV apresentou uma diminuição acentuada, diferindo significativamente do grupo sem doença. Este período coincide com o período mediano de ocorrência da doença pelo CMV, caracterizando a diminuição de uma resposta celular antes do episódio clínico com a posterior instalação da doença pelo CMV. Esta acentuada diminuição de uma resposta celular parece alterar o sistema imunológico de tal forma que predispõe à doença pelo CMV. Com exceção da 7ª semana, os linfócitos B não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos ao longo do estudo.

Após a 7ª semana, nosso estudo mostrou uma elevação nos valores absolutos dos linfócitos T totais, sendo os LTCs (CD8+) os de aumento mais significativo, mas linfócitos Th (CD4+) também se elevaram. Este aumento de LTCs pode representar um caminho efetor de ativação envolvido no processo de recuperação da doença pelo CMV ou pode ser um achado não específico refletindo, assim, a ativação do sistema imune.

Uma vez que todos os pacientes recuperaram da doença pelo CMV, nosso estudo sugere que os LTCs participam da recuperação da infecção pelo CMV (Rook et al., 1984; Reddehase et al. ,1985; Reusser et al., 1991; Nordøy et al., 1999). Visto que grande parte dos pacientes apresentou infecção por reativação do vírus latente ou por aquisição de cepas exógenas vindas de órgãos transplantados, a resposta de LTCs parece não estar correlacionada com a supressão da infecção, mas poderia proteger contra uma doença grave pelo CMV (Reusser et al., 1999). Estas células efetoras parecem estar envolvidas no controle da infecção por limitar a carga viral sistêmica.

Enquanto o papel dos LTCs na recuperação da doença pelo CMV tem sido demonstrado como essencial, a participação dos linfócitos Th CD4+ ainda parece controversa (Komanduri et al., 2001). Nossos resultados, assim como os de Rager-Zisman e col. (1994) sugerem que ambas as subpopulações de células T participam do processo de proteção contra a infecção fatal pelo CMV.

A necessidade da participação de várias subpopulações linfocitárias na proteção contra doenças virais tem sido discutida na literatura. Em experimentos com transferência de células de baço, a depleção total de linfócitos T elimina a função curativa dos mesmos, enquanto que, quando apenas uma subpopulação é suprimida, este efeito é parcial (Rager-Zisman et al., 1994).

Jonjic et al. (1990) demonstraram que, na ausência de linfócitos T CD8+, os linfócitos T CD4+ adquirem uma atividade protetora compensatória, ausente em camundongos normais que estão se recuperando de uma infecção viral.

Em transplantados de pulmão, foi demonstrada uma baixa frequência de resposta de linfócitos Th contra diferentes proteínas do CMV em todos os pacientes que desenvolveram doença ativa pelo CMV (Zeevi et al., 1998). Além da diminuição da atividade de linfócitos Th, houve também diminuição significativa dos valores absolutos desses linfócitos antes do desenvolvimento de doença ativa. Em nosso estudo, foi encontrada a mesma situação, a qual reflete a dificuldade do sistema imune em montar uma resposta primária contra o CMV.

Os LTCs e as células NK parecem ter um papel complementar na recuperação da infecção pelo CMV. A recuperação da doença coincide com uma expansão e ativação de LTCs e de células NK. Na infecção primária, ambas as subpopulações atuam; enquanto nas infecções secundárias, somente os LTCs estariam envolvidos no processo. A ativação de linfócitos T CD8+ foi associada com a recuperação tanto da infecção primária como da infecção secundária e com um baixo risco de recaída após a terapia antiviral. Já as células NK CD56+ respondem principalmente durante a infecção primária e parecem ser menos importantes na recuperação da infecção secundária, e na recaída de infecção pelo CMV (Van den Berg et al., 1993b). A resposta celular não específica pode limitar a replicação viral e a disseminação da doença durante uma fase precoce ou na infecção primária, enquanto que uma resposta celular específica seria necessária para controlar e manter a latência do vírus. Em uma infecção secundária esta resposta específica poderia ser mobilizada mais rapidamente e as células NK passariam a ter uma função menos importante.

Experimentos em modelos murinos para o CMV demonstraram que as células NK protegem contra uma infecção fatal pelo CMV (Bukowski et al., 1984,1985; Rager-Zisman et al., 1994). Nossos resultados não apresentaram um envolvimento expressivo das células NK em ambos os grupos estudados, com exceção da 6ª semana quando existe uma diminuição significativa do número absoluto das células NK no grupo com doença pelo CMV, não detectada no grupo sem doença. O período de recuperação da doença não foi acompanhado por um aumento significativo das células NK.

Estes resultados podem ser explicados pelo pequeno número de casos de infecção primária do nosso estudo. A maioria dos pacientes apresentaram infecção secundária ou reinfecção pelo CMV, uma vez que 90,2% dos pacientes estudados apresentavam sorologia positiva para o CMV no pré-transplante.

Dos 20 pacientes estudados com doença pelo CMV, 16 apresentaram infecção secundária. Na infecção secundária, teríamos a neutralização do vírus pela imunidade humoral pré-existente (Drago et al., 2000).

Nossos resultados mostraram uma elevação no número absoluto de linfócitos T que expressam o antígeno de ativação HLA-DR.

A ciclosporina é conhecida como um inibidor da expressão do antígeno HLA-DR em linfócitos T. Estudos mostram que a expressão de HLA-DR aumenta durante episódios de rejeição em pacientes tratados com azatioprina e prednisolona, mas não aumenta em pacientes tratados com ciclosporina e prednisolona ou só cilosporina (Siegel et al., 1989).

Este estudo demonstrou que o aumento da expressão de HLA-DR por linfócitos T aconteceu na presença de ciclosporina durante a doença pelo CMV. Isso sugere a possibilidade do vírus induzir a ativação de células T, ocorrendo o aumento da expressão de HLA-DR, como uma via efetora alternativa da resposta ao CMV.

Analisando em conjunto nossos resultados, verificamos que a 6ª semana pós-transplante foi de maior risco para os transplantados de contrair doença pelo CMV e que o número absoluto de linfócitos T CD8+, linfócitos T CD4+ e linfócitos T co-expressando HLA-DR está significativamente diminuído antes da doença, sendo que estes valores se elevam significativamente com a recuperação da mesma. Embora as alterações nestas populações de células não dêem um diagnóstico definitivo de doença pelo CMV, a conformidade dos padrões descritos darão suporte diagnóstico para a suspeita de doença pelo CMV, permitindo um melhor monitoramento do paciente.

Nosso estudo não foi capaz de alcançar valores absolutos de subpopulações linfocitárias capazes de determinar presença ou ausência de doença grave pelo CMV, o que sugere que estas variáveis sozinhas não são suficientes para serem utilizadas como um método de screening de doença para o CMV. Outro aspecto importante é que a análise por citometria de fluxo fornece uma rápida informação (fenotipicamente) sobre o número de células supressoras/indutoras e efetoras circulantes em pacientes transplantados, as quais anteriormente tinham que ser demonstradas através de testes laboriosos de medidas funcionais *in vitro* (Hanås et al., 1989).

Outro aspecto seria que testes funcionais, *in vitro*, utilizam um número fixo de células mononucleares e não levam em conta o número real absoluto, por milímetro de sangue, das diferentes subpopulações no período pós-transplante. Ou seja, não leva em conta variações interindividuais. A avaliação do número absoluto poderia, em muitos casos, fornecer uma estimativa mais relevante da reatividade do sistema imune do que as medidas funcionais (Van den Berg et al., 1992).

Qual o fator ou fatores determinantes que predispõem determinado paciente a desenvolver a doença pelo CMV, ainda, é incerto. Fatores genéticos, infecções preexistentes ou diferentes susceptibilidades a drogas imunossupressoras podem estar implicadas (Drago et al., 2000).

Nossos resultados possuem importantes implicações clínicas, possivelmente estabelecendo um "grupo de risco" para o desenvolvimento de doença por CMV. Assim, a monitorização de diferentes subpopulações linfocitárias juntamente com a antigenemia podem ser extremamente úteis na seleção de pacientes de "alto risco" para desenvolver doença pelo CMV, possibilitando a introdução precoce de terapia antiviral ou redução da terapia imunossupressora. Embora outros estudos sejam necessários, principalmente para verificação do envolvimento de outras populações de células, nossos resultados são relevantes e de interesse para estudos posteriores sobre o envolvimento do sistema imune contra a doença pelo CMV em humanos.

Conclusões

CONCLUSÕES

1. Os resultados do presente trabalho mostraram que 90,2% dos receptores de transplante renal estudados eram soropositivos para o CMV no pré-transplante. Esses resultados são compatíveis com dados da literatura que apontam prevalências de infecção pelo CMV, com variação entre 80 a 100% quando populações de reduzido nível socioeconômico são analisadas.

2. A técnica da antigenemia utilizada neste trabalho para a detecção de infecção ativa pelo CMV revelou que 78,7% dos pacientes estudados apresentaram infecção ativa pelo CMV no pós-transplante, 32,78% dos transplantados renais desenvolveram doença pelo CMV, na maioria dos casos, caracterizada como uma síndrome "mononucleose like".

3. Nenhum paciente com antigenemia negativa desenvolveu doença por CMV.

4. A antigenemia positiva antecedeu o quadro clínico de provável doença por CMV na quase totalidade dos casos estudados.

5. Analisando em conjunto nossos resultados, verificamos que a 6ª semana pós-transplante foi de maior risco para os transplantados de contrair doença pelo CMV.

6. O número absoluto de linfócitos T citotóxicos, de linfócitos T auxiliares e de linfócitos T co-expressando o marcador de ativação HLA-DR estão diminuídos

na fase anterior ao episódio de doença pelo CMV e aumentam na fase de recuperação da doença em pacientes transplantados de rim.

7. Os resultados do nosso trabalho indicam que o número absoluto das células NK parece não ser relevante nas infecções secundárias causadas pelo CMV, uma vez que a maioria dos pacientes teve infecção secundária e esta subpopulação de linfócitos não apresentou diferenças significativas ao longo do estudo.

8. O número absoluto de linfócitos B não apresentou variações significativas entre os grupos estudados.

9. Não foi objetivo deste trabalho medir a atividade de diferentes populações de células. Para mais conclusões sobre os mecanismos envolvidos na ativação do sistema imune na doença pelo CMV, estudos envolvendo outras subpopulações tornam-se necessários

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A., LICHTMAN, A., POBER, J. *Cellular and Molecular Immunology*. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997.

AGUADO, S. et al. Cytomegaloviraemia and T cell subpopulations in renal transplant patients. *Nephrol Dial Transplant*. 10 (suppl.6): 120-121, 1995.

ALFORD, C.A., BRITT, W. Cytomegalovirus. In: FIELDS, B.N., KNIPE, D.N. (ed.). *Virology*. 2. ed. New York: Raven Press,1990, p. 1981-2010.

BEIK, A.I. et al. Serial flow cytometric analysis of T-cell surface markers can be useful in differential diagnosis of renal allograft dysfunction. *Clin Transplantation*, 12:24-29, 1998.

BIRON, C.A., BYRON, K.S., SULLIVAN, J.L. Severe herpevirus infections in an adolescent without natural killer cells. *New England Journal of Medicine*, 320:1731-1735, 1989.

BITSCH, A. et al. The long persistence of CMV DNA in the blood of renal transplant patients after recovery from CMV infection. *Transplantation*, 56:108-113, 1993.

BOECKH, M. et al. Factors influencing detection of quantitative cytomegalovirus antigenemia. *J Clin Microbiol*, 32:832-834. 1994.

BUKOWSKI, J.F., WODA, B.A., WELSH, R.M. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *Journal of Virology* 52:119-128, 1984.

BUKOWSKI, J.F. et al. Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 161:40-52, 1985.

CASTRO, S.M. et al. Considerações Imunológicas e Clínicas. In: NEUMANN e col. (eds.). *Transplante de Órgãos e Tecidos*. São Paulo: Sarvier, p.03, 1997.

CHOU, S., NORMAN, D.J. Effect of OKT3 antibody therapy on cytomegalovirus reactivation in renal transplant recipients. *Transplant Proc*, 17:2755-2756, 1985.

COSOMI, B.A. et al. Use of monoclonal antibodies to T-cells subsets for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts. *N Engl J Med*, 305:308-314, 1981.

COSTA, S.C.B. et al. Donated organs as a source of cytomegalovirus (CMV) in renal transplant patients. *Braz J Med Biol Res*, 27:2573-2578, 1994.

COSTA, S.C.B. et al. Detection of cytomegalovirus infections by PCR in renal transplant patients. *Braz J Med Biol Res,* 32(8):953-959, 1999.

CRAIHEAD, J.E., HANSHAW, J.B., CARPENTER, C.B. Cytomegalovirus infections after renal allotransplantation. *J.A.M.A.*, 201:725, 1967.

DAFOE, D.C. et al. T cell subset patterns in cyclosporine-treated renal transplant recipients with primary cytomegalovirus disease. *Transplantation,* 43:452-454, 1987.

DEMMLER, G.J. et al. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using Polymerase Chain Reaction DNA Amplification. *J Infect Dis*, 158:1177-1184, 1988.

DRAGO, F. et al. Cytomegalovirus infection in normal and immunocompromised humans. A review. *Dermatology*, 200:189-195, 2000.

FARREL, H., et al. Cytomegalovirus MHC class I homologues and natural killer cells: na overview. *Microbes and Infection*, 2:521-532, 2000.

FARRUGIA, E., SCHWAB, T.R. Subspecialty clinics: Nephrology. *Mayo Clin Proc*, 67:879, 1992.

FIALA, M. et al. Epidemiology of cytomegalovirus infection after transplantation and imunosuppression. *J Infect Dis*, 132:421, 1975.

FRYD, D.S., PETERSON, P.K., FERGUSON, R. Cytomegalovirus as a risk factor in renal transplantation. *Transplantation*, 30:436-439, 1980.

GERNA, G. et al. Comparison of different immunostaining techniques and monoclonal antibodies to the lower matrix phosphoprotein (pp65) for optimal quantification of human cytomegalovirus antigenemia. *J Clin Microbiol,* 30:1232-1237, 1992.

GÓMEZ, E. et al. Control of cytomegalovirus disease in renal transplant patients treated with prednisone, azathioprine and cyclosporine using intensive monitoring and decreased immunosuppression. *Nephron*, 82:238-245, 1999.

GOODMAN, C.M., HARGREAVE, T.B. Survey of antibiotic prophylaxis in European renal transplantation practice. Internar. *Urol. Nephrol.* 22:173, 1990.

GOODRICH, J.M. et al. Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogenic bone marrow transplantation. *N Engl J Med*, 325:1601, 1991.

GOTTI, E. et al. Early ganciclovir therapy effectively controls viremia and avoids the need for cytomegalovirus (CMV) prophylaxis in renal transplant patients with cytomegalovirus antigenemia. *Transplantation,* 10:550-555, 1996.

GRATTAN, M.T. et al. Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. *JAMA*, 261:3561, 1989.

GREFTE, J.M. et al. The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in peripheral blood leukocytes during na active cytomegalovirus infection. *J Gen Virol*, 73:2923-2932, 1992.

GRIFFITHS, P.D. et al. Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients by detection of early antigen fluorescent foci. *Lancet*, 2:1242, 1984.

GROSSI, P. et al. Clinical and virological monitoring of human cytomegalovirus infection in 294 heart transplant recipients. *Transplantation*, 59: 847, 1995.

GRUNDY, J.E. et al. Symptomatic cytomegalovirus infection in seropositive kidney recipients: reinfection with donor virus rather than reactivation of recipient virus. *Lancet*, ii:132, 1988.

GUERIN, C. et al. Incidence of cytomegalovirus infection in renal transplant patients treated with conventional or cyclosporin therapy. *Nephrol Dial Transplant*, 3:77-80, 1988.

HANÅS, E. et al. Circulating T-Lymphocyte Sub-subsets and NK-like cells in renal transplant patients: Patterns associated with rejection. *Nephrol Dial Transplant*, 4:735-739, 1989.

HERBERMAN, R.B., REYNOLDS, C.W., ORTALDO, J. Mechanisms of cytotoxicity by natural killer (NK) cells. *Annual Review of Immunology*, 4:651-680,1986.

HERCEND, T. et al. Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated antigens NKH1 and NKH2 expressed on subsets of large granular lymphocytes. *J Clin Invest*, 75:932, 1985.

HO, M. et al. The transplanted kidney as a source of cutomegalovirus infections. *N Engl J Med*, 293:1109-1112, 1975.

HO, M. Epidemiology of cytomegalovirus infections. *Rev Infec Dis*, 12 (7):701-710, 1990.

HOLBERG-PETERSEN, M. Interaction betweeen human cytomegalovirus and host cells. Effect on cellular functions related to antimicrobial host defense. *Institute of Microbiology, University of Oslo, Rikshospitalet*, N-0027, Oslo, Norway, 2000.

JONG M.D. et al. Summary of the II International symposium on cytomegalovirus. *Antiviral Research*, 39:141-162, 1998.

JONJIC, S. et al. Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes. *J Virol*, 64 (11):5457-64, 1990.

JONJIC, S. et al. Antibodies are not essencial for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J. Exp. Med.*, 179:1713-1717, 1994.

KAPASI, K., RICE, G.P.A. Cytomegalovirus infection of peripheral blood mononuclear cells: effects on interleukin-1 and -2 production and responsiveness. *J. Virol.*, 62:3603, 1988.

KEITEL, E., BITTAR, A.E., GARCIA, V.D. Aspectos Clínicos do Transplante Renal. In: NEUMANN e col. (eds.). *Transplante de Órgãos e Tecidos*. São Paulo: Sarvier, p.143, 1997.

KÖHLER,G., MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256:495, 1975.

KOMANDURI, K.V. et al. Direct measurement of CD4+ and CD8+ T-cell responses to CMV in HIV-I-infected subjects. *Virology*, 279 (2):459-70, 2001.

LANIER, L.L. et al. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19(NKH-1) antigen expression of human peripheral blood NK cells and citotoxic T lymphocytes. *J Immunol*, 136:4480, 1986.

McCOY, J.P. Flow Cytometry and Clinical Diagnosis. In: HURTUBISE, K.H. (ed.). *Basic Principles in Clinical Flow Cytometry*. Chicago: ASCP Press, 26, 1994.

MERIGAN, T.C., RESTA, S. Cytomegalovirus: Where have we been and where are we going? *Rev Infect Dis*, 12 (suppl 7):693-700, 1990.

MILLER, H. et al. Comparison of immunoblotting with other serological methods and virus isolation for the early detection of primary cytomegalovirus infection in allograft recipients. *J Clin Microbiol*, 27:2672-2677, 1989.

MOCELIN, A.J. et al. Infecção em transplantes renais. In: NEUMANN e col. (eds.). *Transplante de Órgãos e Tecidos*. São Paulo: Sarvier, p. 200, 1997.

MOORE, D.G. et al. Reactivity of serologic tests for the detection of antibody specific to cytomegalovirus. *Am J Clin Pathol*, 83:622-625, 1985.

MORETTA, A. et al. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu. Rev Immunol*, 14:619-648, 1996.

MORRIS, P.J. et al. Low dose oral prednisolone in renal transplantation. *Lancet* 7:525, 1982.

MORRIS, P.J. *Kidney Transplantation*. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994.

MUSTAFA, M.M. Cytomegalovirus infection and disease in the immunocompromised host. *Pediatr Infect Dis J*, 13:249-259, 1994.

NORDØY, I. et al. Immunologic parameters as predictive factors of cytomegalovirus disease in renal allograft recipients. *J Infect Dis*, 180:195-198, 1999.

ORFAO, A., RUIZ-ARGUELLES, A. Citometria de Flujo. In: *Enciclopédia Ibero-Americana de Hematologia*. Salamanca/Espanha: 1992.

PANNUTI, C.S. et al. Detecção de anticorpos IgM nas infecções primárias e secundárias pelo citomegalovirus em pacientes subemtidos a transplante renal. *Rev Inst Med Trop SP*, 29:317-322, 1987.

PASS, R.F. et al. Productive infection with cytomegalovirus and herpes simplex virus in renal transplant recipients: role of source of kidney. *J Infect Dis*, 137:556-563, 1978.

PETERSON, P.K. et al. Cytomegalovirus disease in renal allograft recipients: a pprospective study of the clinical features, risk factors and impact on renal transplantation. *Medicine (Baltimore)*, 59:283-300, 1980.

PETERSON, P.K. et al. Fever in renal transplant recipients: causes, prognostic significance and changing patterns at the University of Minnesota Hospital. *Am.J Med*, 71:345, 1981.

POLLARD, A.B. Cytomegalovirus infections in renal, heart, heart-lung and liver transplantation. *Pediatr Infec Dis*, 7:97-102, 1988.

PORTELA, D. et al. OKT3 tretment for allograft rejection is a risk factor for cytomegalovirus disease in liver transplantation. *J Infect Dis*, 171:1014-1018, 1995.

RAGER-ZISMAN, B. et al. Thymic humoral factor, THF-γ2, enhances immunotherapy of murine cytomegalovirus (MCMV) infection by both CD4+ and CD8+ immune T cells. *Immunology Letters*, 39:23-31, 1994.

RAMOS, E.L. et al. Decrease in phenotypically defined T helper inducer cells (T4+4B4+) and increase in T supressor iffector cells (T8+2H4+) in stable renal allograft recipients. *Transplantation*, 47:465-471, 1989.

REDDEHASE, M.J. et al. Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *Journal of Virology*, 55:264-273, 1985.

REUSSER, P. et al. Cytomegalovirus (CMV)-specific T cell immunity after renal transplantation mediates protection from CMV disease by limiting the systemic virus load. *J Infect Dis*, 180:247-253. 1999.

RIDDELL, S.R., GREENBERG, P.D. T cell therapy of human CMV and EBV infection in immunocompromised hosts. *Rev. Med. Virol.*, 7:181-192, 1997.

RIDDELL, S.R., GREENBERG, P.D. T cell therapy of cytomegalovirus and human immunodeficiency virus infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45, Topic T3, 35-43, 2000.

ROOK, A.H. et al. Importance of cytotoxic lymphocytes during cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *American Journal of Medicine*, 76:385-392, 1984.

RUBIN, R.H. et al. Infections disease syndromes attributable to cytomegalovirus and their significance among renal transplant recipients. *Transplantation*, 24: 458-464, 1977.

RUBIN, R.H., LEVIN, M., COHEN, C. Summary of a workshop on cytomegalovirus infections during organ transplantation. *J Infect Dis*, 139:728-734, 1979.

RUBIN, R.H. et al. Infection in the renal transplant recipient. *Am. J. Med.*, 70:405, 1981.

RUBIN, R.H. Impact of Cytomegalovirus Infection on Organ Transplant Recipients. *Reviews of Infectious Diseases*, 12 (7):p.754-766, 1990.

RUBIN, R.H. Infectious disease complications of renal transplantation. *Kidney Int.*, 44:221, 1993.

REUSSER, P. et al. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: Pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood*, 78:1373-1380, 1991.

SCHMIDT, G.M. et al. A randomized, controlled trial of prophylactic ganciclovir for cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogenic bone marrow transplants. *N Engl J Med*, 324:1005, 1991.

SCHRÖEDER, R. et al. Cytomegalovirus antigenemia and renal function post-kidney-transplantation. *Transplantation Proceedings*, 31:3027-3028, 1999.

SHAPIRO, H.M. *Practical Flow Cytometry*. 3.ed. Wiley-Liss: Howard M. Shapiro, 1995.

SHIBATA, D. et al. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with Human Immunodeficiency Virus. *J Infect Dis*, 158:1185-1192, 1988.

SIEGEL, D.L. et al. Discriminating rejection from CMV infection in renal allograft recipientes using flow cytometry. *Clin Immunology and Immunopathology*, 51:157-171, 1989.

SIMMONS, R.L. et al. Clinical characteristics of the lethel cytomegalovirus infection following renal transplantation. *Surgery*, 82:537, 1977.

SINGH, N. et al. Infections with cytomegalovirus and other herpesviruses in 121 liver transplant recipients: transmission by donated organ and the effects of OKT3 antibodies. *J Infect Dis*, 158:124-131, 1988.

SMILEY, M.L. et al. The role of pretransplant immunity in protection from cytomegalovirus disease following renal transplantation. *Transplantation*, 40:157-161, 1985.

St. GEORGE K., RINALDO JR. C.R. Comparison of cytomegalovirus antigenemia and culture assays in patients on and off antiviral therapy. *J Med Virol*, 59 (1):91-97, 1999.

STENBERG, R.M., THOMSEN, D.R., STINSKI, M.F. Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomeglovirus. *J Virology*, 49:190-199, 1984.

STITES, D.P., TERR, A.L., PARSLOW, T.G. Clinical Laboratory Methods for Detection of Antigens and Antibodies. In: BOOKS LM (ed). *Basic Clinical Immunology*. 8.ed. USA: 189, 1994.

TAKAHARA, S. et al. Subpopulations of peripheral blood mononuclear cells are reliable for monitoring infiltrating monocuclear cells. *Transplantation Proceedings*, 21 (1): 1846-1851, 1989.

TEGMEIER, G.G. Posthransfusion, cytomegalovirus. *Arch Pathol Lab Med,* 113:236-245, 1989.

THE, T.H. et al. Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes: a review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. *Transplantation*, 54:193, 1992.

THE, T.H. et al. CMV infection after organ transplantation: immunopathological and clinical aspects. *Neth J Med*, 45:309, 1994.

THE, T.H. et al. The cytomegalovirus antigenemia assay: A plea for standardization. *Scand J Infect Dis Suppl.*, 99:25-29, 1995.

TRINCHIERI, G. Biology of natural killer cells. *Advances in Immunology*, 47:187-376, 1989.

TRINIDADE, H. et al. Lymphocyte populations in peripheral blood after kidney transplantation. *Transplantation Proceedings*, 24 (6):2553-2555, 1992.

VAN DEN BERG, A.P. et al. Cytomegalovirus antigenemia as a useful marker of symptomatic cytomegalovirus infection after renal transplantation – a report of 130 consecutive patients. *Transplantation*, 48:991-995, 1985.

VAN DEN BERG, A.P. et al. Recovery from cytomegalovirus infection is associated with activation of peripheral blood lymphocytes. *Journal of Infectious Diseases,* 166:1228-1235, 1992.

VAN DEN BERG, A.P. et al. Prediction of recurrent cytomegalovirus disease after treatment with ganciclovirin solid organ transplant recipients. *Transplantation*, 55:847-851, 1993a.

VAN DEN BERG, A.P. et al. Cellular immune activation reflects antiviral immunity and is a favorable prognostic marker in patients with cytomegalovirus infection. *Transplantation proceedings*, 25: 1419-1420, 1993b.

VAN DER BIJ, W. et al. Comparison of viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus infection in blood. *J. Clin. Microbiol.*, 26:2531, 1988a.

VAN DER BIJ, W., et al. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes. *J. Med. Virol.*, 25:179, 1988b.

VAN DORP, V.T. e cols. Infections in renal transplant patients treated with cyclosporine or azathioprine. Scand. *J. Infect. Dis.*, 21:75-80, 1989.

VAN ES, A. et al. Expression of HLA-DR on T-lymphocytes following renal transplantation, and association with graft rejection episodes and cytomegalovirus infection. *Transplantation*, 37:65, 1984.

VENDRELL, J. et al. Spontaneous in vitro secretion of antibody to cytomegalovirus (CMV) by human peripheral blood mononuclear cells: A new approach to studying the CMV-Immune system interaction. *J Infect Dis*, 164:1-7, 1991.

VENEMA, H. et al. Natural Killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *Journal of Medical Virology*, 42:188-192, 1994.

VERSTEEG, R. NK cells and T cells: mirror images? Immunology *Today*, 13:244-247, 1992.

VON WILLEBRAND, E. et al. Cytomegalovirus infection, Class II antigen expression and human kidney allograft rejection. *Transplantation*, 42:364, 1986.

WARRELL, M.J. et al. The effects of viral infection on renal transplants and their recipients. *Q. J. Med.*, 49:219, 1980.

WINSTON, D.J. et al. Randomised comparison of ganciclovir and high-dose acyclovir for long-term cytomegalovirus prophylaxis in liver-transplant recipients. *The Lancet*, 346:69, 1995.

WRAMNER, L. et al. Alterations of the post transplant blood lymphocyte phenotype subsets as a marker of rejection in renal allograft recipients. *Scand J Immunol*, 42:275-281, 1995.

ZAIA, J.A. et al. Status of cytomegalovirus prevention and treatment in 2000. *Hematology*, 339-355, 2000.

ZEEVI, A. et al. Clinical significance of CMV-specific helper responses in lung transplant recipients. *Human Immunology*, 59:768-775, 1998.