

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

**ADENOSINA DEAMINASE NO
DIAGNÓSTICO DE REJEIÇÃO AGUDA
APÓS O TRANSPLANTE RENAL**

Dra. ANA LÚCIA LIVI

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

Orientador:

Prof. Dr. LUIZ FELIPE SANTOS GONÇALVES

PORTO ALEGRE

1999

Dedicado aos meus pais, Valter e Iracy

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Luiz Felipe Santos Gonçalves, meu orientador

Prof. Dr. Carlos Alberto Prompt, que introduziu-me no curso do Mestrado

Dr. Hugo Goulart de Oliveira, pelo auxílio na elaboração do texto

Equipe de Transplante Renal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Professores, Médicos Contratados, Médicos Residentes e Enfermeiras do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Laboratório de Bioquímica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Sr. Edgar Mário Wagner, pela revisão das análises estatísticas

Sra Cleusa Denz dos Santos , pela revisão do texto

SUMÁRIO

Lista de Figuras
 Lista de Quadros
 Lista de Tabelas
 Lista de Abreviaturas

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	5
1.1. Rejeição Aguda.....	6
1.2. A Resposta Imune ao Aloenxerto.....	7
1.3. Avaliação Clínica e Diagnóstica de Rejeição Celular Aguda.....	12
1.4. Adenosina Deaminase (ADA)	16
1.5. Aplicações Clínicas da Adenosina Deaminase.....	20
1.6. Adenosina Deaminase e Rejeição a Órgão Transplantado	25
1.7. Métodos de Dosagem de Adenosina Deaminase.....	26
1.8. Objetivos.....	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1. Condições Ambientais	29
2.2. Delineamento de Pesquisa	29
2.3. Pacientes	29
2.3.1. Protocolo de Avaliação	30
2.3.2. Imunossupressão	31
2.3.3. Avaliação Laboratorial	31
2.3.4. Avaliação por Imagem	32
2.3.5. Avaliação por Punção Aspirativa Renal (PAR)	32
2.3.6. Avaliação por Biópsia Renal Percutânea (PBR).....	33
2.4. Dosagem de Atividade da ADA sérica	35
2.5. Critérios Diagnósticos	39
2.6. Análise Estatística.	41
2.6.1. Programas Utilizados	41
2.6.2. Avaliação dos Parâmetros Diagnósticos	41
3. RESULTADOS	43
3.1. Características da Amostra.....	43
3.2. Valores de ADA	43
3.3. ADA e Rejeição	46
3.4. Valores de ADA em pacientes anti-HCV positivos e com NTA	53
4. DISCUSSÃO	58
4.1. Características da Amostra	59
4.2. ADA e Rejeição.....	60
4.3. ADA como Método Diagnóstico.....	65
4.4. ADA, HCV e NTA	67
4.4.1. Hepatite C	67
4.4.2. NTA	71
4.4.3. ADA, Hepatite C, NTA e Rejeição	73
5. CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
LISTA DE FIGURAS	

Figura 1	Resposta Imune ao Aloenxerto.....	9
Figura 2	Representação Esquemática da rota metabólica da ADA.....	16
Figura 3	Mediana das ADAs de todos os pacientes durante o primeiro mês pós-transplante	44
Figura 4	Frequência dos episódios de rejeição aguda durante o período de acompanhamento pós-transplante	47
Figura 5	Medianas das ADAs dos pacientes com e sem rejeição.....	48
Figura 6	Rejeição em pacientes com e sem rejeição	50
Figura 7	Curva ROC	52
Figura 8	Valores de ADA durante o período pré, durante e pós- rejeição em pacientes com e sem anti-HCV	55
Figura 9	Valores de ADA durante o período pré, durante e pós- rejeição em pacientes com e sem NTA	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características dos Pacientes	43
Tabela 2	Mediana das ADAs	45
Tabela 3	Medianas das ADAs totais dos períodos pré, rejeição e pós-rejeição	46
Tabela 4	Mediana dos Valores de ADA nos períodos pré, durante e pós-rejeição dos pacientes com e sem rejeição aguda	49
Tabela 5	Pontos de Corte dos Valores de ADA como método diagnóstico ..	51
Tabela 6	ADA como Teste Diagnóstico	51
Tabela 7	Valores Medianos de ADA nos Pacientes com e sem anti- HCV e NTA	53
Tabela 8	ADA no Acompanhamento do Pós-tx dos Pacientes com anti-HCV e NTA.....	53
Tabela 9	ADA no Período de Rejeição nos Pacientes com e sem anti-HCV e NTA.....	54
Tabela 10	Mediana das ADAs totais dos períodos pré, rejeição e pós-rejeição em pacientes com NTA e/ou HCV+.....	56
Tabela 11	Mediana dos valores de ADA nos períodos pré, durante e pós-rejeição dos pacientes com NTA e/ou HCV+ de acordo com a presença ou não de rejeição aguda.....	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Comparação entre o Diagnóstico de Certeza e os Resultados do Teste Diagnóstico	42
-----------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA: Adenosina Deaminase
ADAPRÉ: ADA do período pré-rejeição
ADAREJ: ADA do período de rejeição
ADAPÓS: ADA do período pós-rejeição
ADCC: Citotoxicidade Celular Mediada por Anticorpos
ALT: Aspartato Transferase
AST: Aspartato Transaminase
BA: Branco da Amostra
BADA: Branco da Adenosina
BR: Branco do Reagente
CD: “Cluster of Differentiation”
CD8+: Células T citotóxicas
CD4+: Células T auxiliares
CPH: Complexo Principal de Histocompatibilidade
CMV: Citomegalovírus
DNA: Ácido Deoxiribonucléico
HbsAg: Antígeno de Superfície da hepatite B
HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HCV: Vírus da Hepatite C
HE: Hematoxilina e Eosina
Hepatite NANB: Hepatite Não-A Não-B
HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA: Antígeno Leucocitário Humano
ICAM-1: Molécula de Adesão Intercelular-1
ICT: Incremento Corrigido Total
Ig: Imunoglobulina
IL: Interleucina
Km: Coeficiente de Michaelis
KW: Kruskal-Wallis
LFA: Antígeno Associado à Função do Linfócito
MW: Mann-Whitney
NTA: Necrose Tubular Aguda
OKT-3: Anticorpo Monoclonal anti-CD3
PAR: Punção Aspirativa Renal
PAS: “Periodic-acid Schiff”
PASM: Prata Metamina
PBR: Biópsia Renal Percutânea
PCR: Reação em Cadeia de Polimerase
RCT: Receptores da Célula T
ROC: “Receiver Operator Characteristic ”
SAME: Serviço de Arquivo Médico e Estatístico
SSPS: Statistical Package for Social Sciences
Th1: Linfócitos Auxiliares Tipo 1
Th2: Linfócitos Auxiliares Tipo 2
VP+: Valor Preditivo positivo
VP-: Valor Preditivo Negativo

X²: Qui-Quadrado

RESUMO

O transplante renal representa atualmente a melhor opção terapêutica e de reabilitação para o paciente com insuficiência renal crônica terminal. As rejeições são as principais causas de perda dos rins transplantados e, entre essas, as rejeições agudas são as que apresentam maior relevância clínica. Desta maneira, a monitorização do transplante renal com vistas ao diagnóstico precoce da rejeição e seu rápido tratamento é de grande relevância no manejo adequado desses pacientes.

Como a rejeição celular aguda é mediada predominantemente por linfócitos T e, visto que, a enzima adenosina deaminase (ADA) é encontrada principalmente, a nível de sangue periférico, em linfócitos, objetivou-se com esse estudo, verificar a possível associação entre atividade sérica da ADA e a rejeição aguda do enxerto renal. Buscou-se, também, determinar a sua utilidade como método diagnóstico de rejeição celular aguda.

Foram acompanhados até 1 mês de internação 35 pacientes transplantados renais. Dosagens da atividade de ADA sérica foram feitas cinco vezes por semana e sempre que houvesse suspeita clínica de rejeição aguda. O diagnóstico de rejeição aguda foi estabelecido por 2 nefrologistas, aos quais foram omitidos os resultados dos níveis séricos ADA. Estes médicos tinham todas informações clínicas e laboratoriais, incluindo valores séricos de creatinina e ciclosporina, cintilografias, ecografias, citologia aspirativa, punção biópsia renal quando esta era realizada e resposta aos diferentes tratamentos imunossuppressores usados.

A análise estatística foi feita utilizando-se testes de Mann-Whitney e Qui-quadrado. O nível p menor do que 0,05 foi considerado como significativo.

A mediana dos episódios de rejeição celular aguda ficou entre o sexto e sétimo dia pós-transplante, havendo diferença estatisticamente significativa nos

valores de ADA no sexto dia de seguimento entre os pacientes com rejeição (60.16), em relação aos que não tiveram rejeição celular aguda (24,55) ($p=0,021$ MW).

Para se avaliar a eficácia da atividade sérica de ADA com método diagnóstico de rejeição aguda, empregou-se pontos de corte de valores de ADA >35, >40, >45, >50 e > que 30% dos valores do período pré-rejeição. Houve associação estatisticamente significativa entre ADA >30% e rejeição celular aguda ($p=0.035$ MW). Verificou-se, também, aumento significativos da atividade sérica de ADA em pacientes anti-HCV positivos e com necrose tubular aguda, sem interferência sobre os resultados dos episódios de rejeição celular aguda. Usando esses pontos de corte como parâmetros de diagnóstico para rejeição aguda observou-se: sensibilidade = 55,5%, especificidade = 82,3%, valor preditivo positivo = 76,9%, valor preditivo negativo = 63,6% e acurácia = 69,0%.

Conclui-se que há um aumento significativo da atividade sérica da ADA durante os episódios de rejeição aguda de enxertos renais humanos, encontrando-se associação significativa entre o aumento de 30% dos valores de ADA pré-rejeição e o diagnóstico de rejeição celular aguda.

ABSTRACT

Currently renal transplantation is the best therapeutic and rehabilitation option for patients with end stage renal failure. However, acute and chronic rejection still are the main causes of failure of transplanted kidneys. Among them, acute rejection has a higher clinical relevance. Monitoring renal allografts aiming an early diagnosis of acute rejection episodes and its treatment is of utmost importance in the adequate clinical care of these patients.

Considering that acute cellular rejection is predominantly mediated by T lymphocytes which are the main source of the adenosine deaminase enzyme (ADA) in peripheral blood we decided to study a possible association between the ADA serum activity and acute renal allograft rejection. Additionally we sought to determine its utility as a diagnostic tool for acute cellular rejection in this setting.

Thirty-five renal transplanted patients were followed up for up to a month. Determination of the serum ADA activity was performed five times a week and whenever there was a clinical suspicion of acute rejection. The diagnosis of acute rejection was established by 2 nephrologists, which were unaware of the ADA serum level results. These physicians had all information on clinical and laboratory data including creatinine and cyclosporine levels, nuclear scans, ultrasounds, aspiration cytology and percutaneous renal biopsies as well as the response to different immunosuppressive manipulations.

Statistical analysis was performed by using Mann-Whitney test and chi-square tests. A p level of less than 0,05 was considered as significant.

The median for acute rejection episodes occurrence was between the sixth and seventh post-transplant day. On day six a statistically significant difference was found in the comparison of the ADA serum activity between rejecting (60,16) and non-rejecting (24,55) patients ($p = 0,021$ MW).

In order to evaluate the accuracy of the ADA serum activity as a diagnostic method for acute rejection, cut off values of ADA >35, >40, >45, >50 and higher than 30% of the values of the pre-rejection period were tested. There was a statistically significant association between ADA >30% and acute cellular rejection ($p = 0,035$ MW). It was also observed a significant increase in ADA serum activity in anti HCV positive patients and in those with acute tubular necrosis, without interference on the results observed during acute cellular rejection episodes. Using this cut off the diagnostic parameters for acute rejection were: sensibility = 55.5%, specificity = 82.3%, predictive positive value = 76.9%, predictive negative value = 63.6% and accuracy = 69.0%

In conclusion, there is a statistically significant increase of ADA serum activity during acute rejection episodes of human kidney allografts. A significant association was found between for a 30% increment from the baseline serum ADA activity value and the occurrence of acute cellular rejection.

1. INTRODUÇÃO

O transplante renal representa atualmente, a melhor opção terapêutica e de reabilitação para o paciente com insuficiência renal crônica terminal (58,75,95,124,129). As sobrevidas em um ano de órgãos e de pacientes com doadores cadavéricos têm sido superiores a 80% e 90% respectivamente em vários centros de Transplantes (44,117). Contudo, esta forma de tratamento ainda se encontra longe da perfeição, uma vez que órgãos transplantados ainda são perdidos por diversas causas. O aprimoramento das técnicas de microlinfocitotoxicidade para a prova cruzada, a padronização da técnica cirúrgica do implante, o emprego de antibióticos profiláticos eficazes e o uso de drogas imunossupressoras mais potentes e de melhor seletividade resultaram em uma diminuição significativa das chamadas perdas “técnicas” ou seja, cirúrgicas e “infecciosas”, tanto secundárias à infecção sistêmica, quanto localizadas no rim transplantado (16,23,61,116,127). Houve também, melhora na possibilidade de sobrevida imunológica dos enxertos, pelo menos a curto prazo (83).

As rejeições permanecem como as principais causas de perda de rins transplantados e entre estas, as rejeições agudas e crônicas são as que apresentam maior relevância clínica, uma vez que as hiperagudas são atualmente, pouco frequentes e em geral, podem ser evitadas através de provas cruzadas bem executadas (103,120). As rejeições agudas e crônicas parecem decorrer da falta de identidade genética entre doador e receptor com bloqueio incompleto da resposta imune (118,119). Como não existe, no momento atual, terapêutica comprovadamente eficiente para a rejeição crônica, a prevenção, o diagnóstico e o

tratamento da aguda assume importância primordial no manejo do paciente transplantado renal, mesmo porque a resolução “incompleta” da mesma pode ser o mecanismo inicial perpetuador dos processos de rejeição crônica (29,119). Desta maneira, a monitorização do transplante renal com vistas ao diagnóstico precoce de rejeição aguda e a avaliação da resposta ao seu tratamento são de grande importância no manejo ideal desses pacientes.

1.1. Rejeição Aguda

A rejeição do enxerto renal é definida como uma deterioração funcional e estrutural do rim, devido a uma ativa resposta imune expressa pelo receptor que independe de causas não-imunológicas de disfunção renal (114).

A incidência de rejeição aguda varia, principalmente, de acordo com o grau de identidade genética do doador e do receptor no sistema Antígeno Leucocitário Humano (HLA). Como regra, quanto melhor a compatibilidade nesse sistema, menor a probabilidade de rejeição. Desta maneira, a incidência global de rejeição aguda fica em torno de 40 a 70% no primeiro ano pós-transplante (8,15,53).

Também foi visto que mesmo um único episódio de rejeição é associado a taxas de sobrevida dos enxertos inferiores. No registro de transplantes do “United Network for Organ Sharing” dos Estados Unidos, o receptor de primeiro transplante que não tinha rejeição, apresentava uma taxa de sobrevida do enxerto em um ano de 86%, comparada com 67% daqueles com um ou mais episódios de rejeição (114). Há também conseqüências a longo prazo relacionadas com a rejeição aguda. A meia-

vida estimada (tempo para que 50% dos enxertos deixem de funcionar, contado a partir do primeiro ano pós-transplante) para pacientes sem rejeição aguda foi de 8,6 anos e 7,4 anos para os receptores com um ou mais episódios de rejeições (114).

Rejeição aguda é também considerada como fator significativo para subsequente desenvolvimento de rejeição crônica, que é a maior causa de disfunção e perda do enxerto a longo prazo. Associado a isto, há o impacto desfavorável do processo da rejeição, ocasionado pelo uso de altas doses de terapia anti-rejeição, superimposta na manutenção da imunossupressão, que são a maior causa de morbidade e mortalidade associadas ao transplante (114).

Outros fatores que afetam a incidência de rejeição aguda são o grau de sensibilização aos antígenos HLA, a “quantidade” e o tipo de imunossupressão e a compatibilidade no sistema secundário (menor) de histocompatibilidade. Achados experimentais recentes, assim como evidências clínicas, sugerem que a ausência de função primária do enxerto, em geral atribuída a necrose tubular aguda (NTA), pode aumentar a incidência de rejeição aguda através do aumento da expressão de antígenos HLA classes I e II das células do enxerto (16,106).

1.2. A Resposta Imune ao Aloenxerto.

A resposta imune ao aloenxerto é efetivada por diversos tipos de leucócitos incluindo, macrófagos, células T citotóxicas (CD8+) e auxiliares (CD4+) e plasmócitos. Essas células se envolvem em uma cascata de eventos, na qual mediadores solúveis (citocinas) desempenham importante papel que culminará na

expansão clonal de células efectoras e anticorpos com atividade citotóxica que terminam por destruir o enxerto quando a reação não é modificada, em tempo, por drogas imunossupressoras (Fig.1.).

O tecido transplantado representa uma importante carga antigênica. No início da resposta imune, parte destes antígenos é captada e processada pelas células apresentadoras do antígeno - monócitos, macrófagos ou células dendríticas - que por sua vez, apresentam o antígeno do doador na forma de pequenos peptídios em sua superfície, mais especificamente na fenda dos antígenos classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH - ou Sistema HLA) às células auxiliares (CD4+) do receptor. Moléculas CD4+ ou CD8+ (citotóxicas), na superfície dos linfócitos T, estão próximas às moléculas de receptores da célula T (RCT) que, por sua vez, encontram-se associadas não covalentemente à molécula CD3, encarregada da transmissão do sinal de ativação para o citosol da célula T.

Os linfócitos CD4+ exercem um papel fundamental na ativação da cascata imune e são subdivididos em duas subpopulações que são os linfócitos T auxiliares 1 e 2. Os primeiros (Th1) são produtores de interleucina-2 (IL-2), fator de necrose tumoral-beta e interferon-gama, responsáveis pelo componente celular da reação e que parecem ser ativados pela interleucina-12 (IL-12). Os linfócitos T auxiliares 2 (Th2), por sua vez, são produtores de interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10), que são responsáveis pelo componente humoral e possivelmente pela supressão da via regida pelos Th1, através da ação supressora da IL-10, sendo por sua vez, aparentemente ativados pela própria IL-4 (28,32,74,76).

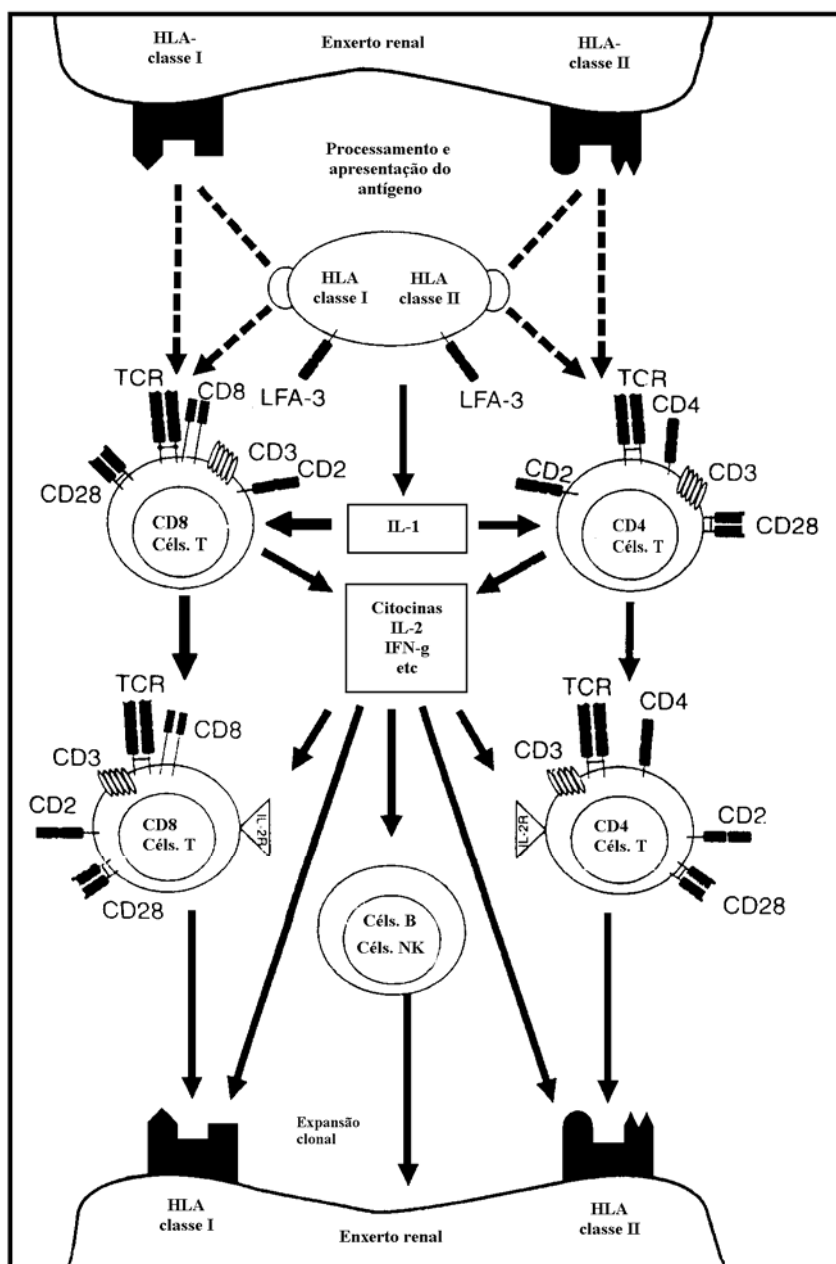


Fig.1. Resposta Imune ao Aloenxerto. Adaptado de Suthanthiran (114).

Outro tipo de sinal deriva da estimulação das células T auxiliares pela interleucina-1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), produzidas pelas células apresentadoras do antígeno após o contato com o mesmo. Mais recentemente, outras moléculas tem sido apontadas como mediadores do segundo sinal: CD28-CTLA-4, B7.1 B7.2, e

CD40-CD154. Após a estimulação pelo antígeno e por estas citocinas, as células T auxiliares produzem IL-2, um potente fator de crescimento dos linfócitos T, e expressam o receptor para a IL-2 em sua superfície. A interação da IL-2 com seu receptor, por mecanismos autócrinos e parácrinos, estimula a divisão celular e conseqüente expansão clonal das células auxiliares e citotóxicas. Além disso, a IL-2 é um estímulo adicional às células T, ativadas pelo antígeno, a produzir algumas linfocinas que desempenham um papel importante na rejeição. Também ocorre produção de interleucina-3 (IL-3). Esta linfocina estimula a proliferação de células precursoras que se diferenciam em granulócitos e macrófagos. O interferon-gama, cuja síntese também é estimulada pela IL-2, aumenta a expressão de antígenos classe I, classe II e ICAM-1 nas células induzíveis, aumentando a imunogenicidade dos enxertos, tornando-os mais vulneráveis aos linfócitos T citotóxicos. Adicionalmente, a IL-2 ativa a função citodestrutiva dos macrófagos (13,14,46).

Após a ativação de linfócitos T auxiliares por IL-2, ocorre a síntese de fatores de crescimento e diferenciação (IL-4, IL-5 e IL-6) que induzem à expansão clonal das células B estimuladas pelo antígeno, levando à produção de anticorpos específicos com eventual atividade citotóxica contra as células do enxerto. Ocorridos estes eventos iniciais de ativação, as células T citotóxicas proliferam sob a influência de IL-2 e sob a ação de interferon-gama, IL-4 e IL-6 assumem a função citotóxica (3,21,24,59,110,113).

Os linfócitos citotóxicos diferenciados, ao entrarem em contato com as células do enxerto, reconhecerão via RCT os antígenos expressos na superfície daquelas, em um processo de reconhecimento do qual participam CD8, LFA-1 e CD2, semelhante ao que ocorreu na estimulação primária (45,118). Este

reconhecimento leva à ativação do linfócito T citotóxico via CD3, e essa célula desfecha o seu ataque às células alvo (no caso as células do enxerto).

O infiltrado celular na rejeição aguda ao aloenxerto é composto principalmente por linfócitos T CD4+, CD8+ e macrófagos. No entanto, nem todos os linfócitos citotóxicos que infiltram os enxertos são dirigidos aos aloantígenos, o que confirma a existência de um componente inespecífico nesse infiltrado (112). Em modelos experimentais e clínicos, de rejeição primária, fica claramente estabelecida a importância das células CD4+ na rejeição dos enxertos. Essas células podem sozinhas mediar rejeição aguda, o que não é possível para os linfócitos CD8+. A resposta dos linfócitos CD8+ aos aloantígenos, sem o auxílio dos linfócitos CD4+, é bastante limitada, o que sugere que a via CD4+-dependente seja predominante (27,52,72,133).

O mecanismo final de destruição celular é mediado pela liberação dos grânulos que contém uma proteína monomérica formadora de poros, denominada perforina, e por uma serina esterase, denominada granzima. Na presença de cálcio, ocorre polimerização enzimática da perforina, formando múltiplos poros na membrana da célula alvo. Interessantemente, a via da perforina parece formar-se apenas na presença de elevadas concentrações de IL-2. De maneira alternativa, uma via independente de cálcio e perforina tem sido observada e parece efetuar-se através de enzimas liberada por células citotóxicas. Além disso, grânulos liberados por células citotóxicas contendo fator de necrose tumoral-alfa e interferon-gama ativam receptores na célula alvo, modulando a sua síntese proteica e causando dano citotóxico à parede celular. Os mecanismos acima citados expõem o meio intracelular ao conteúdo extra-celular, resultando em citólise (11,42,43,77).

Adicionalmente, linfotoxinas secretadas ativam enzimas nas células alvo que fragmentam o DNA nuclear e o núcleo.

Esta cascata de ativação com destruição celular torna-se um ciclo vicioso, a menos que modificada por drogas imunossupressoras potentes em tempo hábil ou que surjam mecanismos supressores capazes de diminuir ou impedir a atividade citotóxica (26,45).

1.3. Avaliação Clínica e Diagnóstica de Rejeição Celular Aguda

A rejeição celular aguda, a forma mais comum de rejeição, classicamente desenvolve-se de uma 1 a 6 semanas após o transplante, mas pode ocorrer em qualquer tempo, mesmo após muitos anos do transplante (18).

O diagnóstico de rejeição aguda, em geral não apresenta maiores dificuldades em pacientes imunossuprimidos com drogas “convencionais” (Prednisona e Azatioprina), especialmente quando o enxerto apresenta boa função inicial. Nestas circunstâncias, o aumento da creatinina sérica, acompanhado dos sinais clássicos de rejeição aguda (febre, aumento de volume e dolorimento do enxerto, oligúria, edema e hipertensão), torna o diagnóstico relativamente fácil. No entanto, em percentual significativo dos casos, especialmente em transplante renal cadavérico, ocorre disfunção inicial do rim devido, na maior parte dos casos, à NTA. Aqui, a creatinina sérica não é um parâmetro valorizável, uma vez que ela já se encontra elevada. Adicionalmente, a Ciclosporina e os novos imunossupressores

mais potentes mascaram os sinais físicos de rejeição aguda e pode “per se” ser causa de disfunção do enxerto por nefrotoxicidade (55,78).

Na prática clínica, como já foi dito, o aumento da creatinina sérica é a principal pista para o diagnóstico de rejeição aguda. No entanto, este dado pode não estar presente, como nos casos de NTA, ou ocorrer em diversas outras circunstâncias, como nefrotoxicidade por Ciclosporina, pielonefrite aguda, obstrução urinária, fístula urinária, uso de drogas nefrotóxicas ou ainda, diminuição da perfusão renal por problemas vasculares. Algumas dessas condições são avaliadas por diferentes métodos, como dosagens de Ciclosporina, exame do sedimento urinário, culturais de urina, ecografia renal com ou sem “doppler” e cintilografia renal.

Mesmo assim, em um considerável número de casos, permanecem dúvidas diagnósticas que são importantes à medida que, em muitas ocasiões, as condutas são antagônicas. Isso tem levado à busca de outros métodos de monitorização, como dosagens de Neopterin (101), medidas de pressão intra-renal (98), mensuração de receptores solubilizados de IL-2 (19,69) e fenotipagem de subpopulações linfocitárias (132). Adicionalmente, testes que avaliam a reatividade celular e humoral entre doador e receptor, como a citotoxicidade celular mediada por anticorpos (ADCC), citotoxicidade dependente de anticorpos, citotoxicidade mediada por linfócitos e blastogênese espontânea, foram utilizados no passado (35) e mesmo atualmente, mas sem que se alcance a acurácia diagnóstica desejada (109).

Todos os métodos citados acima apresentam acurácia diagnóstica insatisfatória, permanecendo a biópsia renal o melhor método para a avaliação das disfunções em rins transplantados (71,97). No entanto, apesar de fornecer uma

avaliação morfológica do rim, a biópsia renal apresenta algumas limitações, como os riscos, os problemas de amostragem, a informação estática e os efeitos da terapia na morfologia, na maior parte das vezes, presumidos, uma vez que o procedimento não deve ser repetido com muita frequência (36, 131).

Os sítios de rejeição celular aguda - o interstício, túbulos, endotélio e glomérulos - podem ser envolvidos separadamente ou em combinação. A característica microscópica é um infiltrado intersticial de células mononucleares, acompanhado por edema intersticial e variáveis quantidades de hemorragia. As células invadem os túbulos e comumente infiltram o endotélio em todos os níveis, mais obviamente nas arteríolas e pequenas artérias. O infiltrado de células mononucleares tipicamente inclui linfoblastos, com basofilia citoplasmática, nucléolos e figuras mitóticas ocasionalmente, as quais são indicativas do aumento de síntese proteica e atividade proliferativa. Tipicamente 30% a 50% das células infiltrantes são células T-CD3. Células CD8⁺ são usualmente predominantes e infiltram difusamente o córtex renal. Células CD4⁺ são mais numerosas em agregados perivasculares, especialmente em biópsias feitas precocemente. A produção de citocinas pode ser documentada por hibridização “in situ” e por reação em cadeia da polimerase (PCR). Aumento da expressão de antígenos DR e moléculas de adesão são característicos de rejeição celular aguda. Endarterite é uma manifestação comum e significativa de rejeição vascular. O infiltrado de células mononucleares abaixo do endotélio arterial e arteriolar é lesão patognomônica de rejeição celular aguda. As células endoteliais são tipicamente reativas, como manifestado por aumento do volume citoplasmático e basofilia. Em muitos casos de rejeição celular aguda, os glomérulos são poupados ou mostram mudanças mínimas,

basicamente com poucas células mononucleares espalhadas e ocasionalmente dano endotelial segmentar. Numa minoria de casos, uma forma severa e difusa de lesão glomerular é evidente e domina o padrão histológico (18).

A aspiração com agulha fina do enxerto renal tem se mostrado uma boa opção para monitorizar a rejeição aguda em rins transplantados e avaliar a resposta ao tratamento imunossupressor com pouco ou nenhum risco ao seu receptor. Esta técnica permite quantificar os tipos de células inflamatórias que infiltram o rim e a intensidade da inflamação. Seus resultados são comparáveis aos da biópsia convencional, com sensibilidade de 71,8% e especificidade de 87,3% em estudo feito por Manfro et ali, com a vantagem de ser processada mais rapidamente e oferecer oportunidade de monitorizar continuamente o órgão transplantado através da quantificação dos eventos imunológicos “in situ” e diferenciar a rejeição de outras causas de alteração da função renal no pós-operatório (68). Tal como acontece com a biópsia renal percutânea, a representatividade da citologia aspirativa renal pode ser comprometida pela magnitude e distribuição do infiltrado inflamatório intra-enxerto. No entanto, diferentemente da biópsia renal percutânea, outros fatores adicionais podem afetar esta representatividade na citologia aspirativa. Entre os mais citados, encontra-se a contaminação do aspirado por sangue, produzindo os chamados aspirados “hemorrágicos” e quantidade insuficiente ou material proveniente de outra estrutura que não o rim (aspirados “brancos”) (66).

Assim, a monitorização do surgimento de rejeição aguda e de seu tratamento pode ficar sujeita a métodos que podem sofrer influências de outras condições intervenientes, ser inacurados ou por demais invasivos para permitir uma

avaliação seqüencial, não havendo no presente momento um método ideal que isoladamente, solucione estes problemas.

1.4. Adenosina Deaminase (ADA)

A adenosina deaminase (ADA) é uma enzima polimórfica da rota do metabolismo das purinas, que catalisa irreversivelmente a clivagem hidrolítica da adenosina em inosina e amônia (20,122,123,125). A ADA reage especificamente com a adenosina e vários nucleotídios-adenínicos análogos. Esta enzima é largamente distribuída nos tecidos animais e humanos (38,51). A maior atividade da ADA é encontrada na mucosa intestinal e baço, e a menor no fígado, músculo esquelético, rins e soro (25,38). Nas células sangüíneas a atividade da ADA é maior nos linfócitos (38) (Fig 2).

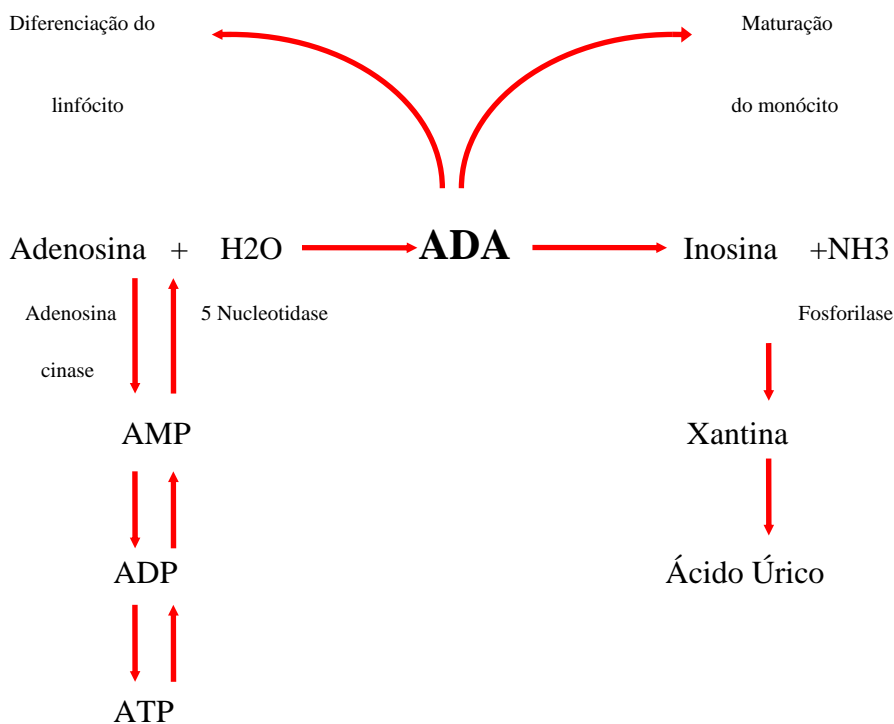


Fig.2- Representação esquemática da rota metabólica da ADA. Adaptação de Giusti(1).

A elevação da atividade da enzima tem sido encontrada em larga escala de doenças hepáticas, renais, pulmonares e do cólon, sugerindo que nestas doenças a ADA poderia ajudar no diagnóstico clínico (30). Alguns estudos relatam aumento dos valores séricos de ADA na hepatite viral aguda, cirrose hepática, febre tifóide, sarcoidose (115), leucemias (38,51) e mononucleose (85).

A atividade da ADA origina-se da ação de duas principais isoenzimas, ADA-1 e ADA-2, codificadas por diferentes loci genéticos, cada qual com propriedades bioquímicas e padrões de especificidade únicos (25,34,123).

A adenosina deaminase -1 tem baixa constante de Michaelis (K_m equivale a 2,000 mM), pH ideal de 7,0 a 7,5 e afinidade para adenosina e 2'-deoxiadenosina (relação 2'-deoxiadenosina/ADA de aproximadamente 0,75) (34). É encontrada como um monômero ($ADA1_m$) ou como um dímero ($ADA1_c$), que é a combinação de 2 moléculas de $ADA1_m$ com uma proteína ligadora (123). A ADA-1 está presente em todos os tecidos, principalmente em linfócitos e monócitos, e é essencial para uma eficiente resposta imune. A ausência congênita de ADA-1 em linfócitos causa severa síndrome de imunodeficiência combinada. Também uma diminuição de ADA-1 é visto em casos de leucemias, linfomas e outras patologias malignas, assim como em derrames parainfecciosos.

A adenosina deaminase-2 tem maior K_m , pH ideal de 6,5, pobre afinidade com a 2'-deoxiadenosina (relação 2'-deoxiadenosina/ADA de 0,25) e não está relacionada à severa síndrome de imunodeficiência. É encontrada somente em

macrófagos e é liberada por estas células quando estimuladas por presença de microorganismos vivos em seu interior. Isto explica por que em fluidos biológicos no curso de infecções caracterizados por microorganismos infectantes de macrófagos há aumento de ADA-2, como na tuberculose, brucelose, febre tifóide e rickettsiose (34).

Para se fazer a diferenciação destas isoenzimas incuba-se amostras com quantidades idênticas de substrato de adenosina e 2'-deoxiadenosina em tubos de ensaio, com 20 mmol cada, ambos em pH de 6,5. Mede-se a atividade enzimática em cada tubo e após calcula-se a relação 2'-deoxiadenosina/ADA. Considera-se que a atividade enzimática é devida principalmente a presença de ADA-2 quando a relação está abaixo de 0,45, e devido a ADA-1 se a relação estiver acima de 0,45 (34).

A ADA humana tem sido mais pesquisada ultimamente, em especial após a descoberta de Gilblett et al. de que a ausência genética da enzima resulta em severa imunodeficiência combinada (20,85). Os pacientes afetados apresentam-se clinicamente com severas infecções recorrentes, as quais podem ser fatais. A relação da deficiência de ADA à severa disfunção imune é ainda indefinida, mas pode refletir (a) uma aberração generalizada da célula as quais alteram tanto a atividade da ADA como a função imune, (b) uma larga deleção genética que inclui os loci críticos à ambas (atividade da ADA e resposta imune), ou (c) uma relação direta causal (20,125).

Estudos da atividade da ADA em tecidos humanos e animais tem revelado que os tecidos linfóides tem comparativamente, maiores níveis da enzima. Barton et al estudaram a distribuição da ADA entre populações de linfócitos de ratos e observaram níveis enzimáticos 3 a 10 vezes maiores no timo do que qualquer outra

população de células linfóides e principalmente, nos timócitos corticais. A atividade da ADA em tecidos linfóides periféricos, embora menor que no timo, parece ser preferencialmente associada a linfócitos T (7). Sullivan et al tem registro de que linfócitos T tem 5 a 20 vezes maior atividade de ADA que os linfócitos B. Tung et al também encontraram níveis maiores em linfócitos T humanos do que em linfócitos B, embora a diferença tenha sido consideravelmente menor do que a citada por Sullivan et al. Estes trabalhos sugerem o possível papel da ADA na resposta imune, estando os linfócitos T mais sensíveis aos efeitos da deficiência da ADA (7).

O papel da ADA na resposta imunológica dos transplantes está relacionado ao aumento da atividade nos linfócitos durante a fase de rejeição de transplante heterólogo (38). Shore, Dosch e Gelfand mostraram o papel importante da ADA no estágio inicial da diferenciação dos linfócitos, onde indivíduos com deficiência desta enzima tinham a diferenciação bloqueada (105).

Pacientes com deficiência adquirida de ADA tem uma imunodeficiência combinada, onde a imunidade celular e a humoral são severamente prejudicadas, e há diminuição do número de linfócitos no sangue periférico. Isto sugere que a atividade da ADA é de particular importância para a função normal dos linfócitos (51). Com base nestes estudos Hovi, Smyth, Allison e Willians estudaram o papel da ADA na proliferação dos linfócitos, medindo sua atividade em cultura de linfócitos do sangue periférico de pacientes normais expostos a mitógenos e examinando o efeito de coformicina, um poderoso inibidor da ADA. Eles evidenciaram que a atividade da ADA aumentava e havia proliferação linfocitária nas culturas estimuladas por mitógenos. Entretanto, com a adição de coformicina, ocorria redução da ADA e uma inibição da proliferação dos linfócitos (51). A inibição da ADA pela coformicina,

assim como na falta herdada desta enzima, poderia resultar em um aumento na concentração de adenosina e acúmulo de outros metabólitos com propriedades inibitórias e citotóxicas (51).

1.5. Aplicações Clínicas da Adenosina Deaminase

Durante as décadas de 50 e 60 a atividade da ADA foi determinada no soro de pacientes com doenças inflamatórias e neoplásicas e se mostrou clinicamente útil para o diagnóstico precoce de febre tifóide e na diferenciação de icterícia hepatocelular e obstrutiva (39,88).

Com as observações de Giblett et al, em 1972, em duas crianças com ausência da atividade da ADA e severa imunodeficiência combinada, foi feita a primeira descrição de um erro inato específico, o qual poderia estar relacionado a um defeito imunologicamente demonstrável (37). Estes achados naturalmente estimularam várias pesquisas tentando correlacionar deficiência de ADA e imunodeficiência. Para tentar explicar o exato mecanismo pelo qual a deficiência de ADA causa prejuízo nos linfócitos, tem-se sugerido que a ADA seja de crucial função para a diferenciação e/ou proliferação de células linfóides. Esta inibição seria atribuída a altas concentrações de adenosina, ou como mais recentemente se observou, a um efeito tóxico da deoxiadenosina (90,108).

Em 1973, Piras e Gakis fizeram os primeiros registros de que a dosagem da atividade da ADA no fluido cerebrospinal era maior nos pacientes com meningite tuberculosa do que viral, mostrando-se útil na prática clínica em

diferenciar a etiologia da meningite e havendo queda subsequente da atividade da ADA em paralelo com a recuperação clínica e normalização bioquímica do líquido (89).

Na prática clínica, derrames pleurais são freqüentes e constituem um problema diagnóstico difícil. Culturas de fluidos pleurais para detectar a presença de *Mycobacterium tuberculosis* são positivas somente em 20 a 30% dos pacientes com derrames tuberculosos, e biópsia de pleura parietal mostrando granulomas de células epitelióides típicas ocorrem em 50 a 80% dos casos com esta doença (5,88). Por isso o uso da atividade da ADA como método diagnóstico de tuberculose foi amplamente testado. Em 1978, Piras et al estudaram o comportamento da atividade da ADA em 96 pacientes com derrame pleural e peritoneal chegando à conclusão de que era possível diferenciar, com bom grau de certeza, o derrame tuberculoso do derrame de outras etiologias (90). Em 1983, Ocanã et al, estudando 221 pacientes (79), Strankinga em 1987 (111) e Banãles et al, em 1991 (5), chegaram a resultados semelhantes. Petterson et al em 1984, determinaram a atividade da ADA sérica e nos derrames pleurais em 90 pacientes com derrame pleural de várias etiologias, sendo que nos de origem tuberculosa, empiematosos e de artrite reumatóide demonstraram significativamente maiores atividades de ADA do que nos derrames parapneumônicos, malignos, de lupus eritematoso sistêmico e de insuficiência cardíaca congestiva. Também na tuberculose, artrite reumatóide e empiema a atividade da ADA foi significativamente maior no fluido pleural do que no soro, sugerindo que o local da síntese de ADA seria a cavidade pleural, reflexo da ativação local de linfócitos T, isto é, resposta imune celular local nestas doenças (88). Estudo semelhante feito por Monteagudo em 1986 (73) e por Silva Júnior et al, em 1988

(107), também comprovaram estes resultados. Também Ocana et al, em 1986, observaram que no derrame pleural tuberculoso tanto o número absoluto como a porcentagem de linfócitos T são significativamente maiores do que no sangue periférico, um fato que poderia explicar o aumento da atividade da ADA, uma enzima predominantemente detectada em células T (80). Ungerer e Grobler em 1988, sugeriram que este aumento da atividade da ADA seria decorrente da ativação local das células T, ou seja, da resposta imune celular (122).

A pericardite tuberculosa também é uma condição que, apesar de ser incomum, exige urgência diagnóstica e rápido tratamento. Entretanto, o diagnóstico precoce é difícil e culturas do derrame pericárdico para *mycobacterium tuberculosis* são freqüentemente negativas e procedimentos mais invasivos, tal como biópsia aberta de pericárdio pode ser necessário. A partir deste enfoque, em 1986, Martinez-Vazquez et al observaram que a atividade da ADA no fluido pericárdico era mais elevada que em outros tipos de derrame não-tuberculosos, sendo um método prático, fácil e seguro de ser realizado (70). Em relação à peritonite tuberculosa, a clínica, bioquímica e testes bacteriológicos são métodos diagnósticos pouco sensíveis, não-específicos ou demorados de serem realizados. Com isso, Voigt et al em 1989, comprovaram um aumento significativo na atividade da ADA em 41 pacientes com ascite tuberculosa em relação a 41 pacientes com ascite de outras causas (128).

Em 1989, Segura et al observaram a dosagem de ADA de fluidos corporais para o diagnóstico de tuberculose. Foram estudados 1063 pacientes com derrames pleurais, pericárdicos, peritoneal ou cerebrospinal e obteve-se níveis de ADA mais elevados nos pacientes com tuberculose tendo este exame uma

sensibilidade variando de 92% a 99% e especificidade em torno de 94% a 99%, portanto bastante útil na prática clínica (104). Em 1990, Baganha et al, observaram que a atividade da ADA e a percentagem de células T CD3 e CD4 em derrames pleurais tuberculosos era significativamente maior do que derrames neoplásicos, sugerindo a possibilidade da ADA como marcador de atividade de resposta imune celular. Então, no derrame pleural tuberculoso, a intensa e acelerada blastogênese que é evidenciada nas células T após a estimulação antigênica pela micobactéria, e principalmente pelo significativo aumento da subpopulação de CD4, poderia explicar a síntese aumentada de ADA, enzima cuja atividade é essencial no processo de diferenciação e proliferação da resposta imune (4). Em 1994, Ungerer et al estudaram 51 derrames pleurais tuberculosos e 6 para-infecciosos. Em todos havia aumento da atividade de ADA, entretanto, no derrame pleural tuberculoso havia maior atividade da isoenzima ADA-2, enquanto nos para-infecciosos a ADA-1 era a maior contribuinte para a atividade da ADA (123). Esta metodologia pode distinguir a ADA liberada de macrófagos (ADA-2), daquela liberada por estímulos não específicos (ADA-1), evitando falsos positivos para o diagnóstico de tuberculose (82).

Supondo que a ADA e a proporção de linfócitos são independentemente elevados em derrames pleurais tuberculosos, mas não são específicos, ocorrendo falsos positivos, em 1994, Oliveira et al estudaram um protocolo combinado destes 2 parâmetros, em 276 pacientes com derrame pleural e obtiveram níveis mais elevados destes parâmetros em pacientes com diagnóstico de tuberculose, com sensibilidade de 90,7% e 97,7% de especificidade (82). A principal atividade biológica da ADA está relacionada com a diferenciação dos linfócitos, em especial da subpopulação T.

Ainda não estão bem compreendidos os mecanismos que elevam a atividade da ADA na tuberculose de serosas. A ADA de derrames pleurais tuberculosos é maior do que a sérica destes pacientes. Este aumento da atividade aconteceria em função do estímulo local à imunidade celular mediada por antígenos do *Mycobacterium*. A origem mais provável é a partir da célula epitelióide do granuloma tuberculóide (81,82,122). Em 1986, Van Heerden e Pressis desenvolveram outro trabalho original, aplicando a dosagem da atividade de ADA no diagnóstico de tuberculose urinária e obtendo resultados promissores (81).

Em 1984, Taylor estudou 18 pacientes com sarcoidose, sugerindo que a ADA sérica é útil no seu diagnóstico, mesmo que o aumento da atividade da ADA não seja específico para esta doença, nem para doenças granulomatosas, sendo também encontrada em doenças hepáticas, linfomas e doenças autoimunes. Este autor afirma que macrófagos e linfócitos T, acumulam-se em granulomas sarcóides, que são ricos em ADA (115). Visto que o HIV penetra e permanece no sistema macrofágico-monocítico, em 1989, Gakis et al estudaram a dosagem da atividade da ADA de 137 pacientes com anti-HIV positivo e evidenciaram um aumento de ADA-2, sugerindo que esta isoenzima origina-se exclusivamente de macrófagos (33). No estudo de Klockars et al, 1991, estudaram-se os valores de ADA sérica de 171 pacientes com pneumonias virais e bacterianas. Comparado com o grupo controle os níveis de ADA foram maiores, principalmente nas de etiologia viral, onde a primeira linha de defesa do trato respiratório inferior é o macrófago pulmonar, células “natural killer” e linfócitos T (56).

1.6. Adenosina Deaminase e Rejeição a órgão transplantado

Como parece haver uma correlação entre a atividade da ADA e a imunorreatividade do hospedeiro, um aumento da atividade da ADA de células circulantes ativadas imunologicamente deveria ser detectada em pacientes que apresentam rejeição a um órgão transplantado. Por outro lado, ADA com níveis baixos pode ser encontrada em pacientes imunocomprometidos e portanto suscetíveis a infecções oportunistas. Assim, a medida da ADA poderia ser um método útil de monitorização imunológica, desde que a sua atividade aumentasse antes da injúria funcional do enxerto ocorrer, permitindo o diagnóstico precoce da rejeição e a conseqüente realização de ajustes profiláticos na terapia imunossupressora. Com base neste enfoque, Lum et al em 1978, estudaram 20 receptores de transplante renal e 10 indivíduos controles normais. Os pacientes com rejeição apresentavam níveis maiores de ADA. Também observaram que medidas seriadas de ADA no grupo de pacientes com rejeição produziam informações que suportam o conceito de que a diminuição da atividade da ADA pode preceder manifestações clínicas de supressão da medula óssea devido à imunossupressão excessiva (64). Também sugerem que a medida seqüencial de atividade da ADA é uma técnica de monitorização imunológica que pode não só permitir a detecção precoce de rejeições, mas também pode evitar os riscos associados com terapia imunossupressiva excessiva. A individualização da terapia imunossupressora seria outro possível benefício da

monitorização imunológica através da ADA, com a vantagem adicional de ser um método rápido e simples (64).

Como a rejeição do transplante renal é mediada principalmente por linfócitos T, Yasmineh et al sugerem que a atividade da ADA no sangue periférico pode ser útil no diagnóstico de rejeição do enxerto. Assim Orts e Frey, em 1985, estudaram o papel da ADA sérica como possível marcador de rejeição de 25 receptores de transplante renal, não observando utilidade da ADA no diagnóstico de rejeição, porém sugerindo que fossem realizados mais estudos sobre o assunto, visto que a ADA sérica ficou elevada em todos pacientes transplantados, independente de rejeição, em relação a um grupo controle de pessoas saudáveis (84).

1.7. Métodos de Dosagem da Adenosina Deaminase

A atividade da ADA pode ser determinada pela medida do consumo da adenosina ou pela formação de inosina e ou de amônia, por diversos métodos, conforme apresentado a seguir:

a) Consumo de adenosina

-pode ser dosada pela queda da absorbância da adenosina em 265 nm (a absorbância da adenosina neste comprimento de onda é alta, sendo difícil obter condições de saturação);

b) Produção de inosina

- inosina pode ser convertida pela nucleosídeo fosforilase e xantina oxidase para ácido úrico, com aumento da absorvância em 293 nm (alta concentração protéica pode interferir na reação);
- uma vez que H₂O₂ é formada nesta última reação, a atividade da ADA pode ser medida através da dosagem do peróxido de hidrogênio, associando uma reação com NADPH por meio de catalase e aldeído desidrogenase em presença de etanol (Método de FRITZ HEINS). Este método é passível de automatização, porém de difícil aplicabilidade, pelo alto custo das enzimas;

c) Produção de amônia

- a amônia produzida pode ser medida por método colorimétrico através da reação de Berthelot (Método colorimétrico de Giusti). É um método prático e de baixo custo;
- a amônia também pode ser dosada associando-se glutamato desidrogenase com oxidação de NADPH, resultando em queda da absorvância em 339 nm;
- Utilização de eletrodos sensíveis a amônia.

d) Outros:

- A adenosina marcada com radioisótopos - adenosina e inosina

produzidas são separadas por cromatografia de coluna ou outra técnica (o uso de material radioativo é restritivo);

- O perfil das isoenzimas pode ser estudado usando-se eletroforese em gel de amido ou de acetato de celulose, cromatografia de troca iônica, filtração em gel e outros (38,81).

1.8. Objetivos

São objetivos do presente estudo:

- Avaliar a associação entre a atividade sérica da ADA e rejeição de aloenxertos renais.
- Determinar a utilidade diagnóstica da dosagem da atividade sérica da ADA em relação à rejeição do transplante renal.
- Estabelecer o melhor valor discriminativo de ADA sérica para o diagnóstico de rejeição de Transplantes renais.

2. MATERIAL E MÉTODOS:

2.1. Condições Ambientais

O presente estudo foi realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A dosagem da atividade sérica da ADA foi processada no laboratório de bioquímica. A revisão dos prontuários foi feita no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do hospital.

2.2. Delineamento de Pesquisa

Foi realizado um estudo de coorte: individual, prospectivo, observacional e controlado.

2.3. Pacientes

Estudaram-se, prospectivamente 35 pacientes internados para realização de transplante renal no período de outubro de 1995 à dezembro de 1996 na Unidade de Transplante Renal do HCPA.

Foram excluídos do estudo todos os pacientes que apresentaram no pós-operatório imediato complicações que resultaram na nefrectomia do enxerto (trombose, rejeição vascular, ruptura do enxerto). Os pacientes foram informados sobre o protocolo de pesquisa e só foram incluídos após consentimento tendo o estudo sido previamente aprovado pela Comissão Científica e Ética do HCPA .

2.3.1. Protocolo de Avaliação

O protocolo de avaliação em todos os pacientes incluídos no estudo foi feito registrando as seguintes variáveis: idade, sexo, cor, tipo de doador, imunossupressão empregada, presença de hepatite ou outra doença infecciosa associada.

2.3.2. Imunossupressão

Os pacientes foram submetidos a três protocolos de imunossupressão:

- terapia com 2 drogas: (prednisona e azatioprina) nos receptores de doadores vivos HLA idênticos;
- terapia tríplice: (prednisona, azatioprina e ciclosporina) nos receptores de doadores vivos HLA não idênticos e de doadores cadavéricos, onde o receptor tinha baixo risco imunológico;

- terapia quadrupla: (prednisona, azatioprina, ciclosporina e anticorpo monoclonal OKT-3) nos retransplantes e nos receptores de doadores cadavéricos com alto risco imunológico.

2.3.3. Avaliação Laboratorial

O acompanhamento laboratorial foi feito no pré e no pós-transplante e constou de:

- exames bioquímicos: glicose, uréia, creatinina, sódio, potássio, CO₂, ALT, AST, fosfatase alcalina. Dosagens feitas diariamente até a alta hospitalar.

- exames hematológicos: hemograma, plaquetas. Dosagens feitas até a alta hospitalar.

- dosagens de marcadores de infecção: anti-HCV, HBsAg, anti-HIV, anti-CMV, anticorpos para herpes e imunofluorescência para toxoplasmose. As dosagens foram feitas pré-transplante e quando houvesse suspeita clínica.

- dosagens de ciclosporina por Fluorimetria Polarizada. Valores normais: 100 a 400 ng/ml), em sangue total, utilizando anticorpo monoclonal. A dosagem foi feita 2 vezes por semana durante a internação e por indicação clínica posteriormente.

Exames adicionais foram solicitados por indicação clínica.

2.3.4. Avaliação por Imagem

No pós-operatório imediato foram realizados rotineiramente um ultrassom e uma cintilografia de fluxo renal com $^{99m}\text{Tc-DTPA}$, os quais foram posteriormente repetidos sempre que os pacientes apresentassem disfunção do enxerto.

2.3.5. Avaliação por Punção Aspirativa Renal (PAR)

Punções aspirativas renais (PAR) foram feitas desde que não houvesse contra-indicações, duas vezes por semana durante a internação e nos episódios de disfunção aguda do enxerto.

Foram consideradas adequadas para diagnóstico as lâminas em que se cumprisse o critério da presença de pelo menos 7 células parenquimatosas (tubulares, endoteliais, glomerulares) para cada 100 leucócitos. Para o diagnóstico citológico de rejeição aguda, utilizou-se o escore do “incremento corrigido total” (ICT) maior ou igual a 3,0 acompanhado de “sinais de imunoativação” assim definidos:

Imunoativação: células imunoativadas (plasmócitos, linfoblastos ou linfócitos ativados), representando mais de 5% do total de leucócitos presentes na lâmina, e/ou presença na lâmina de 5 ou mais células imunoativadas.

Imunoativação Incipiente: células imunoativadas presentes, mas inferiores a 5% do total de leucócitos, e/ou células imunoativadas $>$ ou igual a 1 e $<$ ou igual a 4 por lâmina.

Ausência de Imunoativação: células imunoativadas ausentes na lâmina.

A presença de imunoativação incipiente alertava para a forte possibilidade de rejeição aguda sem, no entanto, confirmá-la (41,66).

A leitura e interpretação dos aspirados renais foram feitas por um citologista que desconhecia a identidade do paciente, o tipo de imunossupressão e o quadro clínico.

2.3.6. Avaliação por Biópsia Renal Percutânea (PBR)

A avaliação por BRP foi realizada sempre que necessário para esclarecer o diagnóstico nos episódios de disfunção do enxerto.

Após a localização do rim por palpação ou por ultrassonografia, as PBR foram feitas com agulhas Vin-Silverman-Franklin (Benton e Dickison - Brasil) ou Tru-cut (Travenol - EUA) através das técnicas habituais. Os fragmentos foram fixados em Duboscq-Brasil por 2 a 4 horas e após, mantidos em álcool etílico 70% até o processamento histotécnico que constou de desidratação em álcool 100%, diafanização em xilol, impregnação em parafina líquida e inclusão em parafina. Cortes histológicos de 4 µm foram feitos em micrótomo (American Optical - EUA). As colorações utilizadas para posterior interpretação foram a Hematoxilina e Eosina (HE), Periodic-acid Schiff (PAS), Prata Metenamina (PASM) e Tricômico Verde (Mason modificado). A interpretação das lâminas foram feitas por um patologista cego para as impressões da equipe de atendimento. Os critérios diagnósticos empregados para esta interpretação foram os seguintes:

Necrose Cortical: focos de necrose coagulativa de parênquima, abrangendo glomérulos, túbulos e estruturas estromais, sem evidência de reação inflamatória. Pode ser focal ou atingir extensas áreas corticais.

Rejeição Aguda: envolvimento tubular, intersticial, vascular e glomerular de diferentes intensidades. Infiltrado intersticial, predominantemente linfocitário, com macrófagos, células plasmáticas, eosinófilos e neutrófilos acompanhado de edema, às vezes hemorrágico, do interstício e dos capilares peritubulares e glomerulares. Tubulite deve estar presente. Componente vascular constando de endovasculite, focos de arterite necrosante, necrose fibrinóide ou trombos de fibrina.

Necrose Tubular Aguda: ectasia tubular, simplificação epitelial, evidências de regeneração tubular constando de atipias epiteliais e mitoses. Edema intersticial e infiltrado intersticial no máximo leve.

Infecção Renal (pielonefrite aguda): infiltrado intersticial predominantemente por neutrófilos (microabscessos intersticiais) com presença de neutrófilos na luz tubular.

Nefrotoxicidade Aguda por Ciclosporina: não existe um quadro morfológico patognomônico. A presença de alterações tubulares leves como ectasia, necrose focal, atenuação do epitélio, microcalcificações e microvacuolização epitelial são sugestivas, assim como infiltrado mononuclear peri-capilar tubular esparso e lesões vasculares com depósitos eosinofílicos, tipo fibrinóide, na média de pequenos vasos (arteriopatía por ciclosporina) (41,66).

2.4. Dosagem da Atividade da ADA Sérica

As dosagens da atividade da ADA sérica foram realizadas no pré-transplante renal (pré-imunossupressão) e no pós-transplante renal, diariamente, ou pelo menos 3 vezes por semana, até a alta hospitalar.

Foram feitas por observador cego para os episódios de rejeição do enxerto renal.

2.4.1. Técnica de dosagem da atividade da ADA:

As dosagens foram realizadas pelo método colorimétrico descrito por Giusti. Toda amostra de sangue periférico admitida na Unidade de Bioquímica era centrifugada a 3500 RPM durante cinco minutos. Posteriormente, eram separados aproximadamente 3 ml do sobrenadante, em tubo de ensaio 12 x 75 mm, e tampados com rolha de borracha. Até ser submetido à dosagem da atividade da ADA, o material era armazenado em refrigerador comum, na temperatura de 4 graus centígrados. As dosagens foram feitas no máximo até 15 dias após a coleta.

Utilizaram-se os seguintes equipamentos:

- Espectrofotômetro Bausch & Lomb Spectronic 88;
- Banho-maria 37 graus C Fanen Ltda.;
- Centrífuga Janetzki T32A;
- Balança analítica MIM Labor;
- Refrigerador Brastemp 440 biplex;
- Deionizador;
- Estante de alumínio para banho-maria;
- Tubo de ensaio 12 x 75 mm;
- Tubo de ensaio 14 x 140 mm;

- Rolha de borracha número 11;
- Rolha de borracha número 14;
- Balão volumétrico de 10 ml;
- Copo de Becker de 10 ml;
- Copo de Becker de 1000 ml;
- Pipeta volumétrica de 1 ml;
- Pipeta graduada de 5 ml;
- Pipeta automática de 50 microlitros;
- Ponteira para pipeta de 50 microlitros;
- Repipetador Labnew de 10 ml.

Foram usados os seguintes reagentes:

- Fosfato diácido de sódio;
- Fosfato ácido de sódio;
- Sulfato de amônia;
- Fenol;
- Nitroprussiato de sódio;
- Hipoclorito;
- Água deionizada;
- Adenosina (adenosine Sigma A 9251 5 gr)

Todas as soluções utilizadas foram preparadas conforme a técnica descrita por Giusti. Teve-se o cuidado de usar água deionizada no preparo das soluções, para evitar a contaminação com amônia. Após preparadas, as soluções eram testadas em relação à presença de amônia, adicionando-se, em tubo de ensaio

de 14 x 140 mm, 3 ml de fenol/nitroprussiato de sódio e 3 ml de hipoclorito alcalino, aquecidos em banho-maria a 37 graus centígrados durante 30 minutos.

As soluções de fenol/nitroprussiato de sódio e hipoclorito alcalino foram colocadas em repipetador de 10 ml para diminuir o manuseio e facilitar a técnica.

Os frascos selecionados para a dosagem eram deixados à temperatura ambiente aproximadamente 30 minutos antes da dosagem. Preparavam-se 10 ml da solução de adenosina nas horas precedentes à dosagem, utilizando papel laminado e balança analítica para a pesagem. A adenosina era colocada em balão volumétrico com 5 ml de solução-tampão, para ser dissolvida em banho-maria a 37 graus centígrados e, posteriormente, diluída até o volume de 10 ml.

Em cada dosagem eram utilizados:

Tubos comuns para todas as dosagens do dia:

- 3 tubos de ensaio com solução padrão;
- 1 tubo de ensaio com branco do reagente;
- 1 tubo de ensaio com branco da adenosina.

Tubos utilizados para cada caso:

- 1 tubo de ensaio com branco das amostras;
- 1 tubo de ensaio com amostra.

Os tubos eram montados conforme o esquema a seguir:

- padrão = 1 ml de solução-padrão (com pipeta volumétrica);
- branco do reagente (BR) = 1 ml da solução-tampão (com pipeta graduada de 5 ml);
- branco da adenosina (BADA) = 1 ml da solução de adenosina (com pipeta graduada de 5 ml);

- branco da amostra (BA) = 50 microlitros de amostra (com pipeta de 50 microlitros) e 1 ml de solução-tampão (com pipeta graduada de 5 ml);
- amostra = 50 microlitros de amostra (com pipeta de 50 microlitros) e 1 ml de adenosina (com pipeta graduada de 5 ml).

Após a pipetagem das soluções e das amostras, nos tubos de ensaio de 14 x 140 mm, tampados com rolha de borracha número 14, os tubos eram colocados na estante de alumínio e deixados em banho maria a 37 graus centígrados por 60 minutos. Após, eram adicionados 3 ml de solução fenol/nitroprussiato de sódio e 3 ml de solução de hipoclorito alcalino em todos os frascos, utilizando-se o repipetador. Os tubos eram mantidos em banho-maria por mais 30 minutos. A homogeneização era assegurada pelo jato das soluções, nos tubos de ensaio, proporcionada pelo repipetador. Terminada esta fase, os tubos eram retirados do banho-maria e destampados, sendo então medida a absorbância do líquido resultante da reação em espectrofotômetro (especificado acima) em comprimento de onda de 620 nm.

Quando a absorbância do branco do reagente e do branco da adenosina ultrapassava 0,040 ou quando a absorbância do padrão era maior que dois desvios-padrão da média dos padrões, toda a dosagem era refeita.

O cálculo da atividade da adenosina deaminase foi feito baseado na seguinte fórmula:

$$\text{ATIVIDADE DA ADA} = \frac{(\text{AMOSTRA} - \text{BA}) - (\text{BADA} - \text{BR}) \times 50}{\text{PADRÃO} - \text{BR}}$$

O resultado foi expresso em UI/l a 37 graus centígrados até a primeira casa decimal (38,81).

2.5. Critérios Diagnósticos

As disfunções agudas do enxerto - aqui conceituadas como aumento confirmado, significativo (maior ou igual a 0,3 mg/dl) da creatinina sérica, ou a ausência de queda aos níveis esperados no pós-operatório - acompanhadas ou não de febre, aumento do volume do enxerto, hipertensão arterial, edema e oligúria foram investigadas com cintilografia de fluxo, ecografia, dosagem de ciclosporina sérica, punção aspirativa renal, exame do sedimento urinário e exame cultural de urina. As rejeições agudas foram diagnosticadas retrospectivamente a partir de informações obtidas da revisão dos prontuários, por dois nefrologistas, cegos para os resultados da atividade da ADA sérica, com base no aumento da creatinina sérica, acompanhado ou não de quadro clínico típico, acima descrito, e levando-se em conta os exames cintilográficos, ecográficos e os demais citados na avaliação de disfunção renal aguda do enxerto, além da resposta ao tratamento recebido. O tratamento de rejeição aguda foi feito com metilprednisolona (7mg/Kg) por 3 a 5 dias. Sempre que não houve resposta ao tratamento inicial da rejeição, foi realizada a PBR e, caso demonstrasse persistência da rejeição aguda, com componente celular predominante, foi caracterizada a situação de rejeição córtico-resistente, sendo administrado o anticorpo monoclonal OKT-3®.

Os episódios de nefrotoxicidade por Ciclosporina foram diagnosticados na presença de quadro clínico compatível associado ou não a nível sérico elevado,

biópsia renal compatível, ou ainda, melhora da função renal com diminuição ou suspensão da droga. O diagnóstico de NTA foi feito no paciente sem as condições acima citadas e que necessitava de hemodiálise na primeira semana pós-transplante.

Os períodos pré-rejeição, rejeição e pós-rejeição foram definidos de acordo com os seguintes critérios:

* pré-rejeição = valores medianos de ADA nos dias 2, 3 e 4 pós-transplante;

* rejeição = - pacientes com rejeição: medianas de ADA nos dias de rejeição e dia anterior e posterior.

- pacientes sem rejeição: como os pacientes que rejeitaram tiveram maior frequência de episódios no sexto dia pós-transplante, avaliou-se os valores medianos de ADA nos dias 5, 6 e 7 pós-transplante como período rejeição para estes pacientes.

* pós-rejeição = - pacientes com rejeição: mediana dos dias 5, 6 e 7 pós-rejeição

- pacientes sem rejeição: dias 11,12 e 13 pós-transplante que correspondem aos dias 5,6 e 7 após o sexto dia.

Hepatite B e hepatite C e síndrome de imunodeficiência adquirida foram diagnosticados considerando-se a positividade em sangue periférico para o método de Elisa (HbsAg, anti-HCV e anti-HIV respectivamente). Citomegalovírus foi considerado quando o paciente apresentava sorologia positiva para IgG quatro vezes ao valor prévio ou IgM positiva e quando houvesse quadro clínico de febre, leucopenia ou manifestação de invasão tecidual. Toxoplasmose e Herpes foram diagnosticados com base em imunofluorescência e anticorpos presentes.

2.6. Análise Estatística

2.6.1. Programas Utilizados

O programa utilizado na formação do banco de dados foi o Epi Info Versão 6.1. Nas análises estatísticas, usou-se o programa denominado SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), Versão 4.0.

2.6.2. Avaliação dos Parâmetros diagnósticos

A avaliação do uso da atividade sérica da adenosina deaminase como método diagnóstico de rejeição celular aguda do enxerto renal foi realizado através da determinação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acuidade usando-se como pontos de corte valores de ADA >35, >40, >45, >50 e >30% ao valores do período pré-rejeição. Estes índices foram calculados pelo confronto do diagnóstico clínico-laboratorial com os resultados dos testes diagnósticos conforme apresentado no quadro 1. Através dos valores de sensibilidade e especificidade para esses pontos de corte de ADA, utilizou-se uma curva “Receiver Operator Characteristic” (ROC) com o objetivo de identificar o melhor ponto de corte para o diagnóstico de rejeição celular aguda. A sensibilidade e a especificidade avaliam a eficiência com que o teste diagnóstico identifica corretamente os pacientes com e sem a doença em estudo. O valor preditivo informa

sobre a eficácia com que o resultado positivo ou negativo no teste diagnóstico prognostica corretamente a presença ou ausência da doença. A acuidade expressa a percentagem total da concordância entre o teste diagnóstico e o diagnóstico de certeza .

Com a finalidade de verificar diferenças na associação entre dois ou mais grupos independentes, foram utilizados os testes de Mann-Whitney (MW) e Qui-Quadrado (X^2) respectivamente.

O nível de significância adotado foi p menor do que 0,05.

QUADRO 1. Comparação entre o Diagnóstico de Certeza e os Resultados do Teste Diagnóstico

Teste Diagnóstico	Doença	
	Presente	Ausente
Positivo	Positivo	Falso positivo
Negativo	Falso negativo	Negativo

a	b
c	d

$$\text{Sensibilidade} = a / (a + c)$$

$$\text{Especificidade} = d / (b + d)$$

$$\text{Valor preditivo positivo} = a / (a + b)$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = d / (c + d)$$

$$\text{Acuidade} = (a + d) / (a + b + c + d)$$

3. RESULTADOS

3.1 Características da Amostra

Foram estudados 35 pacientes transplantados renais no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de outubro de 1995 a dezembro de 1996.

As características destes pacientes podem ser observadas na Tabela 1.

Tab.1- Características dos pacientes

Sexo	Feminino	Masculino	Total
Idade (média)	35,53	42,60	39,06
Doador (vivo/cadáver)	8/7	9/11	17/18
Imunosupressão			
- pred + aza	3	3	6
- pred + aza + CsA	10	15	25
- pred + aza + CsA + OKT3	2	2	4
NTA (sim/não)	4/11	6/14	10/25
Anti-HCV (sim/não)	5/10	14/6	19/16
Rejeição Aguda (sim/não)	8/7	10/10	18/17

3.2. VALORES DE ADA

Os pacientes foram acompanhados durante o período de hospitalização pós-transplante até a alta hospitalar, em média com 19,6 dias de internação, com medidas seriadas dos valores de ADA, com frequência de 3 a 5 medidas por semana.

Nesse período foram realizadas 424 dosagens de ADA com média de 12,1 por cada paciente.

Para a análise dos resultados estabeleceu-se os valores medianos de ADA para cada paciente ao longo do seu acompanhamento (ADAm).

Na figura 3 observa-se a evolução dos valores medianos de ADA de todos os pacientes durante o primeiro mês pós-transplante.

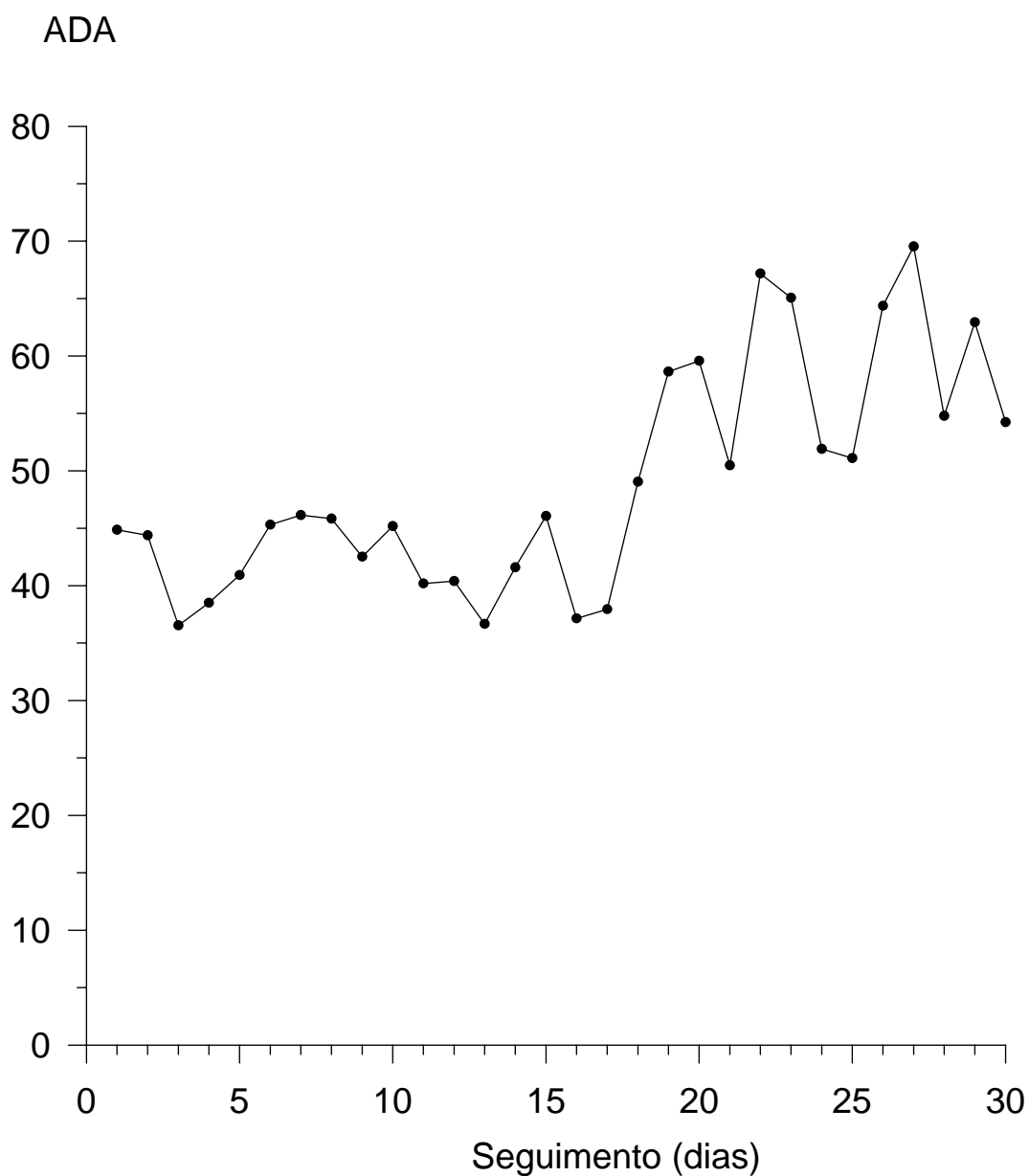


Fig.3- Medianas das ADAs de todos pacientes durante o primeiro mês pós-transplante.

Os valores de ADA de cada paciente foram agrupados nas medianas do período pré-rejeição (ADApré), a mediana do período de rejeição (ADArej) e a mediana do período pós-rejeição (ADApós), conforme demonstrado na Tabela 2.

Tab.2- Mediana das ADAs

p	n	ADApré med(min/max)	ADArej med(min-max)	ADApós med(min-max)	mediana total med(min-max)
1	11	27,17 (26,18-28,16)	45,26 (44,06-46,34)	33,72 (33,21-34,22)	36,87 (26,18-46,34)
2	4	36,15 (36,15-36,15)	41,83 (36,08-47,57)	-	42,79 (51,35-36,15)
3	12	35,70 (34,62-36,78)	45,31 (45,31-45,31)	43,33 (43,33-43,33)	46,04 (34,62-58,15)
4	8	26,54 (26,64-26,64)	43,96 (43,45-44,46)	-	41,07 (26,54-50,88)
5	15	43,45 (39,58-47,31)	56,38 (55,50-57,26)	50,00 (50,00-50,00)	41,18 (24,57-58,80)
6	6	34,23 (28,24-38,51)	50,62 (48,17-53,06)	-	41,18 (28,24-53,06)
7	13	33,37 (33,37-33,37)	51,28 (42,73-59,82)	26,60 (26,60-26,60)	35,91 (29,81-59,82)
8	22	48,32 (45,48-51,15)	60,45 (59,35-61,55)	88,03 (80,87-95,19)	80,12 (45,48-130,61)
9	4	61,59 (57,70-65,47)	60,16 (60,16-60,16)	-	59,55 (54,85-65,47)
10	5	61,14 (56,29-65,98)	76,71 (71,93-81,48)	-	67,62 (56,29-81,48)
11	22	79,90 (77,72-83,29)	113,52 (110,65-116,39)	107,05 (96,90-117,20)	81,97 (64,35-117,20)
12	19	35,04 (35,04-35,04)	37,50 (27,96-39,69)	38,29 (36,66-39,91)	40,55 (27,96-56,37)
13	21	48,69 (45,04-52,34)	78,85 (68,68-89,01)	43,09 (38,19-49,59)	57,15 (38,19-89,01)
14	12	40,25 (38,80-46,33)	43,69 (43,69-43,69)	40,40 (40,40-40,40)	35,36 (24,01-46,33)
15	19	29,33 (27,49-31,16)	33,08 (32,99-33,17)	25,77 (13,66-35,90)	35,00 (13,66-51,90)
16	16	52,63 (51,70-53,56)	89,68 (82,42-96,93)	85,91 (82,87-99,03)	88,65 (51,70-121,36)
17	19	15,65 (13,57-19,50)	22,40 (22,40-22,40)	41,20 (41,20-41,20)	21,23 (5,30-41,20)
18	24	71,51 (71,51-71,51)	124,53 (110,61-138,45)	-	117,31 (44,34-168,48)
19	13	37,04 (36,91-49,13)	39,04 (39,04-39,04)	40,18 (40,18-40,18)	39,55 (33,37-49,13)
20	7	26,04 (24,57-27,51)	30,68 (30,68-30,68)	-	33,95 (24,57-40,00)
21	9	25,29 (22,98-25,52)	42,22 (42,22-42,22)	-	37,90 (22,98-54,95)
22	11	46,26 (45,45-53,07)	55,61 (55,61-55,61)	47,62 (47,62-47,62)	45,07 (35,58-55,61)
23	13	42,61 (36,92-46,36)	46,97 (46,97-46,97)	30,07 (30,07-30,07)	44,75 (30,07-58,83)
24	12	33,38 (31,77-34,98)	40,77 (36,24-45,30)	39,06 (39,06-39,06)	37,79 (29,60-55,85)
25	11	48,32 (37,50-61,18)	50,78 (50,78-50,78)	49,31 (49,31-49,31)	49,40 (37,50-61,18)
26	4	19,40 (19,40-19,40)	22,80 (22,80-22,80)	17,40 (17,40-17,40)	17,03 (8,50-22,80)
27	8	37,88 (32,66-43,09)	97,93 (97,93-97,93)	83,79 (83,79-83,79)	81,24 (37,88-138,82)
28	8	24,00 (21,50-27,00)	15,60 (15,60-15,60)	4,10 (4,10-4,10)	16,22 (4,10-27,00)
29	11	43,84 (31,56-45,33)	51,42 (51,42-51,42)	39,43 (49,43-49,43)	46,77 (28,99-74,70)
30	9	61,01 (58,21-60,56)	67,74 (67,74-67,74)	95,59 (95,59-95,59)	79,89 (58,21-99,85)
31	11	64,56 (44,37-69,13)	-	82,40 (82,40-82,40)	63,07 (44,37-82,40)
32	9	23,64 (16,03-26,03)	25,17 (22,99-27,35)	31,50 (24,77-38,23)	27,40 (16,03-38,38)
33	12	16,50 (10,95-22,05)	39,47 (26,12-52,81)	21,80 (21,80-21,80)	27,54 (10,95-52,81)
34	10	-	24,60 (18,30-32,80)	22,55 (14,60-30,50)	20,52 (8,90-32,80)
35	14	43,84 (36,32-64,88)	53,96 (53,96-53,96)	55,59 (55,59-55,59)	76,11 (36,32-160,84)

- p=pacientes
- n= número de dosagens de ADA

Os valores de ADA dos períodos pré-rejeição, rejeição e pós-rejeição podem ser observados na tabela a seguir.

Tab. 3- Mediana das ADAs totais dos períodos pré, rejeição e pós rejeição

	N	Med(min/máx)
ADApré	34	37,46(15,65-79,90)
ADArej	34	46,14(15,60-124,53)
ADApósrej	27	40,40(4,10-107,05)

ADArej > ADApré p=0,022 (MW)

ADArej > ADApós p=0,113 (MW)

ADApré x ADApós=0,429 (MW)

Observa-se que houve um aumento significativo da ADA no período de rejeição quando comparado ao período pré-rejeição.

3.3. ADA E REJEIÇÃO

A frequência dos episódios de rejeição aguda durante o período de acompanhamento pode ser vista na Figura 4.

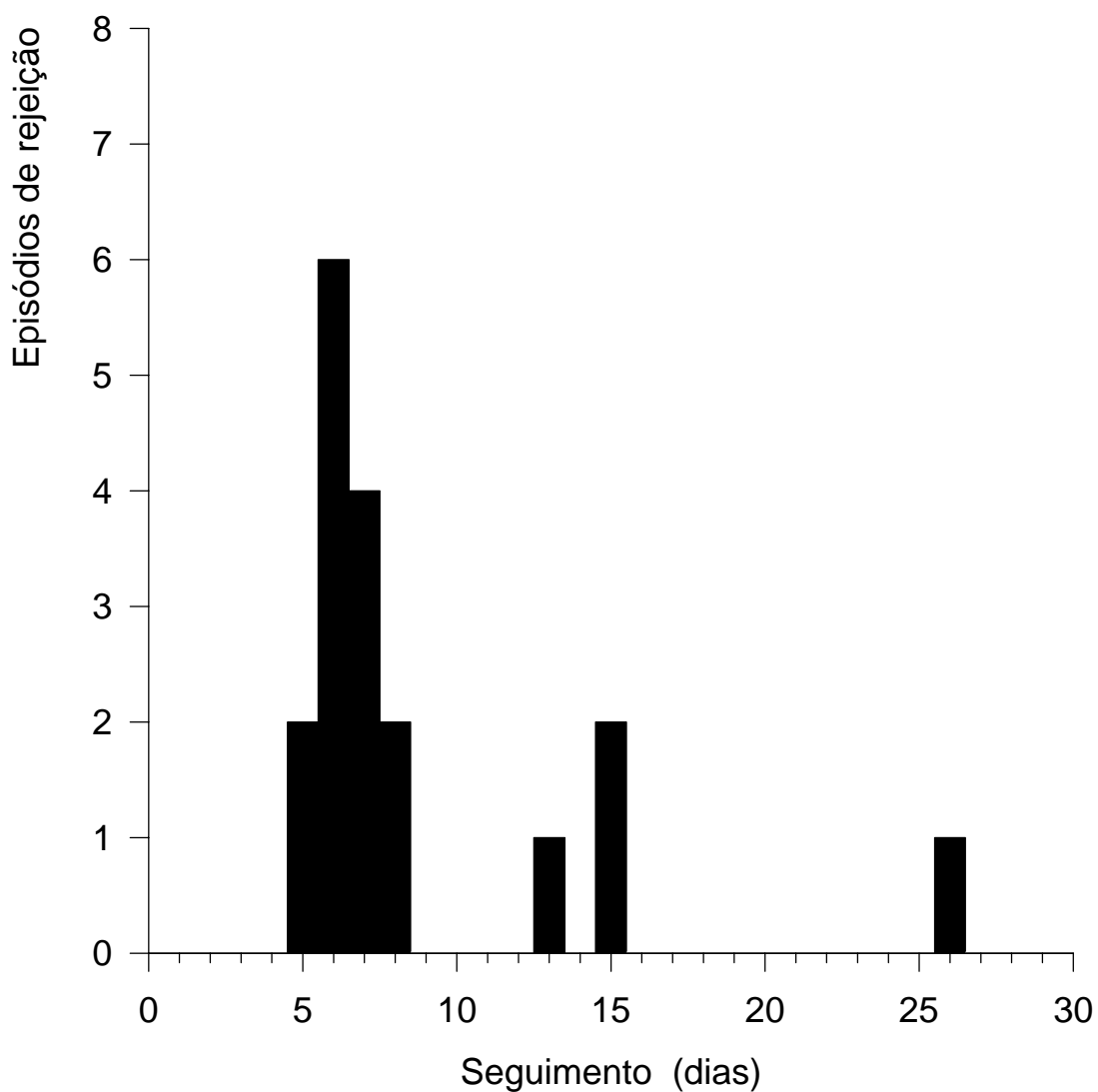


Fig.4- Frequência dos episódios de rejeição aguda durante o período de acompanhamento pós-transplante.

Observou-se que a mediana dos episódios de rejeição celular aguda neste grupo de pacientes ficou entre o sexto e o sétimo dia pós-transplante.

Na Figura 5 encontra-se os valores medianos de ADA nos pacientes que apresentaram rejeição aguda e nos que não tiveram rejeição no período de acompanhamento.

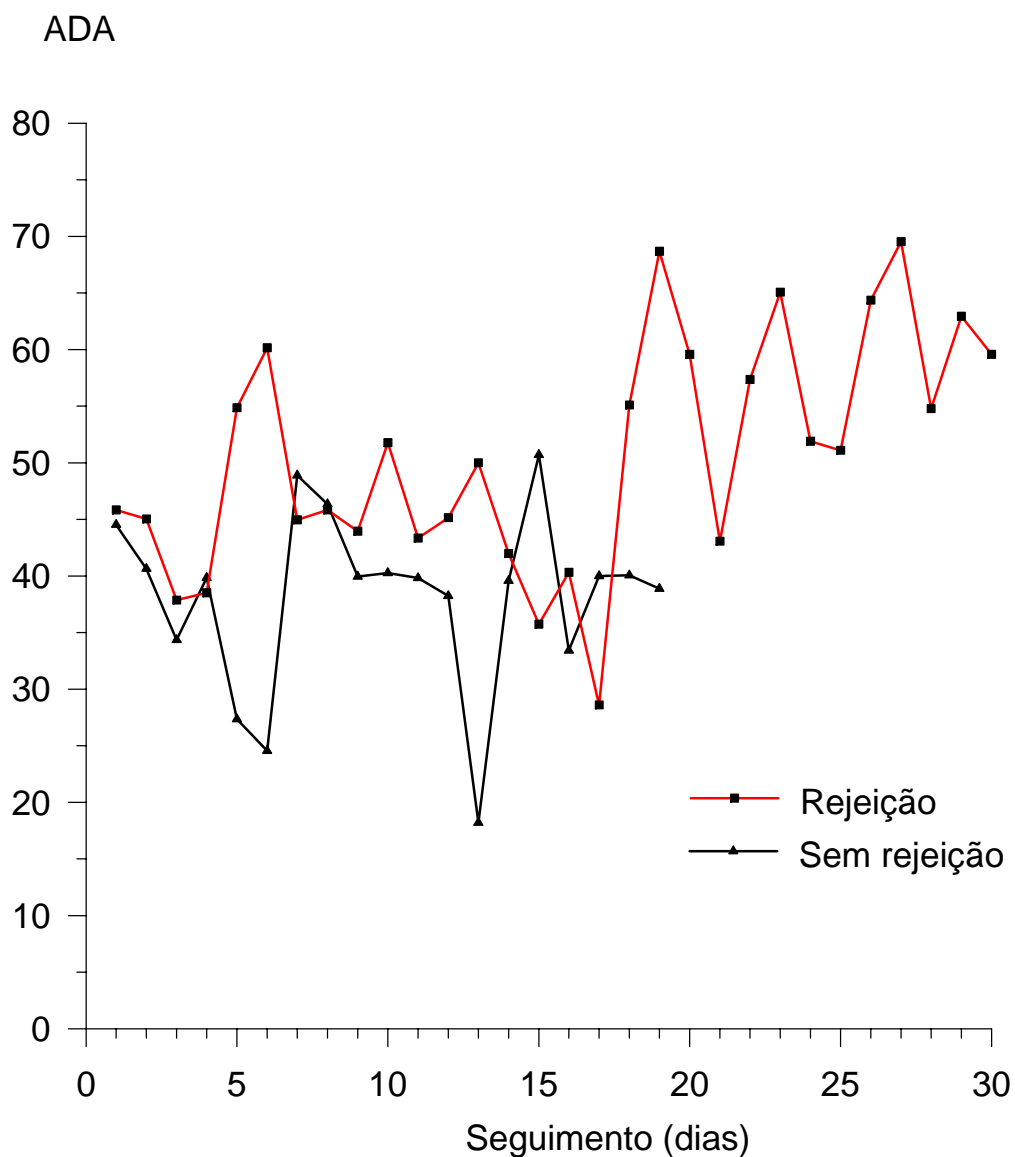


Fig. 5- Medianas das ADAs dos pacientes com e sem rejeição

Houve diferença estatisticamente significativa nos valores medianos de ADA no sexto dia de seguimento entre os pacientes com rejeição em relação aos sem rejeição celular aguda. ($p=0,021$ MW)

Na Tabela 4 e Figura 6 encontram-se as comparações dos valores de ADA nos períodos pré-rejeição, rejeição e pós-rejeição dos pacientes com e sem episódios de rejeição aguda durante o acompanhamento.

Tab. 4- Mediana dos valores de ADA nos períodos pré, durante e pós-rejeição dos pacientes com e sem rejeição aguda.

Grupo	N	Med(min/máx)	p (MW)
Com Rejeição			
1.ADApré	18	38,20(15,65-79,90)	2 > 1=0,026
2.ADArej	18	50,95(22,40-124,53)	2 > 3=0,084
3.ADApós	18	42,15(25,77-107,05)	1 x 3=0,512
Sem Rejeição			
4.ADApré	17	37,46(16,50-64,56)	5 > 4=0,178
5.ADArej	17	41,50(15,60-97,93)	5 > 6=0,339
6.ADApós	17	39,43(4,10-95,59)	4 x 6=0,621

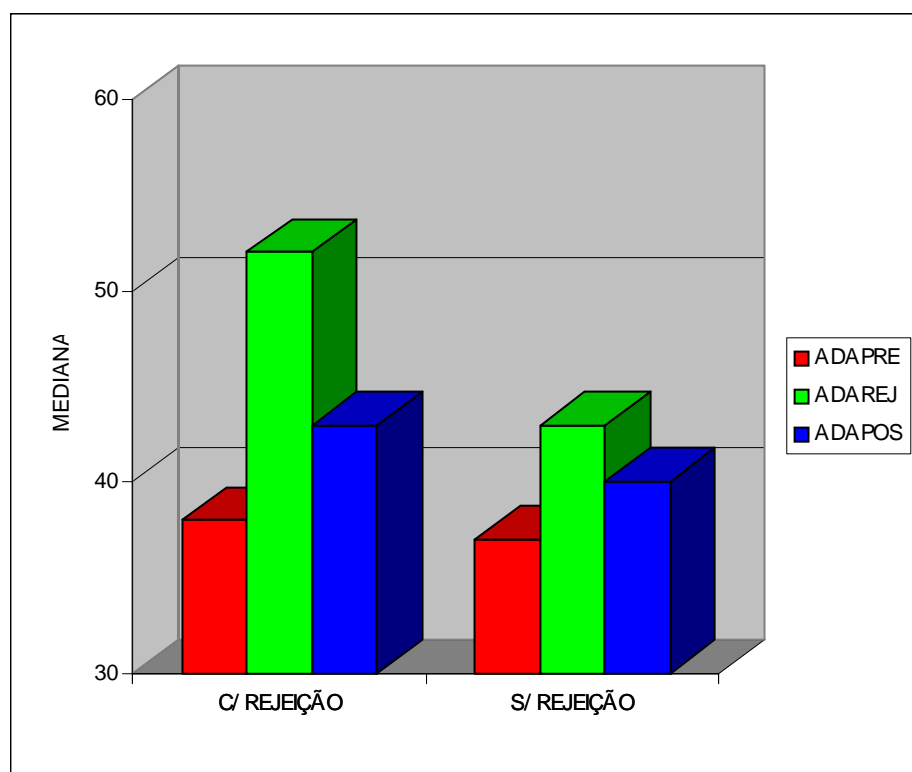


Fig.6 - Mediana dos valores de ADA nos períodos pré, durante e pós-rejeição em pacientes com e sem rejeição

Analisando-se os pacientes que tiveram rejeição aguda, encontrou-se valores de ADA significativamente aumentados no período de rejeição, atingindo significância estatística quando comparado ao período pré-rejeição ($p=0,026$) e não se observou significância estatística quando comparado com o período pós- rejeição ($p=0,084$).

Não houve variações significativas nos valores de ADA nos pacientes que não tiveram rejeição aguda.

Para avaliar a eficácia da ADA como método diagnóstico de rejeição aguda, empregou-se diferentes pontos de corte nos valores de ADA. Na tabela 5 observa-se a associação entre o diagnóstico de rejeição pela ADA em relação ao padrão ouro.

Tab.5- Pontos de corte dos valores de ADA como método diagnóstico

	REJEIÇÃO		p (X^2)
	SIM	NÃO	
ADA>30%			
sim	10	3	0,035
não	8	14	
ADA>35			
sim	16	12	0,23
não	2	5	
ADA>40			
sim	15	10	0,15
não	3	7	
ADA>45			
sim	12	8	0,31
não	6	9	
ADA>50			
sim	10	7	0,50
não	8	10	

ADA maior que 30% foi considerada positiva para rejeição aguda quando os valores medianos de ADA no período de rejeição fossem maiores do que 30% dos valores obtidos no período pré-rejeição.

Observa-se associação estatisticamente significativa entre o aumento de ADA >30% e o diagnóstico de rejeição aguda.

Na tabela 6 pode ser observado a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VP+), o valor preditivo negativo (VP-) e acuidade da ADA para o diagnóstico de rejeição aguda nos diferentes pontos de corte.

Tab.6- ADA como teste diagnóstico

	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VP+ (%)	VP- (%)	Acuidade (%)
ADA>30%	55,5	82,3	76,9	63,6	69
ADA>35	88	29	57	71	60
ADA>40	83	41	60	70	62
ADA>45	66	52	60	60	60
ADA>50	55	58	58	55	57

Para se verificar o melhor ponto de corte nos valores de ADA para o diagnóstico de rejeição aguda os dados de sensibilidade e especificidade foram colocados em curva ROC (Figura 7).

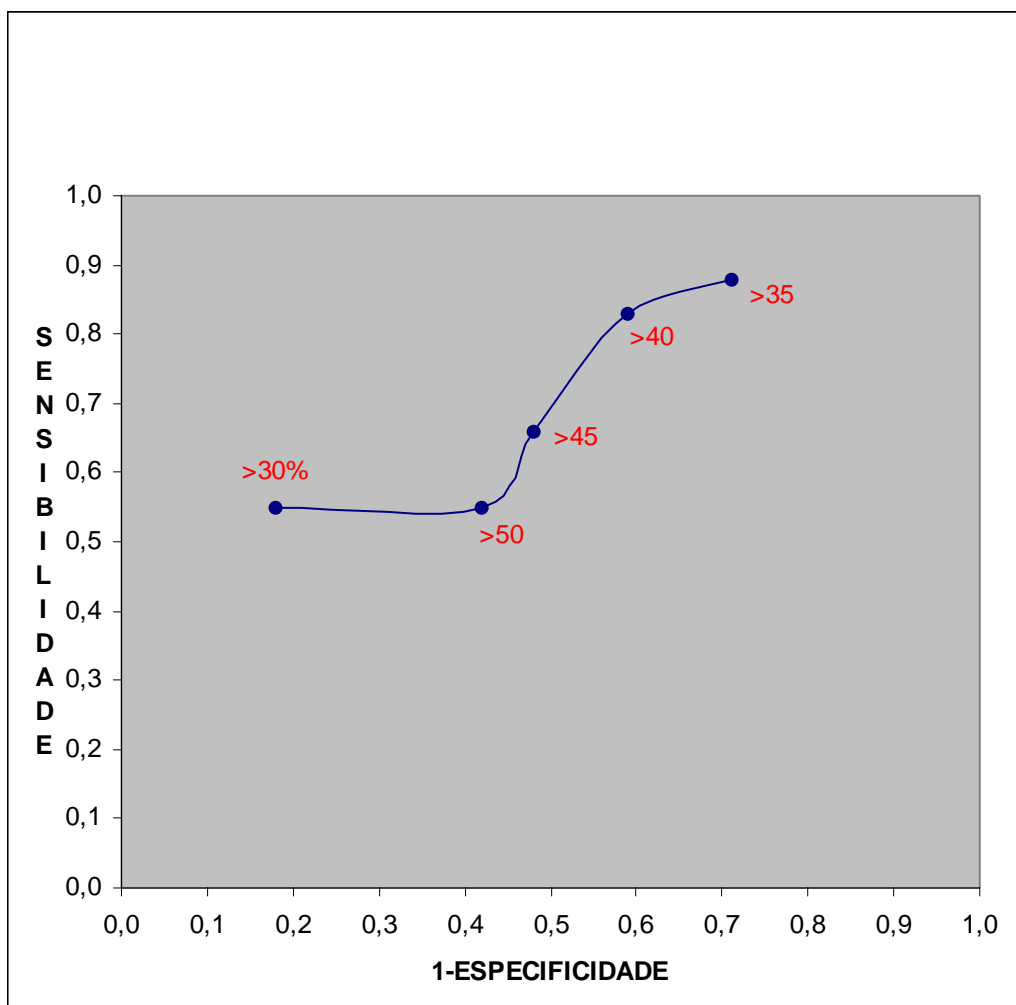


Fig.7- Curva ROC.

Observa-se pela curva ROC que o melhor ponto de corte dos valores de ADA para o diagnóstico de rejeição aguda foi o aumento dos valores de ADA acima de 30% .

3.4. Valores de ADA em pacientes anti-HCV positivos e com NTA

Os valores medianos da ADA nos pacientes com e sem anti-HCV e NTA podem ser vistos na Tabela 7.

Tabela 7. Valores medianos de ADA nos pacientes com e sem anti-HCV e NTA

	n	Mediana (val min/val max)	p (MW)
1. HCV +	19	46,04 (17,03-117,31)	1 x 2 =0,037
2. HCV -	16	37,33 (16,22-76,11)	
3. NTA +	10	69,59 (35,00-117,31)	3 x 4 =0,002
4. NTA -	25	39,55 (16,22-81,24)	

Observa-se que os valores medianos de ADA nos pacientes com HCV+ e necrose tubular aguda são significativamente superiores aos pacientes sem essas patologias.

Na Tabela 8 são apresentados os valores medianos das ADAs desses pacientes em relação a presença ou ausência de rejeição.

Tab. 8- ADA no acompanhamento do pós-tx dos pacientes com anti-HCV e NTA

	n	ADA Total Mediana (val max/val min)	p (MW)
HCV +			
com rejeição	11	59,55 (40,55-117,31)	0,098
sem rejeição	8	41,325 (17,03-81,24)	
HCV -			
com rejeição	7	35,91 (21,23-57,15)	0,491
sem rejeição	9	39,55 (16,22-76,11)	
NTA +			
com rejeição	8	69,835 (35,0-117,31)	1,0
sem rejeição	2	69,59 (63,07-76,11)	
NTA -			
com rejeição	10	40,81 (21,23-67,62)	0,739
sem rejeição	15	37,90 (16,22-81,24)	

* MW=Mann-Whitney

Não encontrou-se diferença estatisticamente significativa nos valores de ADA dos pacientes com e sem rejeição quando comparados nas situações de portadores ou não de anti-HCV ou de necrose tubular aguda (NTA).

A comparação dos valores de ADA no período de rejeição entre pacientes com e sem rejeição aguda dentro dos subgrupos portadores ou não de anti-HCV e de NTA pode ser verificada na tabela 9, figura 8 e 9.

Tab.9 - ADA no período de rejeição nos pacientes com e sem anti-HCV e NTA

	n	ADA na REJEIÇÃO Mediana (val min/val max)	p (MW)
HCV +			
com rejeição	11	60,16 (37,50-124,53)	0,117
sem rejeição	8	43,59 (22,80-97,93)	
HCV -			
com rejeição	7	43,69 (22,40-78,85)	0,643
sem rejeição	8	39,90 (15,60-55,61)	
NTA +			
com rejeição	8	69,65 (33,08-124,53)	0,439
sem rejeição	1	53,96 (53,96-53,96)	
NTA -			
com rejeição	10	44,61 (22,40-76,71)	0,471
Sem rejeição	15	40,77 (15,60-97,93)	

* MW=Mann-Whitney

Também não se evidenciou nenhuma diferença estatisticamente significativa nos valores de ADA no período de rejeição quando se comparou os pacientes com e sem rejeição dentro dos subgrupos de portadores ou não de anti-HCV ou NTA.

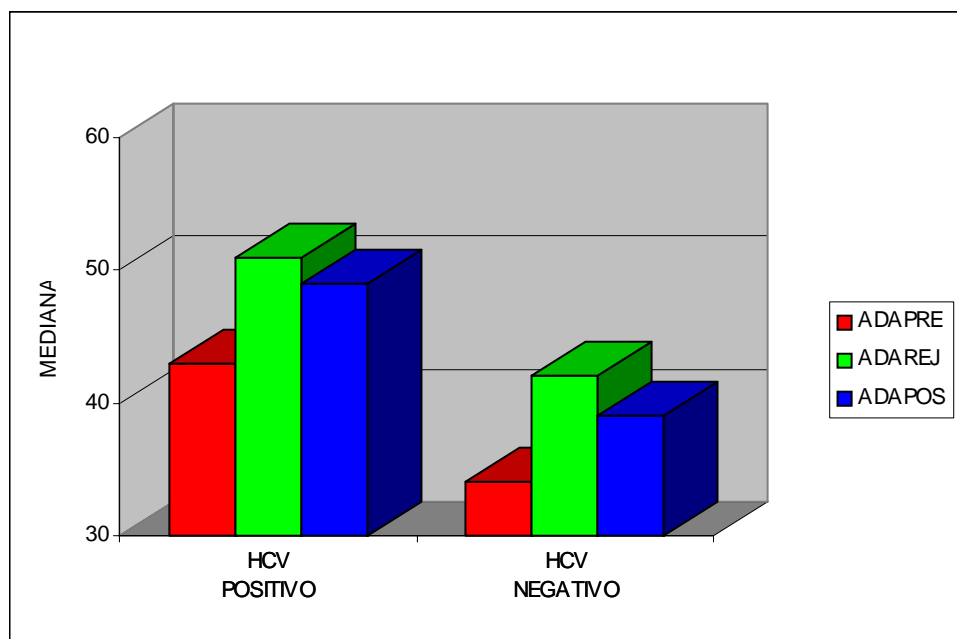


Fig. 8- Valores de ADA durante o período pré, durante e pós-rejeição em pacientes com e sem anti-HCV.

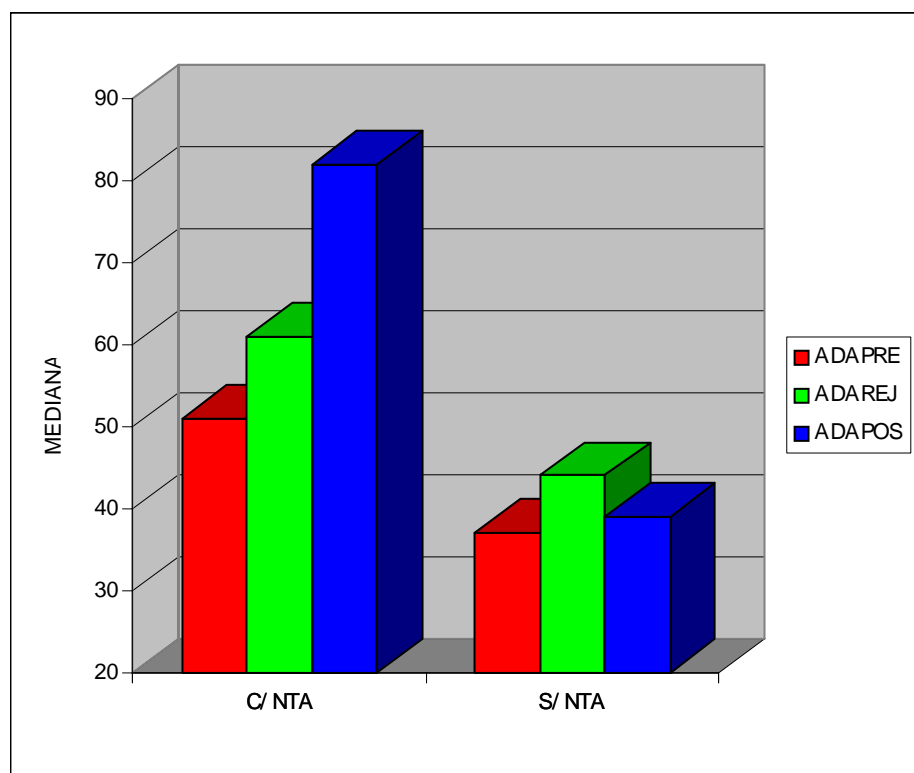


Fig.9 - Valores de ADA nos períodos pré, durante e pós-rejeição em pacientes com e sem NTA.

Os valores de ADA dos períodos pré-rejeição, rejeição e pós-rejeição em pacientes que tiveram NTA e/ou fossem anti-HCV + podem ser observados na tabela abaixo.

Tab. 10 - Mediana das ADAs dos períodos pré, rejeição e pós-rejeição em pacientes com NTA e/ou HCV+

	N	Mediana(min/máx)
ADApré	22	43,65(16,50-79,90)
ADArej	22	52,37(22,80-124,53)
ADApós	17	49,31(14,40-107,05)

Adarej > Adapré p=0,045 (MW)

Adarej > Adapós p=0,235 (MW)

Adapré x Adapós p=0,357 (MW)

Verifica-se que nesse sub-grupo de pacientes persiste um aumento significativo da ADA no período de rejeição, quando comparado aos valores pré-rejeição (p=0,045).

Na Tabela 11 encontram-se as comparações dos valores de ADA nos períodos pré-rejeição, rejeição e pós-rejeição dos pacientes com e sem episódios de rejeição aguda no sub-grupo de pacientes com NTA e /ou anti-HCV+.

Tab.11 - Mediana dos valores de ADA nos períodos pré, durante e pós-rejeição dos pacientes com NTA e/ou HCV+, de acordo com a presença ou não de rejeição aguda.

	N	Med(min/máx)	p(MW)
Com Rejeição			
1.ADApré	13	48,32(26,54-79,90)	2 > 1 p=0,050
2.ADArej	13	60,16(33,08-124,53)	2 > 3 p=0,223
3.ADApós	8	46,67(25,77-107,05)	1 x 3 p=0,491
Sem Rejeição			
4.ADApré	9	42,61(16,50-64,56)	5 > 4 p=0,213
5.ADArej	9	46,97(22,80-97,93)	5 > 6 p=0,430
6.ADApós	9	39,43(17,40-95,59)	4 x 6 p=0,480

A análise desse sub-grupo de pacientes não mostra qualquer diferença significativa nos valores de ADA nos pacientes que não tiveram rejeição e, apesar da

redução da amostra, uma tendência de aumento da ADA no período de rejeição em relação ao período pré-rejeição, nos pacientes que tiveram rejeição aguda ($p=0,05$ MW).

4. DISCUSSÃO

O objetivo central do presente estudo foi analisar a utilidade da atividade sérica da enzima adenosina deaminase (ADA), como método diagnóstico da rejeição celular aguda do transplantado renal. Episódios de rejeição celular aguda tem um grande impacto na sobrevida do enxerto, diminuindo no primeiro ano em 18 e 27% a sobrevida do enxerto de receptores vivos e cadavéricos, respectivamente (100). Alguns desses enxertos não irão recuperar sua função, mesmo com terapia antirejeição máxima, e mesmo quando recuperam, terão em um ano diminuídas em 10% a sua sobrevida, quando comparados aos enxertos livres de rejeição. Além disso, episódios de rejeição tem um impacto negativo a longo prazo na sobrevida do enxerto, sendo um grande preditor da ocorrência de rejeição crônica, a qual é um dos maiores responsáveis pela perda do enxerto após o primeiro ano de transplante (100). A premissa de que a ADA poderia ser útil para o diagnóstico de rejeição celular aguda apoia-se na seguinte observação: rejeição celular aguda é desencadeada predominantemente por linfócitos T e, há na literatura vasta descrição da correlação entre a ADA e resposta imune celular. A ADA é uma enzima do metabolismo das purinas que é particularmente rica em tecidos linfóides, com atividade 10 a 12 vezes maior em células T do que em células B, portanto espera-se que esteja aumentada em casos de rejeição celular aguda (64,84) e visto ser facilmente dosada através de métodos não invasivos poderia ser de auxílio no diagnóstico de rejeição aguda.

4.1. Características da Amostra

As características da amostra dos pacientes deste estudo encontram-se na Tabela 1. Uma análise dos 228 transplantados renais acompanhados nos últimos seis anos no Serviço de Transplante Renal do HCPA revela que a idade média foi de 38 anos, número de transplantes com doadores cadáveres foi 130 (21,7/ano), com doador vivo de 98 (16,6/ano) e episódios de NTA em 46,1% (dados não publicados). Estes dados são semelhantes àqueles apresentados pelos pacientes na amostra estudada (Tabela 1). Os pacientes utilizaram doses de medicações imunossupressoras (ciclosporina, azatioprina e prednisona) dentro da faixa usualmente empregada pela maior parte dos que utilizam terapia “tríplice” (44, 62, 87, 94). A função renal expressa pelos níveis de creatinina sérica, encontra-se nos níveis, em geral, apresentados por pacientes que fazem uso de ciclosporina na terapia imunossupressora (16, 22, 60). Portanto, a presente amostra é representativa da prática atual de transplante renal no HCPA em termos de idade, de doses de medicações imunossupressoras, função renal e tipo de doador, pelo menos a curto prazo e pode, portanto, ser considerada adequada para avaliar a ADA como método diagnóstico de rejeição aguda. Os critérios diagnósticos utilizados (clínicos, laboratoriais, de imagem, por punção aspirativa e biópsia renal do enxerto) para definir os episódios de rejeição celular aguda são os habitualmente empregados nos pacientes acompanhados e estudados no HCPA, e em serviços de transplantes descritos amplamente na literatura.

4.2. ADA e Rejeição

O diagnóstico de rejeição celular aguda deve sempre ser suspeitado em pacientes transplantados com aumento da creatinina sérica. A associação de sinais clínicos como diminuição do débito urinário, aumento da pressão arterial sistêmica, febre, dor, edema e sensibilidade no local do enxerto ajudam no diagnóstico. Entretanto, com o uso de ciclosporina, esses achados muitas vezes não são encontrados dificultando o diagnóstico. Além do que, no diagnóstico diferencial de rejeição incluem-se outros insultos como necrose tubular aguda, nefrotoxicidade por ciclosporina, obstrução ou infecção do trato urinário e raramente, trombose arterial e/ou venosa aguda que são tratadas de maneira diferente e específica para cada caso (100). A obstrução do trato urinário pode usualmente, ser detectada por ecografia renal e a oclusão vascular renal pode ser excluída ou confirmada por métodos cintilográficos. A vasoconstrição induzida pela ciclosporina pode piorar a injúria isquêmica do enxerto renal, sendo que a diminuição das doses desta droga imunossupressora poderão ou não reverter a nefrotoxicidade pela ciclosporina. Em casos de necrose tubular aguda não há tratamento específico, mas ocorre recuperação da função renal no intervalo de algumas semanas. Nesta situação, a ausência inicial de função renal torna o diagnóstico de rejeição aguda mais difícil. Assim, a ausência de obstrução na ecografia e níveis de ciclosporina não elevados, fazem com que seja indicada a realização de biópsia renal em pacientes com retardo ou piora da função renal que persiste por mais de uma semana após o transplante renal. Em pacientes com alto risco imunológico, como os hipersensibilizados ou os politransfundidos, pode ser necessário a realização mais precoce da biópsia renal a fim de detectar rejeição celular aguda oculta. Embora a ecografia e a cintilografia sejam métodos

relativamente não invasivos, não são suficientemente sensíveis ou específicos no diagnóstico de rejeição aguda (66).

A biópsia renal percutânea vem sendo considerada como padrão-ouro para a avaliação dos métodos diagnósticos de rejeição aguda do transplante renal, apresentando contudo riscos, por ser um método invasivo, podendo apresentar complicações, tais como hematúria macroscópica, anúria transitória, devido a obstrução por coágulos (1,2%), hematoma perirrenal (0,7%) e hematoma retroperitoneal (0,2%) (100). A sua validade como padrão-ouro é questionada, uma vez que apresenta limitações como as decorrentes de amostragem, variabilidade de interpretação e a impossibilidade de repetição com maior frequência. Além disso, há o problema da inespecificidade do infiltrado intersticial, em geral atribuído a rejeição aguda, mas que pode também, ser devido a nefrotoxicidade por ciclosporina, ou não representar relevância como mediador ou marcador de rejeição aguda (66). Uma alternativa é a aspiração com agulha fina do enxerto com subsequente exame citológico do infiltrado de células do enxerto. Esta técnica tem mais de 90% de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de rejeição celular aguda em vários centros de transplante. Em estudo feito por Manfro observou-se especificidade de 87,3%, sensibilidade de 71,8% e acurácia de 84,9% (66). Pelo fato de ter baixa morbidade, pode ser repetidamente realizada para o seguimento do enxerto à resposta terapêutica. Entretanto, esta técnica apresenta limitações como as decorrentes da amostragem e variabilidade de interpretação (66). A avaliação do número de células imunoativadas na amostra tem sido sugerida como um critério isolado de boa acurácia para o diagnóstico de rejeição aguda de enxertos renais (49,126). Nestes trabalhos, constatou-se que as células imunoativadas estão significativamente

aumentadas nos episódios de rejeição aguda, que elas diminuem com o tratamento da rejeição e que além da rejeição aguda, episódios de infecção viral, principalmente por citomegalovírus, estão associadas a um aumento no número destas células. Dados experimentais demonstram que o infiltrado blástico, ou seja, o aparecimento de células imunoativadas no enxerto, precede a expressão de antígenos HLA classe II na rejeição aguda, modificada ou não por imunossuppressores, e que a imunossupressão retarda a expressão das moléculas HLA classe II, sem no entanto, retardar a infiltração blástica (9). Esses achados sugerem que o estímulo à expressão dos antígenos HLA-DR nas células do enxerto seja produzido por células do componente blástico do infiltrado. Essas células liberam fator(es) solúvel(eis) que, por sua vez, é(são) o(s) efetor(es) do aumento de expressão das moléculas classe II e moléculas de adesão. Essas estruturas representam “alvos” imunes ou aumentam a interação célula a célula do enxerto (66). Anticorpos monoclonais, dirigidos contra epítomos de estruturas parenquimatosas ou de células infiltrativas, têm sido utilizados em aspirados renais, assim como em fragmentos de biópsia renal, com os objetivos de aumentar a acurácia diagnóstica desses métodos, melhor caracterizar a resposta inflamatória intra-enxerto e de estudar a resposta do infiltrado às drogas imunossupressoras (40, 47, 48, 54). A expressão do receptor de interleucina 2 (IL-2R) nos linfócitos que infiltram o enxerto também tem sido estudada utilizando-se anticorpos monoclonais dirigidos a epítomos da cadeia alfa (p55) desse receptor. Aspirados renais de pacientes com rejeição celular aguda apresentam maior expressão linfocitária do IL-2R do que aspirados obtidos em pacientes sem rejeição (50). A expressão dos antígenos HLA classe II (DR) tem sido estudada nas células infiltrativas de enxertos renais. Nessa avaliação, os resultados quanto à utilidade do

método se dividem. Alguns autores referem que ele é útil para aumentar a acurácia do diagnóstico de rejeição aguda (12, 92); enquanto outros não concordam com essa utilidade (2, 126). A avaliação citológica da expressão de ICAM-1 em células parenquimatosas de transplantes renais foi recentemente descrita em dois trabalhos (17, 130). Os autores encontraram que a expressão de ICAM-1 é significativamente mais elevada em pacientes com rejeição aguda do que nos sem rejeição. Dessa maneira, a partir dos dados da literatura, sugere-se que o aumento da expressão destas moléculas, nas células parenquimatosas renais, durante os episódios de rejeição aguda, esteja razoavelmente estabelecido. A expressão de ICAM-1 é mais precoce, menos duradoura e apresenta maior resposta a drogas anti-rejeição, enquanto que a expressão dos antígenos HLA-DR apresenta início mais tardio e persiste por mais tempo, apesar da terapia anti-rejeição. No trabalho de Manfro e colaboradores a análise dos parâmetros diagnósticos produzidos pela avaliação da expressão dos antígenos HLA-DR e do ICAM-1, mostrou que, quando não associados aos dados de citologia aspirativa convencional, seu rendimento diagnóstico é pobre. Então, em relação à expressão nas células parenquimatosas de ICAM-1 e de antígenos HLA-DR, encontrou-se que, apesar de terem sua expressão significativamente aumentada nos episódios de rejeição aguda, a avaliação diagnóstica de sua expressão não melhora significativamente os parâmetros produzidos pelos métodos convencionais, exceto por aumentar a sensibilidade, o que pode ser útil em determinadas circunstâncias clínicas (66). Outros métodos de monitorização de rejeição como dosagem de neopterina (101), medidas de pressão intra-renal (98), fenotipagem de subpopulações linfocitárias (132) tem sido realizadas, mas sem a acurácia diagnóstica desejada.

Com base nisso, procura-se constantemente um método de diagnóstico que não seja invasivo e que tenha boa especificidade e sensibilidade ao diagnóstico de rejeição celular aguda. A possibilidade do uso da atividade sérica da ADA como método diagnóstico de rejeição celular aguda do enxerto renal é relatada no estudo de Frey e Orts (84). Neste estudo acompanhou-se 15 transplantados no período pós-operatório e coletou-se amostras séricas de ADA antes, durante e após a rejeição, encontrando valores de ADA mais elevados em todos os pacientes transplantados em relação ao grupo controle (indivíduos normais), mas sem aumento significativo entre eles, ou seja, entre o períodos pré, durante e após a rejeição. Devido a pequena amostra utilizada na pesquisa, os autores concluíram que mais estudos deveriam ser realizados. No presente estudo a mediana total da ADA de todos os pacientes dos períodos pré, rejeição e pós-rejeição evidenciou aumento significativo ($p=0,022$) entre a atividade sérica de ADA na rejeição em relação aos valores pré-rejeição. Observou-se que os episódios de rejeição aguda durante o acompanhamento dos pacientes, ocorreram em torno do sexto e sétimo dia do pós-operatório, sendo neste dia encontrado uma diferença significativa dos valores de ADA entre os pacientes com rejeição, em relação aqueles que não tiveram rejeição ($p=0,021$). Os valores de ADA, também foram estudados nos pacientes que apresentaram ou não rejeição nos períodos pré-rejeição, rejeição e pós-rejeição. Verificou-se que os pacientes que tiveram rejeição aguda apresentaram valores de ADA significativamente maiores no período de rejeição em relação ao período pré-rejeição ($50,95 \times 38,20$ $p=0,026$ MW). A comparação dos valores de ADA com o período pós-rejeição também mostra valores aumentados durante a rejeição com posterior redução, embora não atingindo significância estatística ($42,15 \times 50,95$ $p=0,084$ MW). Esses achados são

compatíveis com os observados por Yasmineh et al e Lum et al (64,134). Nesses estudos os autores compararam 10 pacientes controles normais, com 20 transplantados, subdivididos em três grupos. Os grupos 1 e 2 eram transplantados com mais de 1 ano de transplante, em uso de doses imunossupressoras estáveis ou diminuídas por leucopenia recente, mas sem evidências de rejeição, enquanto que o grupo 3 eram pacientes com menos de 1 ano de transplante, mas com rejeição celular aguda. Não encontraram diferença de valores de ADA entre grupo controle normal e valores totais de ADA dos pacientes transplantados, mas evidenciaram diferença significativa entre os grupos 1 e 2 em relação aos pacientes do grupo 3, que eram os que rejeitaram ($p < 0,002$), sugerindo que a ADA pode ser usada como método auxiliar na monitorização do enxerto renal. Os trabalhos de Yasmineh et al e Lum et al, que apresentam menor número de pacientes em relação ao presente estudo, sugerem fortemente uma associação entre elevação dos valores de ADA e o desenvolvimento de rejeição aguda. Tal associação torna-se bastante evidente no presente estudo, com maior número de pacientes e avaliação sequencial e prospectiva, que revela aumento significativo da ADA no dia em que mais frequentemente ocorreu rejeição e nos períodos de rejeição em comparação aos valores observados antes da rejeição.

4.3. ADA como Método Diagnóstico

Como um dos objetivos do presente estudo foi estabelecer um valor de ADA que pudesse ser adotado como referência para diagnosticar rejeição e, essa

abordagem não é descrita na literatura, foram utilizados então, pontos de corte próximo às medianas. Calculou-se a sensibilidade e especificidade da ADA como método diagnóstico de rejeição aguda nos diferentes pontos de corte. Para definir qual o ponto de corte mais adequado empregou-se a curva ROC. Nesta curva, os pontos são colocados em um gráfico Y (ordenada), onde se representa a porcentagem de verdadeiros positivos (sensibilidade) e X (abscissa), onde se representa porcentagem de falsos positivos (1 - especificidade). Os valores nos eixos deslocam-se de uma probabilidade de 0 a 1,0 (0 a 100 por cento). Esse tipo de abordagem de testes diagnósticos permite basicamente duas avaliações, ou seja, a da acurácia do teste, quanto maior a área sob a curva, maior a acurácia, o estabelecimento do melhor ponto de corte que é, em termos de balanço entre sensibilidade e especificidade, o ponto de curva que se encontra mais próximo do canto superior esquerdo. No estudo, usou-se, então os pontos de ADA > 35, >40, >45, >50 e maior que 30% dos valores da ADA em relação ao período pré-rejeição do transplante. Obteve-se uma associação estatisticamente significativa somente quando se utilizou os valores acima dos 30 % ao do período pré-rejeição ($p=0,035 X^2$), com uma sensibilidade de 55,5%, especificidade de 82,3%, VP+ de 76,9%, VP - de 63,6% e acurácia de 69% . Também confirmou-se que o melhor ponto de corte foi o aumento de 30% dos valores pré-rejeição, porque foi o que ficou mais próximo do canto superior esquerdo da curva ROC. Este é o primeiro estudo que avalia a acurácia de um ponto de corte dos valores de ADA como método diagnóstico de rejeição, e embora não haja na literatura dados sobre estes valores, os resultados obtidos no presente estudo (sensibilidade 55,5% e especificidade 82,3%) são próximos aos de outros métodos diagnósticos, como a punção aspirativa renal, sugerindo a utilização da ADA como

mais um método auxiliar da avaliação diagnóstica de rejeição aguda do transplante renal.

4.4. ADA, HCV e NTA

Há evidências de que a ADA desempenha importante papel na proliferação de linfócitos (51), encontrando-se elevada em doenças com alta atividade linfocitária como cirrose ativa e hepatites (51). Há alguns relatos de que em casos de doenças renais, como insuficiência renal crônica haveria aumento da atividade da ADA, sugerindo que nessa doença também ocorra elevação da atividade da ADA (30, 38). Com base nestes dados, apesar de não haver estudos semelhantes na literatura, procurou-se observar, neste estudo, se haveria nos pacientes transplantados influência da presença de NTA e hepatite C em relação à atividade da ADA e nos episódios de rejeição celular aguda.

4.4.1. Hepatite C

A prevalência de pacientes com anti-HCV positivos em diálise é muito maior que na população geral, sugerindo que o paciente em diálise tem um grande risco de adquirir infecção pelo HCV. Em estudos iniciais, a prevalência de anti-HCV em diálise variou de 8 a 36% na América do Norte, 1 a 54% na Europa, 17 a 51% na

Ásia, 39% na Venezuela e 14,6 a 54% no Brasil. Em trabalho realizado na UNIFESP entre 1987 e 1990, ou seja, antes do rastreamento sorológico para o HCV nos bancos de sangue, observou-se prevalência e incidência anuais respectivamente de 35,1% e 6,0% em hemodiálise e 33,9% e 2,1% em diálise peritoneal ambulatorial contínua. Em anos mais recentes é possível dizer que a incidência e a prevalência de infecção por HCV em diálise tem declinado, sendo isso atribuído à redução de infecção por HCV pós-transfusional. Porém, o declínio sustentado na incidência sugere que a implementação de medidas de controle de infecção previne a transmissão ambiental dentro da unidade de diálise (6). Após a introdução do Elisa I, o New England Organ Bank iniciou estudos para avaliar o risco de transmissão de HCV por órgãos de doadores cadáveres. Soros armazenados de 716 doadores cadáveres de órgãos foram testados para anti-HCV usando Elisa I no período de 1986 a 1990 e 13 (1,8%) eram anti-HCV positivo. De 29 receptores de órgãos de doadores anti-HCV positivos, 14 (48%) desenvolveram hepatite NANB. A prevalência de hepatite não-A não-B nesses pacientes foi de 7 a 8 vezes maior do que nos receptores de rins de outros doadores. No total, entre os receptores de órgãos de doadores anti-HCV positivos, 35% (0 a 55%) desenvolveram doença hepática, 50% (14 a 100%) tornaram-se anti-HCV positivos e após o transplante 74% (57 a 96%) PCR positivos para RNA do HCV. Essas observações demonstraram a transmissão de HCV por transplante de órgãos. A prevalência de anti-HCV positivo em receptores de transplante renal antes do transplante varia de 11 a 49% na literatura (86). Em estudo retrospectivo realizado em 70 pacientes transplantados renais entre 1976 e 1990 na UNIFESP a prevalência de anti-HCV por Elisa I foi de 40%. Manfro et al em 1995 encontraram prevalência idêntica (39,5%) em populações de 81 pacientes transplantados em Porto

Alegre (67). Mais recentemente, Santos e colaboradores em 1996 estudaram a prevalência de anti-HCV positivo por Elisa II em 500 de 774 pacientes que receberam transplante renal na UNIFESP entre 1976 e 1994, encontrando prevalência de 51,2% (99).

Assim como na doença hepática crônica pelo vírus da hepatite B, a imunossupressão após o transplante renal também exerce um efeito permissivo sobre a replicação do HCV. Através da utilização de técnicas de PCR quantitativo foi demonstrado aumento dos títulos do RNA do HCV após o transplante entre indivíduos previamente virêmicos. Além disso, a persistência de viremia é regra nesta população, o que constitui evidência de replicação viral contínua. Ruzany estudou biópsias seriadas de pacientes transplantados com hepatite B ou NANB. Após o transplante, na maioria dos pacientes houve manutenção de piora do quadro histológico, tanto para pacientes com hepatite B como para pacientes com hepatite NANB (60% de hepatite crônica ativa ou cirrose) (96). Ainda não foram publicados estudos conclusivos comparando a evolução histológica de pacientes com hepatite C transplantados, com pacientes controle mantidos em diálise. Vários autores investigaram o papel da infecção pelo HCV no desfecho após o transplante. Roth et al (1994), compararam 109 pacientes com teste RIBA 2 positivo com 200 pacientes com RIBA 2 negativo. Não houve diferenças nas sobrevidas (93). Ynares et al (1993), também não observaram diferenças entre 65 transplantados com Elisa I positivo e 191 com Elisa I negativo (135). Por outro lado Fritsche et al, em 1993, observaram sobrevida menor em 53 transplantados renais Elisa II positivos comparados a 256 com Elisa II negativo (52% versus 82% aos 8 anos), embora essa diferença tenha sido de significância limítrofe (31). Pereira e colaboradores (1995)

estudaram 103 pacientes transplantados entre 1986 e 1990. Do total, 23 pacientes eram Elisa II positivos e 80 Elisa II negativos. Os dois grupos eram comparáveis com relação a sexo, idade, número de transfusões e número de transplantes prévios. A sobrevida atuarial de 5 anos de pacientes anti-HCV positivos foi menor que a sobrevida de pacientes anti-HCV negativos. Por outro lado, a sobrevida do enxerto não difere entre os grupos (86). Knoll et al (1997) compararam os desfechos de pacientes com anti-HCV positivo que foram transplantados com os desfechos de pacientes anti-HCV positivos que foram encaminhados para transplante mas não foram transplantados. Ao todo, foram comparados 33 pacientes que foram transplantados com 25 que permaneceram em diálise. A data de início de seguimento correspondeu à data de encaminhamento para o transplante. Não houve diferença entre os grupos em relação à idade, sexo, tempo de tratamento dialítico, tempo total de seguimento, causa da insuficiência renal ou disfunção hepática ao início do seguimento. Os pacientes transplantados apresentaram sobrevida atuarial significativamente melhor do que os que não foram transplantados (57). Esses dados sugerem que o transplante renal não piora a sobrevida do paciente anti-HCV positivo. O grupo de estudos do New England Organ Bank também estudou o impacto da infecção pelo HCV e do transplante renal. Em estudo histórico, paciente na lista de espera ou encaminhados para transplante entre 1986 e 1990 foram incluídos. Pacientes com anti-HCV positivo apresentaram mortalidade 42% maior, enquanto que o transplante foi associado a risco de mortalidade 24 % menor (não-significativo). Além disso, o risco relativo de óbito dos transplantados (comparado aos que permaneceram em diálise) foi semelhante entre anti-HCV positivos e anti-HCV negativos em todas as faixas de tempo após o transplante. As curvas de

sobrevida global, ou seja, desde o início do tratamento dialítico, foram semelhantes entre pacientes com anti-HCV positivos e pacientes com anti-HCV negativos. Com isso, podemos concluir que a infecção pelo HCV tem impacto negativo na sobrevida de pacientes tratados com diálise ou transplante. Por outro lado, o transplante não parece ter impacto negativo na sobrevida de pacientes com hepatite C (86).

Sabe-se, que pelo menos em parte, o dano hepático do vírus da hepatite C é causado pela resposta de imunidade celular, e talvez, por isso a ADA aumente nos pacientes com hepatite C. Isso foi confirmado com os resultados do estudo que mostraram aumento dos valores de ADA nos pacientes com anti-HCV positivo (46,04 x 37,33, $p=0,037$, MW).

4.4.2. NTA

A Necrose Tubular Aguda (NTA) é causada por insulto isquêmico recebido antes da retirada, durante a preservação fria ou durante o procedimento cirúrgico do transplante. Pelo fato dos rins de doadores vivos serem resfriados imediatamente após a remoção e ter um, relativamente breve, intervalo isquêmico que varia entre 30 a 50 minutos até o implante do enxerto no receptor, a incidência de oligúria após o transplante é significativamente menor (<10%) do que em receptores de enxerto cadáver (25 a 50%) (1, 10, 91). Quando esses enxertos cadavéricos são usados, a idade do doador, o débito cardíaco, oligúria, uso de vasopressores antes à retirada do órgão são todos associados com aumento da incidência de NTA. (91). Pelo fato do tempo de isquemia quente (período entre o

clampeamento dos vasos renais e esfriamento do enxerto) maior que 40 minutos estar associado com aumento significativo da incidência de NTA, é recomendado que os rins não sejam utilizados para transplante se a isquemia quente for maior que 1 hora. Também rins de doadores cadáveres podem ser conservados até 36 horas, mas a prolongada isquemia fria pode ser associada com aumento significativo do risco de disfunção precoce do enxerto. Embora a anúria induzida por NTA ocorra com frequência imediatamente após a revascularização, ela pode também se desenvolver após poucas horas do início da diurese (disfunção tubular pode também levar a depleção de volume inapropriado) ou após um episódio de rejeição acelerada ou aguda dentro de poucas horas ou dias seguido ao transplante. (102). O diagnóstico de NTA só é feito após eliminar outras causas de anúria. A ecografia pode detectar aumento do tamanho do enxerto e padrão de perfusão consistente com disfunção do enxerto. O elevado índice de resistência ao fluxo diastólico (detectado por doppler) é um pobre indicador prognóstico, pois não é capaz de diferenciar NTA, rejeição e toxicidade por ciclosporina. Biópsia percutânea renal permanece o mais definitivo método diagnóstico portanto, é recomendado pela sua importância clínica no correto diagnóstico. A biópsia confirma mais acuradamente o diagnóstico de rejeição, avalia a probabilidade de resposta ao tratamento anti-rejeição e ajuda no diagnóstico de outras fontes de disfunção do enxerto. O impacto da NTA na sobrevida do enxerto é controverso. Muitos estudos tem uma correlação positiva entre função inicial do enxerto e sobrevida do enxerto (75). A NTA em conjunto com rejeição reduz significativamente na sobrevida do enxerto. Lim e Terasaki, em 1991, observaram sobrevida em 1 ano dos pacientes com boa função inicial do enxerto e sem episódios de rejeição de 88%, comparado com 51% dos com NTA e rejeição. A sobrevida em 6

anos de enxertos com NTA e rejeição foi de 22% comparados com 80% dos sem episódios de rejeição. Parece que NTA contribui para o desenvolvimento de rejeição (63). Há também relatos de que a NTA teria influência sobre a rejeição crônica do transplante renal (75). Alguns estudos indicam que a ausência de função renal parece aumentar a atividade sérica da ADA. O mecanismo exato de tal fato não está bem esclarecido. Confirmou-se neste estudo o aumento dos valores de ADA nos pacientes com NTA (69,59 x 39,55, $p=0,002$, MW).

4.4.3. ADA, Hepatite C , NTA e Rejeição

Os resultados do presente estudo confirmam outras observações já descritas na literatura de que há uma elevação da atividade da ADA sérica em pacientes com hepatite C ou com insuficiência renal (como acontece na NTA). Com o intuito de verificar se tais achados interferem com a observação de aumento da ADA em episódios de rejeição aguda, estudou-se um subgrupo de pacientes que eram portadores de anticorpos anti-HCV ou que tinham desenvolvido NTA pós-transplante. A análise dos valores de ADA nesses pacientes confirma um aumento significativo no período da rejeição, quando comparado ao período pré-rejeição (52,37 x 43,65, $p=0,045$, MW).

Assim, a presença de hepatite C ou de NTA não parece confundir os resultados de elevação da ADA na rejeição, sugerindo que a determinação da atividade sérica da ADA possa ser empregada como método diagnóstico de rejeição aguda nestas situações.

5. CONCLUSÕES

5.1. Existe uma associação entre os valores séricos elevados de ADA e rejeição celular aguda do enxerto renal.

5.2. Os valores séricos de ADA se mostraram úteis no diagnóstico de rejeição celular aguda do transplantado renal, sendo que o melhor ponto de corte foi o aumento de 30% dos valores pré-rejeição, com uma sensibilidade de 55% e especificidade de 82,3%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, C.B.; SICARD, GA; ETHEREDGE, EE: Delayed primary renal function and cadaver renal allograft results. **Surg Gynecol Obstet** **149**:697-702, 1979.
2. ARNDT, R.; WEISS, M.; HAMMERER, P.; HULAND, H.; KRUPPA, A.; KRAMER-HANSEN, H.: Expression of immunoregulatory molecules on tubular cells and lymphocytes in fine-needle aspiration biopsy: early diagnostic marker for renal allograft rejection. **Transplant Proc** **20**:614-6, 1988.
3. BACH, J.F.; SACHS, D.H. Current Concepts: Immunology. Transplantation Immunology. **New Engl J Med** **317**: 489-492, 1987.
4. BAGANHA, M.F.; PÊGO, A.; LIMA, M.A.; GASPAR, E.V.; CORDEIRO, A.R.: Serum and pleural adenosine deaminase. Correlation with lymphocytic populations. **Chest** **97**: 605-610, 1990.
5. BANALES, J.L.; PINEDA, P.R.; FITZGERALD, M.; RUBIO, H.; SELMAN, M.; SALAZAR-LEZAMA, M.: Adenosine deaminase in the diagnosis of tuberculous pleural effusions. A report of 218 patients and review of the literature. **Chest** **99**: 355-357, 1991.
6. BARROS, E.; MANFRO, R.C.; THOMÉ, F.S.; GONÇALVES, L.F.S.: **Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento. Hepatite C em Diálise e Transplante Renal**. 2ed. Artes Médicas Sul Ltda, 335-343. Porto Alegre, 1999.
7. BARTON, R.; MARTINIUK, F.; HIRSCHHORN, R.; GOLDSCHNEIDER, I.: The distribution of adenosine deaminase among lymphocyte populations in the rat. **The Journal of Immunology** **122**: 216-220, 1979.
8. BASSADONA, G.P.; MATAS, A.J.; GILLINGHAN, K.J.; PAYNE, W.D.; DUNN, D.L.; SUTHERLAND, D.E.R.; GORES, P.F.; GRUESSNER, R.W.G.; NAJARIAN, J.S.: Early versus late acute renal allograft rejection: impact on chronic rejection. **Transplantation** **55**:993-995, 1993.
9. BELITSKY, P.; MILLER, S.M.; GUPTA, R.; LEE, S.; GHOSE, T.: Induction of MHC class II expression in recipient tissue caused by allograft rejection. **Transplantation** **49**:472-476, 1990.
10. BELLI, L.S.; DE CARLIS, L.; DEL FAVERO, E.: The role of donor and recipient factors in initial renal graft nonfunction. **Transplant Proc** **20**: 861, 1988.

11. BERKE, G.: The cytolytic T lymphocyte and its mode of action. **Immunol Lett** **20**: 169-178, 1989.
12. BISHOP, G.A.; WAUGH, J.; HORVATH, J.S.; JOHNSON, R.J.; HALL, B.M.; PHILLIPS, P.; GUGGIN, G.G.; ROSS SHEIL, A.G.: Diagnosis of renal allograft rejection by analysis of fine-needle aspiration biopsy specimens with immunostains and simple cytology. **Lancet II**: 647-50, 1986.
13. BISHOP, G.A.; HALL, B.M.: Expression of leucocyte and lymphocyte adhesion molecules in the normal and transplanted kidney. **Kidney Int** **36**: 1078-1085, 1989.
14. BISHOP, G.A.; HALL, B.M.; SURANYI, M.G.; TILLER, D.G.; HORVATH, J.S.; DUGGIN, G.G.: Expression of HLA antigens on renal tubular cells in culture. Evidence that mixed lymphocyte culture supernatants and gamma interferon increase both class I and class II HLA antigens. **Transplantation** **42**: 671-679, 1986.
15. BOWMAN III, J.S.; ANGSTADT, J.D.; WAYMACK, J.P.; JAFFERS, G.J.: A comparison of triple-therapy with double-therapy immunosuppression in cadaveric renal transplantation. **Transplantation** **53**: 556-559, 1992.
16. CANADIAN MULTICENTRE TRANSPLANT STUDY GROUP. A randomized clinical trial of cyclosporine in cadaveric renal transplantation: analysis at three years. **New Engl J Med** **314**: 1219-1225, 1986.
17. CHAN, R.D.; GREENSTEIN, S.M.; TELLIS, V.; COREY, H.E.: Renal tubular cells express ICAM-1 during allograft rejection. **Tranplant Proc** **25**:915-6, 1993.
18. COLVIN, R.B.: The Renal allograft biopsy. **Kidney International** **50**:1069-1082, 1996.
19. COLVIN, R.B.; FULLER, T.C.; MACKEEN, L.; KUNG, P.C.; IP, S.H.; COSIMI, A.B.: Plasma interleukin 2 receptor levels in renal allograft recipients. **Clin Immunol Immunopathol** **43**: 273-276, 1987.
20. DADDONA, P.E.; KELLEY, W.N.: Human adenosine deaminase. Purification and subunit structure. **The Journal of Biological Chemistry** **252**: 110-115, 1977.
21. DALLMAN, M.J.; MORRIS, P.J.: The immunology of rejection. In: MORRIS, P.J. (ed) **Kidney Transplantation**. Philadelphia, W.B. saunders, 1994, p 15-36.

22. DELMONICO, F.L.; CONTI, D.; AUCHINCLOSS Jr., H.; RUSSEL, P.S.; TOLKOFF-RUBIN, N.; FANG, L.T.; COSIMI, B.A.: Long-term, low-dose cyclosporine treatment of renal allograft recipients. **Transplantation** **49**:899-904, 1990.
23. DENNIS, M.J.S.; FOSTER, M.C.; RYAN, J.J.; BURDEN, R.P.; MORGAN, A.G.; BLAMEY, R.W.: The increasing importance of chronic rejection as a cause of renal allograft failure. **Transplant Int** **2**: 214-217, 1989.
24. DINARELLO, C.A.; MIER, J.W.: Current Concepts - Lymphocytes. **New Engl J Med** **317**: 940-945, 1987.
25. EDWARDS, Y.H.; HOPKINSON, D.A.; HARRIS, H.: Adenosine deaminase isozymes in human tissues. **Ann Hum Genet** **35**: 207-219, 1971.
26. EIJSVOOGEL, V.P.; BUBOIS, R.; MELIEF, C.J.M.: Lymphocyte activation and destruction in vitro in relation to MLC and HLA. **Transplant Proc** **5**: 415-420, 1973.
27. ENGLEMAN, E.G.; BENIKE, C.J.; GRUMET, F.C.; EVANS, R.L.: Activation of human T lymphocyte subsets: helper and suppressor/cytotoxic T cells recognize and respond to distinct histocompatibility antigens. **J Immunol** **127**: 2124-2129, 1981.
28. FIORENTINO, D.F.; BOND, M.W.; MOSSMANN, T.R.: Two types of mouse T helper cell: IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J Exp Med** **170**: 2081-2095, 1989.
29. FORBES, R.D.C.; DARDEN, A.G.; GOMERSALI, M.; GUTTMAN, R.D.: Patterns of donor major histocompatibility complex antigen expression in rat heart grafts in a model of chronic vascular rejection. **Transplant Proc** **21**: 447-448, 1989.
30. FRAZIER, R.B.; MA P.F.: A study of adenosine deaminases in human sera. **Adv Exper Med Biol** **195A**: 267-270, 1986.
31. FRITSCH, C.; BRANDES, J.C.: Hepatitis C is a poor prognostic indicator in black kidney transplant recipients. **Transplantation** **55**:1283-87, 1993.
32. GAJEWSKI, T.F.; JOYCE, J.; FITCH, F.W.: Antiproliferative effect of INF-g in immune regulation. III. Differential selection of Th1 and Th2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IL-2 and recombinant IFN-g. **J Immunol** **143**: 15-22, 1989.
33. GAKIS, C.; CALIA, G.; NAITANA, A.G.; PIRINO, D.; SERRU, G.: Serum adenosine deaminase activity in HIV positive subjects. A hypothesis on the

- significance of ADA2. **Panminerva Medica** **31**: 107-113, 1989.
34. GAKIS,C.; CALIA, G.M.; NAITANA, A.G.; ORTU, A.R.; CONTU, A.: Serum and Pleural adenosine deaminase activity. Correct interpretation of the findings. **Chest** **99**:1555-1556, 1991.
 35. GAROVOY, M.R.; FRANCO, V.; ZSCHAECK, D.; CARPENTER, C.B.; STROM, T.B.; MERRILL, T.B.: Direct lymphocyte mediated cytotoxicity. An assay of presensitization. **Lancet** **I**: 573-576, 1973.
 36. GAULT, M.H.; MUEHRCKE, R.C.: Renal Biopsy: Current views and controversies. **Nephron** **34**: 1-34, 1983.
 37. GIBLETT, E.R.; ANDERSON, J.E.; COHEN, F.; POLLARA, B.; MEUWISSEN, H.J.: Adenosine-deaminase Deficiency in two Patientes whit Severely Impaired Cellular Immunity. **Lancet** **18**:1067-1069, 1972.
 38. GIUSTI, G.; GALANTI, B.: Adenosine deaminase. In:BERGMAYER, H.U., 3ed. **Methods of enzymatic analysis**. New York. Academic Press: 315-323, 1983.
 39. GOLDBERG, D.M.: Serum Adenosine Deaminase in the Differential Diagnosis of Jaundice. **British Medical Journal** **1**:353-355, 1965.
 40. GONÇALVES, L.F.S.; MANFRO, R.C.; RAUBER, L.; EDELWEISS, M.I.; PROMPT, C.A.: Evaluation of fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis of acute renal transplant dysfunction. **Transplant Proc** **24**:3081-2, 1992.
 41. GONÇALVES, L.F.S.: Efeito do Anticorpo Monoclonal Anti-CD3 no Infiltrado Inflamatório Intra-Enxerto em Transplantes Renais. **Tese de Conclusão de Doutorado em Clínica Médica**. UFRGS, Porto Alegre, 1994.
 42. HALL, B.M.; DORCH, S.E.; ROSER, B.J.: The complex basis of allograft rejection in vivo: II. the nature of memory cell mediating second-set heart graft rejection. **J Exp Med** **148**: 890-902, 1978.
 43. HALL, B.M.; ROSER, B.J.; DORCH, S.E.: Magnitude of memory to the major histocompatibility complex. **Nature** **268**: 532-534, 1977.
 44. HALL, B.M.; TILLER, D.J.; WARDIE, I; MAHONY, M.B.B.S.; MATHEW, T.; THATCHER, G.; MIACH, P.; THOMSON, N.; ROSS SHEIL, A.G.: Comparison of three immunosuppressive regimens in cadaver renal transplantation; long-term cyclosporine, short-term cyclosporine followed by azathioprine and prednisolone, and azathioprine and prednisolone without cyclosporine. **New Engl J Med** **318**: 1499-1507, 1988.

45. HALL, B.M.: Cells mediating allograft rejection. **Transplantation** **51**: 1141-1151, 1991.
46. HALLORAN, P.F.; WADGYMAR, A.; AUTENREID, P.: The regulation of expression of major histocompatibility antigens (Overview). **Transplantation** **41**: 413-420, 1986.
47. HANCOCK, W.W.; THOMSON, N.M.; ATKINS, A.F.: Composition of interstitial cellular infiltrate identified by monoclonal antibodies in renal biopsies of rejecting human renal allografts. **Transplantation** **35**:458-63, 1983.
48. HANSEN, B.L.; FOGED, N.; NIELSEN, E.; ELBIRK, A.; ROHR, N.; SVENDSEN, V.; BIRKELAND, S.A.: Fine-needle aspiration cytology during treatment with Orthoclone monoclonal antibody OKT3 for acute cellular rejection after renal transplantation. **Transplant Proc** **20**:626-8, 1988.
49. HELDERMAN, J.H.; HERNANDEZ, J.; SAGALOWSKY, A.; DAWIDSON, I.; GLENNIE, J.; WOMBLE, D.; TOTO, R.; BRINKER, K.; HULL, A.R.: Confirmation of the fine needle aspiration biopsy of the renal allograft. **Kidney Int** **34**:376-81, 1988.
50. HELDERMAN, J.H.; HERNANDEZ, J.; GLENNIE, J.; WOMBLE, D.: Analysis of the IL-2 receptor by monoclonal antibody of fine needle-aspiration specimens. **Transplant Proc** **21**:3574-3575, 1989.
51. HOVI, T.; SMYTH, J.F.; ALLISON, A.C.; WILLIAMS, S.C.: Role of adenosine deaminase in lymphocyte proliferation. **Clin Exp Immunol** **23**: 395-403, 1976.
52. ILANO, A.L.; MCCONNELL, M.V.; GURLEY, K.E.; SPINELLI, A.; PEARCE, N.W.; HALL, B.M.: Cellular basis of allograft rejection in vivo. V. Examination of mechanisms responsible for the differing efficacy of monoclonal antibody to CD4⁺ T cells subsets in low and high- responder rat strains. **J Immunol** **143**: 2828-2836, 1989.
53. ISONIEMI, H.M.; AHONEN, J.; TIKKANEN, M.J.; von WILLEBRAND, E.; KROGERUS, L.; EKLUND, B.H.; HÖCKERSTEDT, V.A.; SALMELA, K.E.; HÄYRI, P.: Long-term consequences of different immunosuppressive regimes for renal allografts. **Transplantation** **55**: 494-499, 1993.
54. JORGENSEN, K.A.; STRATE, M.; SVENDSEN, V.; ROHR, N.; ELBIRK, A.; BIRKELAND, S.A.: Fine-needle aspiration biopsy during and after OKT3. **Transplant Proc** **21**:3594-5, 1989.
55. KAHAN, B.D.: Cyclosporine. **New Engl J Med** **321**: 1725-1738, 1989.

56. KLOCCARS, M.; KLEEMOLA, M.; LEINONEN, M.; KOSKELA, M.: Serum adenosine deaminase in viral and bacterial pneumonia. **Chest** **99**: 623-626, 1991.
57. KNOLL, G.A.: The impact of renal transplantation on survival in hepatitis C-positive end-stage renal disease patients. **Am J Kidney Dis** **29**:608-14, 1997.
58. KRAKAUER, H.; GRAUMAN, J.S.; MCMULLAN, M.R.; CREEDE, C.C.: The recent U.S. experience of end-stage renal disease by dialysis and transplantation. **New Engl J Med** **308**: 1558-1563, 1983.
59. KRENSKY, A.M.; WEISS, A.; CRABTREE, G.; DAVIS, M.M.; PARHAM, P.: T-lymphocyte-antigen interaction in transplant rejection. **New Engl J Med** **322**: 510-517, 1990.
60. LAND, W.: Cyclosporine in cadaveric renal transplantation: Five-year follow-up results of the european multicentre trial. **Transplant Proc** **20**: 73-7, 1988.
61. LEE, H.M.: Surgical Techniques of Renal Transplantation. In: MORRIS, P.J. (ed); **Kidney Transplantation- Principles and Practice**. 4rd. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1994. p.215-234.
62. LEICHTMAN, A.B.; STROM, T.B.: Therapeutic approach to renal transplantation: Triple therapy and beyond. **Transplant Proc** **20**: 1-6, 1988.
63. LIM, E.C.; TERASAKI, P.I.: Early graft function. **Clin Transplant**:401, 1991.
64. LUM, C.T.; SUTHERLAND, D.E.R.; YASMINEH, W.G.; NAJARIAN, J.S.: Peripheral blood mononuclear cell adenosine deaminase activity in renal allograft recipients. **Journal of Surgical Research** **24**: 388-395, 1978.
65. LUM, C.T.; SUTHERLAND, E.R.; YASMINEH, W.G.; FRYD, D.S.; HOWARD, R.J.; NAJARIAN, J.S.: Adenosine deaminase activity in cytomegalovirus-related graft and patient loss. **Transplantation Proceedings** **11**:83-88, 1979.
66. MANFRO, R.C.: Punção Aspirativa no Diagnóstico da Rejeição Aguda em Transplantes Renais: Reprodutibilidade e Expressão de HLA-DR e ICAM-1. **Tese de Conclusão de Doutorado em Nefrologia**. Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1994.
67. MANFRO, R.C.; KAROHL, C.; GONÇALVES, L.F.S.; SENGHER, M.B.; THOMÉ, F.S.; PROMPT, C.A.: Liver function tests in hepatitis C virus infected kidney transplant recipients. **Transplant Proc** **27**: 1821-22, 1995.
68. MANFRO, R.C.; GONÇALVES, L.F.S.; MOURA, L.A.R.: Monitorização

Sequencial do Transplante Renal com Citologia Aspirativa. **Revista da Associação Médica Brasileira 44(2):87-93, 1998.**

69. MANFRO, R.C.; POHANKA, E.; TOMLANOVICH, S.J.; BENET, L.Z.; GAROVOY, M.R.: Determination of soluble IL-2 receptors in kidney graft recipients - A 6 month follow-up. **Transplant Proc 22:** 1361-1362, 1990.
70. MARTINEZ-VAZQUEZ, J.M.; RIBERA, E.; OCANA, I.; SEGURA, R.M.; SERRAT, R.; SAGRISTA, J.: Adenosine deaminase activity in tuberculous pericarditis. **Thorax 41:** 888-889, 1986.
71. MATAS, A.J.; TELLIS, V.A.; SABLAY, L.; QUINN, T.; SOBERMAN, R.; VEITH, F.H.: The value of needle renal allograft biopsy. III. A prospective study. **Surgery 98:** 922-925, 1985.
72. MCCONNELL, M.; HALL, B.M.: Comparison of CD4 and CD8 cell reactivity in high and low responder combinations in the rat. **Transplant Proc 21:** 3294-3295, 1989.
73. MONTEAGUDO, M.; MUNDET, X.; ARDERIU, M.A.: Elevated adenosine deaminase in neoplastic pleural fluid. **Chest 90:** 466-467, 1986.
74. MOORE, K.W.; VIEIRA, P.; FIORENTINO, D.F.; TROUNSTINE, M.L.; KHAN, T.A.; MOSMANN, T.R.: Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (II-10) and the Epstein-Barr virus gene BCRF1. **Science 248:** 1230-1234, 1990.
75. MORRIS, P.J.: **Acute Tubular Necrosis. Kidney Transplantation- Principles and Practice**, 4rd ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1994.
76. MOSSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.: Two types of murine helper T clone: I. definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol 136:** 2348-2357, 1986.
77. MUELLER, C.; GERSHENFELD, H.K.; LOBE, C.G.; OKADA, C.Y.; BLEACKLEY, R.C.; WEISSMAN, I.L.: A high proportion of T lymphocytes that infiltrate H-2 incompatible heart allografts in vivo express genes encoding cytotoxic cell-specific serine proteases, but do not express the MEL-14-defined lymph node homing receptor. **J Exp Med 167:** 1124-1136, 1988.
78. MYERS, B.D.; NEWTON, L.; BOSHKOS, C.; MACOVIACK, J.A.; FRIST, W.H.; DERBY, G.C. PERLROTH, M.G.; SIBLEY, R.K.: Chronic injury of human renal microvessels with low-dose cyclosporine therapy. **Transplantation 46:** 694-703, 1988.

79. OCANÃ, I.; MARTINEZ-VAZQUEZ, J.M.; SEGURA, R.M.; SEVILLA, T.F.; CAPDEVILA, J.A.: Adenosine deaminase in pleural fluids. Test for diagnosis of tuberculous pleural effusion. **Chest** **84**: 51-53, 1983.
80. OCANÃ, I.; MARTINEZ-VAZQUEZ, J.M.; RIBERA, E.; SEGURA, R.M.; PASCUAL, C.: Adenosine Deaminase Activity in the Diagnosis of Lymphocytic Pleural effusions of Tuberculous, Neoplastic and Lymphomatous Origin. **Tubercle** **67**:141-145, 1986.
81. OLIVEIRA, H.G.:Auxílio Diagnóstico da Adenosina Deaminase (ADA) no derrame pleural. **Tese de Conclusão de Mestrado do Curso de Pneumologia**. UFRGS, Porto Alegre, 1989
82. OLIVEIRA, H.G.; ROSSATTO, E.R.; PROLLA, J.C.: Pleural fluid adenosine deaminase and lymphocyte proportion: clinical usefulness in the diagnosis of tuberculosis. **Cytopathology** **5**: 27-32, 1994.
83. OPELZ, G.: Correlation of HLA matching with kidney graft survival in patients with and without cyclosporine treatment. **Transplantation** **40**: 240-243, 1985.
84. ORTS, J.; FREY, E.: Adenosine deaminase activity in serum of kidney-transplant recipients during the early postoperative period. **Clin Chem** **31**: 1414-1415, 1985.
85. ORTS-COSTA, J.; JUAN-PEREIRA, L.; FUENTES-ARDERIU, J.: Serum adenosine deaminase reference interval. **Ann Biol Clin** **44**: 63, 1986.
86. PEREIRA, B.J.G.; SCHMID, C.H.; LEVEY, A.S.: The New England Organ Bank Hepatitis C Study Group. A controlled study of hepatitis C transmission by organ transplantation. **Lancet** **345**:484-87, 1995.
87. PESTANA, J.O.M.; RAMOS, O.L.; AJZEN, H.:Guia clínico para o transplante renal. **J Bras Neprol** **14**:66-86, 1992.
88. PETTERSSON, T.; OJALA, K.; WEBER, T.H.: Adenosine deaminase in the diagnosis of pleural effusions. **Acta Med Scand** **215**: 299-304, 1984.
89. PIRAS, M.A; GAKIS, C.:Cerebrospinal Fluid Adenosine Deaminase Activity in Tuberculous meningitis. **Enzyme** **14**:311-317, 1972/73.
90. PIRAS, M.A.; GAKIS, C.; BUDRONI, M.; ANDREONI, G.: Adenosine Deaminase activity in Pleural Effusions: an aid to differencial diagnosis. **British Medical Journal** **23-30**:1751-1752, 1978.
91. PLOEG, R.J.; van BOCKEL, J.H.; LANGENDIJK, P.T.: Effect of preservation

solution on results of cadaveric kidney transplantation. The European Multicentre Study Group. **Lancet** **340**:129, 1992.

92. RIAL, M.; CASADEI, D.; ZARAZAGA, N.C.; VIVAS, N.; GOLDEBERG, J.:HLA-DR and interleucine 2 (CD 25) receptor in infiltrating cells of grafted kidneys. **Sixth International Transplant Cytologic Workshop**. Oxford, 1991.
93. ROTH, D.K.; ZUCKER, K.; CIROCCO, R.: The impact of hepatitis C virus infection on renal allograft recipients. **Kidney Int** **45**: 238-44, 1994.
94. RUSS, G.R.: Immunosuppression in transplantation. **Med J Aust** **157**:198-203, 1992.
95. RUSSEL, J.D.; BEECROFT, M.L.; LUDWIN, D.; CHURCHILL, D.N.: The quality of life in renal transplantation. A prospective study. **Transplantation** **54**:656-660, 1992.
96. RUZANY, F.: Hepatopatias em pacientes submetidos à hemodiálise e ao transplante renal. **Tese de doutorado**. Escola Paulista de Medicina, 1991.
97. SAITOVITCH, D.; PESTANA, J.O.M.; PACHECO E SILVA, A.F.; NEVES, F.A.R.; MOURA, L.A.R.; AJZEN, H.: Biópsia percutânea do rim transplantado: Indicações, complicações, e análise prospectiva de sua influência sobre a evolução do enxerto e do paciente. **J Bras Nefrol** **13**: 12-18, 1991.
98. SALAMAN, J.R.; GRIFFIN, P.J.A: Fine-needle intrarenal manometry: a new test for rejection in cyclosporin-treated recipients of kidney transplants. **Lancet II**: 709-711, 1983.
99. SANTOS, R.F.:Estudo da prevalência e do impacto dos vírus hepatites B e C em transplantados renais. **Tese de doutorado**. Escola Paulista de Medicina, 1998.
100. SAYEGH, M.H.; CARPENTER, C.B.:In: BURTON, R. **UpToDate Nephrology. Acute Renal. Allograft Rejection**:1-4, 1997.
101. SCHAFER, A.J.; DANIEL, V.; DREIKORN, K.; OPELZ, G.: Assesment of plasma neopterin in clinical kidney transplantation. **Transplantation** **41**: 454-459, 1986.
102. SCHMIDT, P.; PINGGERA, W.F.; ZAZGORNIK, J.: Reversible acute tubular necrosis following severe acute renal rejection. **Int Urol Nephrol** **11**:61, 1979.
103. SCORNIK, J.C.; BRUNSON, M.E.; HOWARD, R.J.; PFAFF, W.W.: Alloimmunization, memory, and the interpretation on crossmatch for renal

- transplantation. **Transplantation** **54**: 389-394, 1992.
104. SEGURA, R.M.; PASCUAL, C.; OCANA, I.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, J.M., RIBEIRA, E.; RUIZ, I.; PELEGRÍ, M.D.: Adenosine deaminase in body fluids: a useful diagnostic tool in tuberculosis. **Clinical Biochemistry** **22**: 141-148, 1989.
105. SHORE, A.; DOSCH, H.M.; GELFAND, E.W.: Role of adenosine deaminase in the early stages of precursor T cell maturation. **Clin Exp Immunol** **44**: 152-155, 1981.
106. SHOSKES, D.A.; PARFREY, N.A.; HALLORAN, P.F.: Increased major histocompatibility complex antigen expression in unilateral ischemic acute tubular necrosis in the mouse. **Transplantation** **49**: 201-207, 1990.
107. SILVA JÚNIOR, C.T.; PAULA, A.; PAES DE CARVALHO, R.; FARIA, M.H.: Adenosina Deaminase nos Derrames Pleurais- Estudo pelo Método de Martineck. **Jornal de Pneumologia** **14(1)**:115, 1988.
108. SIMMONDS, H.A.; PANAYI, G.S.; CORRIGAL, V.: A Role for Purine Metabolism in the Immune Response: Adenosine-deaminase Activity and Deoxyadenosine catabolism. **Lancet** **14**:60-63, 1978.
109. SMITH, W.J.: Monitoring the components of the immune system. In: BURDICK, J.F; RACUSEN, L.C.; SOLEZ, K.; AND WILLIAMS, G.M. (eds). **Kidney Transplant Rejection**. 2nd. Marcel Dekker, New York, 1992. p 437-457.
110. SPRINGER, T.A.: Adhesion receptors of the immune system. **Nature** **346**: 425-434, 1990.
111. STRANKINGA, W.F.M.; NAUTA, J.J.P.; STRAUB, J.P.; STAM, J.: Adenosine Deaminase Activity in Tuberculous Pleural Effusions: A Diagnostic Test. **Tubercle** **68**:137-140, 1987.
112. STROM, T.B.; TILNEY, N.L.; PARADYSZ, J.M.; BANCEWICZ, J.; CARPENTER, C.B.: Cellular components of allograft rejection: identity, specificity and cytotoxic function of cells infiltrating acutely rejecting allografts. **J Immunol** **118**: 2020-2026, 1977.
113. STROM, T.B.; KELLEY, V.E.: Toward more selective therapies to block undesired immune responses. **Kidney Int** **35**: 1026-1033, 1990.
114. SUTHANTHIRAN, M. Acute rejection of renal allografts: Mechanistic insights

- and therapeutic options. **Kidney Int** **51**:1289-1304, 1997.
115. TAYLOR, A.: Serum adenosine deaminase activity is increased in sarcoidosis. **Clinical Chemistry** **30**: 499-500, 1984.
 116. TILNEY, N.L.; STROM, T.B.; VINEYARD, J.C.; MERRIL, J.P.: Factors contributing to the declining mortality rate in Renal Transplantation. **New Engl J Med** **299**: 1321-1325, 1978.
 117. TILNEY, N.L.; MILFORD, C.B.; CARPENTER, J.M. et ali.: Long-term results of cyclosporine treatment in renal transplantation. **Transplant Proc** **18- 2** (Suppl 1):179-185, 1986.
 118. TILNEY, N.L.; KUPIEC-WEGLINSKI, J.W.: The biology of acute transplant rejection. **Ann Surg** **214**: 99-106, 1991.
 119. TILNEY, N.L.; WHITLEY, W.D.; DIAMOND, J.W.; KUPIEC-WEGLINSKI, J.W.; ADAMS, D.H.: Chronic rejection - an undefined conundrum. **Transplantation** **52**: 389-398, 1991.
 120. TING, A.: What crossmatches are required in organ transplantation. **Transplant Proc** **21**: 613-614, 1989.
 121. TUNG, R.; SILBER, R.; QUAGLIATA, F.; CONKLYN, M.; GOTTESMAN, J.; HIRSCHHORN, R.: Adenosine deaminase activity in chronic lymphocytic leukemia. **J Clin Invest** **57**: 756-761, 1976.
 122. UNGERER, J.P.J.; GROBLER, S.M.: Molecular forms of adenosine deaminase in pleural effusions. **Enzyme** **40**: 7-18, 1988.
 123. UNGERER, J.P.J.; OOSTHUIZEN, H.M.; RETIEF, J.H.; BISSBORT, S.H.: Significance of adenosine deaminase activity and its isoenzymes in tuberculous effusions. **Chest** **106**: 33-37, 1994.
 124. UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM. Survival probabilities and causes of death. **Am J Kidney Dis** **18** (S2): 49-60, 1991.
 125. VAN DER WEYDEN, M.B.; KELLEY, W.N.: Human adenosine deaminase. The **J Biol Chem** **251**: 5448-5456, 1976.
 126. VAN OERS, M.H.J.; SURACHNO, S.; WILMINK, J.M.: Infiltrate analysis by monoclonal antibodies does not contribute to the usefulness of fine needle aspiration biopsy. **Transplant Proc** **19**: 1646-9, 1987.
 127. VICENTI, F.; AMEND, W.; FEDUSKA, N.J.; DUCA, R.M.; SALVATIERRA

- Jr, O.: Improved outcome following renal transplantation with reduction in the immunosuppression therapy for rejection episodes. **Am J Med** **69**: 107-112, 1980.
128. VOIGT, M.D.; TREY, C.; LOMBARD, C.; KALVARIA, I.; BERMAN, P.; KIRSCH, R.E.: Diagnostic value of ascites adenosine deaminase in tuberculous peritonitis. **Lancet**: 751-753, 1989.
129. VOLMER, W.M.; WAHL, P.W.; BLAGG, C.R.: Survival with dialysis and transplantation in patients with end-stage renal disease. **New Engl J Med** **308**: 1553-1558, 1983.
130. VON WILLEBRAND, E.; HAYRY, P.: Demonstration of cyclosporine in renal transplant by fine needle aspiration biopsy. **Transplant Proc** **15**:500-2, 1983.
131. WILCZEK, H.E.: Percutaneous needle biopsy of renal allograft: A clinical safety evaluation of 1129 biopsies. **Transplantation** **50**: 790-797, 1990.
132. WILLIAMS, J.M.; LOERTSCHER, T.; COTNER, M.; REDDISH, M.; SHAPIRO, H.M.; CARPENTER, C.B.; STROMINGER, J.L.; STROM, T.B.: Dual parameter flow cytometric analysis of DNA content, activation antigen expression, and T cell subset proliferation in the human mixed lymphocyte reaction. **J Immunol** **132**: 2330-2337, 1984.
133. YAMASHITA, Y.; BULLINGTON, R.; CLEMENT, L.T.: Equivalent helper functions of human "naive" and "memory"CD4+ T cells for the generation of alloreactive cytotoxic T lymphocytes. **J Clin Immunol** **10**: 237-246, 1990.
134. YASMINEH, W.G.; RUSSELL, K.B.; LUM, C.T.; ABBASNEEZHAD, M.: Adenosine deaminase activity in lymphocytes of normal persons, leukemic patients, and kidney-transplant recipients. **Clin Chem** **23**: 2024-2029, 1977.
135. YNARES, C.: Impact of pretransplant hepatitis C antibody status upon long-term patient and renal allograft survival- a 5 and 10-year follow-up. **Transplant Proc** **25**:1466-68, 1993.