

ARTIGOS ORIGINAIS

- Vigilância clínico-laboratorial da infecção pelo herpesvírus humano 6 (HHV-6) e herpesvírus humano 7 (HHV-7) e da co-infecção com citomegalovírus humano (HCMV) após o transplante hepático.
- Bone marrow mesenchymal stem cells protect against folic acid-induced acute kidney injury

ARTIGOS DE REVISÃO

- Métodos moleculares no diagnóstico não invasivo da rejeição aguda dos transplantes renais.
- Fatores de interferência no processo de doação de órgãos e tecidos: revisão da literatura
- Segurança no uso de probióticos em pacientes imunocomprometidos

Apoio:



JBT – Jornal Brasileiro de Transplantes

Jornal Oficial da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos – ABTO
Avenida Paulista, 2001 – 17º andar – cj. 1704/1707 – CEP 01311-300 – São Paulo – SP – Brasil
Fone/Fax: (11) 3283-1753 / 3262-3353 / 3289-3169 – E-mail: abto@abto.org.br – www.abto.org.br

Periódicidade: trimestral

JBT – J Bras Transpl. São Paulo. V.15, n.2, p.1651-1690, abr/jun 2012

Editor Chefe

Mário Abbud Filho – SP

Editores Assistentes

Ilka de Fátima Ferreira Boim – SP
Nicolas Panajatopoulos – SP

Editores Adjuntos

Ben-Hur Ferraz Neto
Henry de Holanda Campos
José Osmar Medina Pestana
Maria Cristina Ribeiro de Castro
Valter Duro Garcia
Walter Antonio Pereira

Conselho Editorial Nacional

Adriano Miziara Gonzalez – SP
Alexandre Bakonyi Neto – SP
André Ibrahim David – SP
Bartira de Aguiar Roza – SP
Cláudia Maria Costa de Oliveira – CE
David Saitovitch – RS
Elcio Hideo Sato – SP
Érika Bevilaqua Rangel – SP
Euler Pace Lasmar – MG
Huda Noujaim – SP
Irene Noronha – SP

João Eduardo Nicoluzzi – PR
Jorge Milton Neumann – RS
Karina Dal Sasso Mendes – SP
Marcelo Moura Linhares – SP
Marilda Mazzali – SP
Niels Olsen Saraiva Camara – SP
Paulo Celso Bosco Massarollo – SP
Paulo Sérgio da Silva Santos – SP
Rafael Fábio Maciel – PE
Renato Ferreira da Silva – SP
Roberto Ceratti Manfro – RS
Tércio Genzini – SP

Conselho Editorial Internacional

Domingos Machado (Lisboa-Portugal)
Presidente

B. D. Kahan (Houston-USA)
F. Delmonico (Boston-USA)
G. Opelz (Heidelberg – Alemanha)
H. Kreis (Paris-França)
J. M. Dibernard (Lyon-França)
J. Kupiec-Weglinski (Los Angeles-USA)
J. P. Soullou (Nantes-France)
N. L. Tilney (Boston-USA)
P.N.A Martins (Boston-USA)

*Representantes da Société
Francophone de Transplantation*
D. Glotz (Paris-França)
Y. Lebranchu (Tours-França)

*Representantes da Organización
Catalana de Trasplantes*
J. Lloveras (Barcelona-Espanha)
M. Manyalich (Barcelona-Espanha)

Diretorias Anteriores

1987/1988 – Diretor Executivo – Jorge Kalil
1987/1990 – Presidente do Conselho Deliberativo – Emil Sabbaga
1989/1990 – Diretor Executivo – Ivo Nesralla
1991/1992 – Diretor Executivo – Mário Abbud Filho
1991/1992 – Presidente do Conselho Deliberativo – Silvano Raia
1993/1994 – Diretor Executivo – Luiz Estevan Ianhez
1995/1996 – Presidente – Elias David-Neto

1997/1998 – Presidente – Valter Duro Garcia
1999/2001 – Presidente – Henry de Holanda Campos
2002/2003 – Presidente – José Osmar Medina Pestana
2004/2005 – Presidente – Walter Antonio Pereira
2006/2007 – Presidente – Maria Cristina Ribeiro de Castro
2008/2009 – Presidente – Valter Duro Garcia
2010/2011 – Presidente – Ben-Hur Ferraz Neto

JBT – Jornal Brasileiro de Transplantes

Jornal Oficial da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos – ABTO

Periódicidade: trimestral

JBT – J Bras Transpl. São Paulo. V.15, n.2, p.1651-1690, abr/jun 2012

Diretoria (Biênio 2012 - 2013)

Presidente	José O. Medina Pestana
Vice-Presidente	Lucio Pacheco
Secretário	Marilda Mazzali
2º Secretário	Eliana Régia Barbosa de Almeida
Tesoureiro	Alfredo Inácio Fiorelli
2º Tesoureiro	Roberto Ceratti Manfro

Conselho Consultivo:	Valter Duro Garcia
	Ben-Hur Ferraz Neto
	Maria Cristina Ribeiro de Castro
	Elias David-Neto
	Henry de Holanda Campos
	Jorge Milton Neumann

Redação e Administração

Avenida Paulista, 2001 - 17º andar - cj. 1704/1707 - CEP 01311-300 - São Paulo - SP

Secretária

Sueli F. Benko

Sede

Associação Brasileira de Transplante de Órgãos

Avenida Paulista, 2001 - 17º andar - cj. 1704/1707 - CEP 01311-300 - São Paulo - SP

Fone/Fax: (11) 3283-1753 / 3262-3353 / 3289-3169 – E-mail: abto@abto.org.br – www.abto.org.br

Produção • Diagramação • Acabamento

Sueli F. Benko

Publicação Eletrônica constante do site oficial da ABTO - www.abto.org.br

O JBT - Jornal Brasileiro de Transplantes, ISSN 1678-3387, é um jornal oficial, de periodicidade trimestral, da ABTO - Associação Brasileira de Transplante de Órgãos.

Copyright 2004 by Associação Brasileira de Transplante de Órgãos

Todos os direitos em língua portuguesa são reservados à ABTO - Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. É proibida a duplicação ou reprodução deste volume, ou de partes do mesmo, sob quaisquer meios, sem autorização expressa desta associação.

SUMÁRIO

EDITORIAL	1655
-----------------	------

ARTIGOS ORIGINAIS:

VIGILÂNCIA CLÍNICO-LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO HERPESVÍRUS HUMANO 6 (HHV-6) E HERPESVÍRUS HUMANO 7 (HHV-7) E DA CO-INFECÇÃO COM CITOMEGALOVÍRUS HUMANO (HCMV) APÓS O TRANSPLANTE HEPÁTICO	1656
--	-------------

Clinic Laboratory Surveillance of infection by Human Herpesvirus 6 (HHV-6) and Human Herpesvirus 7 (HHV-7) and Co-infection with Human Citomegalovirus (HCMV) after Liver Transplantation

Ana Maria Sampaio, Elisabete Yoko Udo, Sohemys Silvestre Bodine, Lisandra Akemi Suzuki, Célia Regina Pavan, Raquel Bello Stucchi, Elza Cotrim Soares, Marilda Mazzali, Sandra Helena Alves Bonon, Claudio Lúcio Rossi, Sandra Cecilia Botelho Costa, Ilka de Fátima Ferreira Santana Boin

BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS PROTECT AGAINST FOLIC ACID-INDUCED ACUTE KIDNEY INJURY	1661
--	-------------

Células-tronco mesenquimais protegem contra a lesão renal aguda induzida por ácido fólico

Marina Burgos-Silva, Cassiano Donizetti-Oliveira, Marco Antonio Cenedeze, Denise Maria Avancini Costa Malheiros, Marlene Antônia dos Reis, Álvaro Pacheco-Silva, Patrícia Semedo, Niels Olsen Saraiva Câmara

ARTIGOS DE REVISÃO:

MÉTODOS MOLECULARES NO DIAGNÓSTICO NÃO INVASIVO DA REJEIÇÃO AGUDA DOS TRANSPLANTES RENAIIS	1666
---	-------------

Molecular methods in non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants.

Gabriel Joelsons, Tuany Domenico, Roberto Ceratti Manfro

FATORES DE INTERFERÊNCIA NO PROCESSO DE DOAÇÃO DE ÓRGÃOS E TECIDOS: REVISÃO DA LITERATURA	1676
--	-------------

Interfering factors in the tissue and organ donation process: a review of the literature

Livia Diederichsen de Brito, Rita Gomes Prieb

SEGURANÇA NO USO DE PROBIÓTICOS EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS	1682
--	-------------

Safety use of probiotics in immunocompromised patients

Mayra Vieira Unterkircher, Tatiana Teixeira Gomes, Elizabeth Cardoso, Miyoko Nakasato, Lis Proença Vieira

NORMAS DE PUBLICAÇÃO	1689
-----------------------------------	-------------

EDITORIAL

Terapia celular na Insuficiência renal aguda: o que ainda falta?

A insuficiência renal aguda (IRA) afeta cerca de 200.000 pessoas, anualmente, nos EUA, com taxa de mortalidade ao redor de 50%. As lesões da IRA, geralmente causadas por injúria isquêmica ou tóxica, afetam predominantemente as células dos túbulos proximais e o tratamento restringe-se à diálise para controle de volume e depuração de pequenas moléculas.^{1,2}

Por essa razão, um grande esforço tem sido feito para buscar novas terapias capazes de substituir/reparar a função renal e, consequentemente, reduzir a morbidade e mortalidade, bem como o impacto econômico causado pela IRA.

Nas últimas três décadas, a ciência tem depositado suas esperanças na terapia celular com células tronco pluripotentes (TCT), em virtude da capacidade dessas células se auto-renovarem e diferenciarem em uma grande variedade de tecidos.

As vantagens da TCT são várias: atuação dinâmica em um ambiente que varia temporal e espacialmente após a lesão isquêmica, interagir com o ambiente do hospedeiro para poder diferenciar-se naquele tipo celular respectivo e poder ser obtida de várias fontes. Embora as CT compartilhem propriedades comuns, elas diferem em vários aspectos, tais como, na taxa de diferenciação, secreção de fatores tróficos e tipo de estímulo dentro do ambiente em que estão envolvidas. Os mecanismos de ação envolvidos na TCT ainda são desconhecidos, mas certamente são múltiplos e estão relacionados com hematopoese, geração e ativação de células imunológicas, imunomodulação e tolerância imune.³⁻⁵

No presente número do JBT, um trabalho de *Burgos-Silva e cols.* explora o potencial das CT para tratamento da IRA. Nele, os autores relatam como utilizaram CT mesenquimais derivadas da medula óssea (BMDC) para tratar camundongos com IRA induzida por elevadas doses de ácido fólico.

Após causarem a lesão tóxica aguda, um grupo de animais foi sacrificado após 48 horas e comparado com outro grupo que recebeu BMDC 24 horas antes do sacrifício. Estudos da função renal feitos mostraram significativa melhora dos níveis séricos de uréia e creatinina e, embora sem alcançar diferença estatisticamente significativa, também redução da necrose e aumento dos escores de reparação tecidual. Na tentativa de desvendar possíveis mecanismos envolvidos no “efeito protetor” conferido pelo tratamento com as BMDC, os autores mostraram tendência de redução de citocinas inflamatórias TNF, IL-6 e IL-1 beta, aumento da atividade mitótica e o índice de atividade anti-apoptose. Burgos-Silva e cols. sugerem que isso indicaria maiores índices de regeneração tecidual e proteção contra apoptose induzida por lesão e concluem que as BMDC são uma ferramenta importante no tratamento à lesão renal nefrotóxica.

Embora o estudo tenha sido bem elaborado e conduzido uma série de limitações que são inerentes ao campo da terapia celular, surge: a quantidade e tipo de células usadas, a via de administração dessas células, a pequena quantidade de animais utilizados e consequentemente impedindo comparações estatisticamente robustas, o modelo experimental de toxicidade *per se*, além da dificuldade de traduzir esses resultados para a prática clínica.

Sem dúvida, a TCT é uma abordagem promissora para tratamento da IRA e também de outras doenças crônicas como a própria insuficiência renal crônica.⁶ Entretanto, apesar do potencial das CT para regeneração e reparo das doenças renais, ainda existe um grande hiato entre o conhecimento científico gerado nos laboratórios e o uso clínico seguro e ético da TCT em humanos. Certamente existe muito trabalho investigativo a ser feito com CT em doenças renais e, nessa área específica, a comunidade científica brasileira tem contribuído significativamente.

O trabalho de *Burgos-Silva e cols.* publicado neste número do JBT é mais uma comprovação dessa contribuição.

Mario Abbud Filho

Editor do JBT

Bibliografia

- 1-United States Renal Data System. USRDS 2009 annual data report: atlas of end-stage renal disease in the United States. Bethesda, MD: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.
- 2-Lieberthal W, Nigam SK. Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury. *Am J Physiol.* 1998;275:F623–31.
- 3-Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell.* 1997;88(3):287–98.

- 4-Augello A, De Bari C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. *Hum Gene Ther.* 2010;21(10):1226–38.
- 5-Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143–7.
- 6-Caldas H C, Hayashi APC and Abbud-Filho M. Repairing the Chronic Damaged Kidney: The Role of Regenerative Medicine. *Transplant Proc.* 2011;3573-6.

VIGILÂNCIA CLÍNICO-LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO HERPESVÍRUS HUMANO 6 (HHV-6) E HERPESVÍRUS HUMANO 7 (HHV-7) E DA CO-INFECÇÃO COM CITOMEGALOVÍRUS HUMANO (HCMV) APÓS O TRANSPLANTE HEPÁTICO

Clinic Laboratory Surveillance of infection by Human Herpesvirus 6 (HHV-6) and Human Herpesvirus 7 (HHV-7) and Co-infection with Human Citomegalovirus (HCMV) after Liver Transplantation

Ana Maria Sampaio, Elisabete Yoko Udo, Sohemys Silvestre Bodine, Lisandra Akemi Suzuki, Célia Regina Pavan, Raquel Bello Stucchi, Elza Cotrim Soares, Marilda Mazzali, Sandra Helena Alves Bonon, Claudio Lúcio Rossi, Sandra Cecília Botelho Costa, Ilka de Fátima Ferreira Santana Boin

RESUMO

Os herpesvírus humanos HHV-6 e HHV-7, após infecção primária, permanecem latentes no organismo, podendo reativar-se por período de imunossupressão. **Objetivo:** Realizar vigilância laboratorial da infecção por HHV-6, HHV-7 e infecção com citomegalovírus Humano (HCMV) no pós-transplante hepático, através das técnicas de antigenemia, N-PCR e sorologia. **Métodos:** Amostras de 32 pacientes, com idade mediana de 47 (18-66) anos, sendo 20 (62,5%) do sexo masculino e 12 (37,5%) do sexo feminino. A monitorização laboratorial iniciou-se no pré-operatório e, após o transplante, de modo semanal, do 1º ao 2º mês, quinzenal no 3º mês, e mensal do 4º ao 6º mês. A partir de extração de linfócitos, realizou-se a detecção de HHV-6 e HHV-7, pela técnica de antigenemia. A detecção de anticorpos IgM anti HHV-6 foi realizada pelo teste Elisa. Realizou-se antigenemia, N-PCR e sorologia para HCMV, HHV-6 e HHV-7. **Resultados:** Com essas metodologias, a detecção de IgM anti HHV-6 foi positiva em 15,6% dos pacientes no pré-transplante, 25% na quarta semana, 40,6% na 12ª semana e em 46,9% na 24ª semana, após o enxerto. A antigenemia para HCMV, HHV-6 e HHV-7 foi positiva em 46,9%, 62,5% e 46,8% respectivamente. A N-PCR para HCMV e HHV-6 ocorreu em 81% dos casos, e para HHV-7 em 46,8%. Detectou-se que 50% dos pacientes estudados tiveram doença por HCMV. A doença causada pelo HHV-6 foi observada em 46,8% dos pacientes e em 15,6% para HHV-7. A concomitância de doenças foi observada nos pacientes com HCMV e HHV-6 em 21,9% e em 15,6% dos pacientes com HHV-6 e HHV-7. A doença causada pelos betaherpesvírus foi detectada com maior frequência ao redor da quinta semana. Os episódios de doença para HHV-6 e HHV-7 precederam ao aparecimento da doença por HCMV. **Conclusão:** Este estudo confirma a relevância da infecção pelo HCMV, HHV-6 e HHV-7 e a importância do monitoramento para a detecção precoce desses agentes, possibilitando a utilização de um tratamento preemptivo, com redução do risco de doença.

Descritores: Imunossupressão, Transplante de Fígado, Citomegalovírus, Herpesvírus Humano 6, Herpesvírus Humano 7; Prevalência.

Fonte Auxílio: Capes

Instituição:

Unidade de Transplante Hepático/UHT – Gastrocentro - Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP-Brasil

Correspondência:

Ilka de Fátima Ferreira Santana Boin
Rua Carlos Chagas 420, Cidade Universitária, CEP 13083-878, Campinas/SP,
Tel: (19) 3521-8582
Email: ilkaboin@yahoo.com

Recebido em: 30/05/2012

Aceito em: 28/06/2012

INTRODUÇÃO

Com o crescimento no número de transplantes, problemas peculiares relacionados ao tratamento imunossupressivo geram importantes índices de morbimortalidade. As infecções, principalmente, causam uma série de complicações à recuperação dos pacientes transplantados. As infecções virais correspondem a uma importante fonte dessas complicações e dentre esses agentes virais, encontra-se a subfamília betaherpesvírus (β -herpesvirinae) HCMV conhecido como o Citomegalovírus Humano, HHV-6 e HHV-7 (Herpesvírus Humano Tipo 6 e Tipo 7),¹⁻⁷ sendo esses três vírus pertencentes ao grupo de oito membros da família Herpesvírus de interesse

médico. O Citomegalovírus Humano (HCMV), o Herpesvírus Humano Tipos 6 e 7 (HHV-6 e HHV-7), ambos amplamente disseminados, com soroprevalência, podendo variar de 40% a 60%, em populações de alto nível sócio-econômico, enquanto em populações dos países subdesenvolvidos, a prevalência desses vírus é ainda maior, variando de 80% a 100%. Esse aumento dos anticorpos deve-se aos fatores ambientais e socioeconômicos, pois são maiores nos países subdesenvolvidos.³⁻¹² Uma vez ocorrida a primeira infecção, esses vírus permanecerão em latência por toda a vida no organismo do indivíduo.^{2,8} Na maioria das vezes, essas infecções são assintomáticas, porém, em imunocomprometidos, como os portadores do Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) e transplantados de órgãos, essas infecções aumentam a morbidade.^{1,3}

A transmissão dos betaherpesvírus pode ocorrer por via intrauterina, perinatal, contato direto de fluidos corporais, sexual, transfusões sanguíneas e em transplantes de órgãos, por isso, encontram-se em elevada prevalência na população em geral.^{2,8} O risco da infecção pode estar relacionado com o status sorológico do doador e certas drogas, como a ciclosporina e azatioprina, têm sido implicadas como as facilitadoras da infecção.^{2,10-13} As manifestações clínicas sugestivas de doença por HCMV estão relacionadas à febre persistente, pneumonia intersticial, retinite, doença gastrointestinal e alterações laboratoriais, tais como leucopenia, trombocitopenia, atipia linfocitária e elevação das enzimas hepáticas.^{4,7}

Episódios de convulsões, encefalites e encefalopatias têm sido associados a doenças febris causadas pelo HHV-6 e HHV-7 bem antes do exantema súbito ser, clinicamente, caracterizado no paciente.¹¹ Os betaherpesvírus também podem predispor o receptor de transplante para infecções oportunistas.⁵ Nos últimos anos, HCMV, HHV-6 e HHV-7 têm sido relacionados, por vários autores, devido a sua alta prevalência na população e estar freqüentemente relacionados a grande impacto clínico após o transplante.¹⁴⁻²² Nesse contexto, métodos eficazes e precoces de diagnósticos laboratoriais são de grande importância no prognóstico desses pacientes. A antigenemia é considerada uma técnica para detecção precoce com alto valor preditivo para doença, sendo uma ferramenta de diagnóstico útil no pós-transplante, assim como a sorologia, e N-PCR têm sido bastante utilizados como métodos eficazes de diagnóstico para o monitoramento clínico-laboratorial.

MÉTODOS

No período de 2003 a 2006, foram monitoradas amostras de 32 pacientes de ambos os sexos que foram submetidos ao transplante de fígado na Unidade de Transplante de Fígado do Hospital de Clínicas e no Ambulatório do Gastrocentro da Universidade Estadual de Campinas (UTH – HC – Unicamp). A mediana da idade foi de 47 (18-66) anos sendo 20 (62,5%) deles pertencentes ao sexo masculino e 12 (37,5%) ao sexo feminino. Para fazer parte do estudo, os pacientes deveriam ter acima de 18 anos, aceitar submeter-se às coletas de sangue no período de seis meses e regularidade para as coletas das amostras biológicas. Os que não tiveram seguimento de acordo com o protocolo não puderam fazer parte deste estudo, bem como aqueles que evoluíram ao óbito dentro do primeiro mês após o transplante.

O protocolo foi seguido de acordo com os requerimentos para pesquisas envolvendo seres humanos do Brasil e foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp. Todos os pacientes que participaram desse trabalho foram informados sobre os procedimentos a serem adotados e concordaram com a coleta do material necessário para o estudo, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo paciente ou responsável, após todas as dúvidas terem sido esclarecidas.

A monitorização dos pacientes foi realizada prospectivamente desde o pré-transplante (imediatamente antes do ato cirúrgico – dia 0) e no pós-transplante: de modo semanal no 1º e 2º mês (semana 1 a 8), quinzenal no 3º mês (semana 10 e 12) e mensal do 4º mês até o final do 6º mês (semana 16, 20 e 24).

A imunossupressão básica consistiu de: a) inibidores de calcineurina: ciclosporina (0,4 mg/kg/dia com nível sanguíneo variando de 150-250 ng/ml) ou tacrolimus (0,01mg/kg/dia com nível sanguíneo variando de 5-10 ng/ml); b) corticosteróides (metilprednisolona 1,0 g no intra-operatório, com redução no sétimo dia para 20 mg até o final do primeiro mês, 15 mg no segundo mês, 10 mg no terceiro mês, 5 mg no quarto mês e retirada se o paciente não fosse portador de doença auto-imune); c) inibidores de purina (azatioprina na dose de 50mg/dia, ou micofenolato de mofetila na dose de 1000 mg/dia ou micofenolato sódico na dose de 720 mg/dia). A profilaxia antiviral para o Herpes simplex foi feita com aciclovir (200 mg de 12/12 horas), por dois meses. Os pacientes não fizeram profilaxia para o HCMV, a não ser que o doador fosse soropositivo e o receptor soronegativo. Os pacientes com doença por HCMV, com sintomas clínicos, receberam ganciclovir, por via intravenosa, na dose de 5 mg/kg duas vezes ao dia, por seis semanas, seguido por dose de manutenção.

Os critérios para caracterizar diagnóstico de infecção por HCMV foram considerados quando foram constatados dois ou mais N-PCR positivos em amostras extraídas de DNA de granulócitos de sangue periférico, consecutivos num intervalo de 30 dias segundo critérios propostos por e/ou antigenemia positiva (uma ou mais células positivas) segundo autores.^{7,10,14,23} Para HHV-6, a definição de infecção ativa foi baseada na positividade da N-PCR em DNA extraído de leucócitos totais, e/ou antigenemia positiva (uma ou mais células positivas) segundo os relatos de literatura.^{8,9} E para o HHV-7 foi definida quando pelo menos uma amostra de soro resultou positiva pela N-PCR e/ou antigenemia positiva (uma ou mais células positivas).^{8,13}

Para a caracterização de diagnóstico para a co-infecção ativa dos betaherpesvírus, considerou-se quando dois ou mais vírus foram detectados simultaneamente na mesma amostra.^{8,9} A doença por HCMV foi considerado além das evidências laboratoriais de infecção ativa citadas anteriormente, fez-se necessário a presença de manifestações clínicas compatíveis com aquelas sabidamente causadas pelo HCMV, como a pneumonia intersticial, doença gastrointestinal, hepatite, retinite, nefrite, miocardite, febre maior ou igual a 38°C, no mínimo por três dias sem foco detectado, acompanhada por leucopenia ($\leq 3.000/mm^3$) e plaquetopenia ($\leq 100.000/mm^3$) afastadas outras causas, de acordo com os critérios já descritos por outros autores.¹⁴ Para caracterizar a provável doença por HHV-6, além das evidências laboratoriais de infecção ativa citadas anteriormente, fez-se necessária a presença de manifestações clínicas compatíveis com a de HHV-6, como a febre, erupções cutâneas, disfunção hepática (alanina aminotransferase $> 100IU/ml$), disenteria, pneumonite intersticial, microangiopatia trombótica, encefalite e principalmente mielossupressão (sendo afastadas outras causas virais e bacterianas).^{2,14,16,17,24}

Para o HHV-7 não há ainda consenso em relação às manifestações clínicas, mas, sintomas como febre, encefalite, pneumonite intersticial, hepatites, disfunção e rejeição do enxerto e alterações laboratoriais como leucopenia ($\leq 3.000/\text{mm}^3$) e plaquetopenia ($\leq 100.000/\text{mm}^3$) e associados a AGM positiva (pelo menos uma célula) e/ou 1 N-PCR positivo foram considerados como doença.¹³

Foram também avaliadas as infecções bacterianas concomitantes, definidas como aquelas que ocorreram após a cirurgia e diagnosticadas laboratorialmente. Os episódios clínicos relatados foram comparados e analisados com a presença de infecção ativa para cada um dos vírus estudados.

Devido à disfunção e à rejeição do enxerto, foi realizada avaliação da função hepática baseada na elevação sérica da alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, gama-glutamil transpeptidase e das bilirrubinas, usando-se os padrões e protocolo da UTH-HC-Unicamp. Os episódios de rejeição do enxerto foram documentados, baseados em análises histopatológicas de material obtido por biópsia hepática. Os critérios de Banff foram utilizados para classificação e determinação do grau e tipo de rejeição celular.⁴

A partir de linfócitos extraídos de sangue periférico, realizou-se a detecção de antígenos de HHV-6 com anticorpos monoclonais C65206M (marca Biodesign International, France) e MAB8535 (marca Biodesign International - USA) e conjugados de soro de coelho anti-IgG de camundongo Z0412-1 (marca Dako - CA, USA) e soro de cabra anti-IgG de coelho marcado com peroxidase 81-6120 (marca Zymed, CA, USA). Para a detecção de antígenos de HHV-7 foi utilizado o anticorpo monoclonal de rato KR4 (marca Advance Biotechnologies, Canada), conjugado soro de coelho anti-imunoglobulina de camundongo P0260 (marca Dako Cytomation, USA) e conjugado soro de cabra anti-IgG de coelho 81-6120 (marca Zymed, CA, USA) diluídos em PBS/BSA e aplicados sobre a fixação celular. Foi realizada a detecção de anticorpos IgM anti HHV-6 seguindo as especificações do kit pelo teste de Elisa (marca Panbio, Austrália).

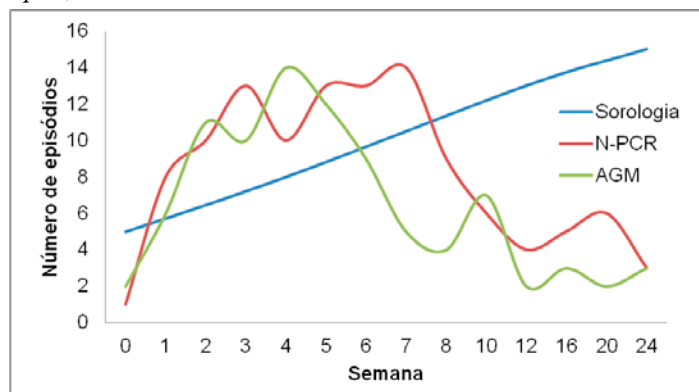
Os resultados obtidos nos procedimentos técnicos do estudo foram comparados com outros achados laboratoriais, tais como; antigenemia para HCMV, N-PCR para HCMV, HHV-6 e HHV-7 e sorologia para HCMV, bem como os achados clínicos relatados nos prontuários dos transplantados da Unidade de Transplante Hepático UTH - HC e/ou informados pela equipe médica.

Após todos os testes serem realizados, foram contabilizados para efeito de análise. Para comparação de variáveis categóricas foi utilizado o teste qui-quadrado, com uso do teste exato de Fisher quando necessário, utilizando-se o programa estatística 7.0 (CA,USA). Houve significância estatística quando o $p > 0,05$.

RESULTADOS

A sorologia IgG (imunoglobulina G) para HCMV foi positiva em 87,5% (28/32) dos pacientes no dia 0 do estudo. A detecção de IgM anti HHV-6 foi positiva em 15,6% dos pacientes no pré-transplante, 25% na quarta semana, 40,6% na 12ª semana e em 46,9% na 24ª semana após o enxerto (figura 1)

Figura 1. Número de episódios de positividade dos exames de sorologia IgM (imunoglobulina M), N-PCR (reação de cadeia da polimerase) e AGM (antigenemia) para HHV-6 (herpesvírus humano tipo 6) de acordo com a semana de coleta

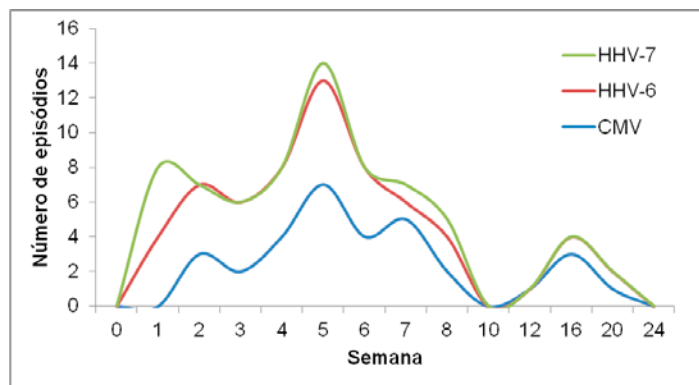


Houve 13 episódios de rejeição celular aguda em oito pacientes (8/32=25%), porém somente dois (2/13=15,4%) foram associados à doença HCMV e dois (2/13=15,4%) à doença HHV-6. Os episódios de infecção bacteriana ocorreram em 26 (26/32=81,2%), e em 13 (13/26 = 50%) deles houve associação com a doença HHV-6 e HCMV.

A antigenemia para HCMV, HHV-6 e HHV-7 foi positiva em 46,9%, 62,5%, 46,8%, respectivamente. A antigenemia para HCMV foi detectada em 15 casos (46,9%), sendo que a maioria apresentou manifestações clínicas, tais como disfunções gastrointestinais acompanhadas de febre. A N-PCR para HCMV e HHV-6 detectou sequência de DNA em 81% dos casos, e para HHV-7 foi de 46,8%. Detectou-se que 50% dos pacientes estudados foram diagnosticados com a doença por HCMV. A doença causada pelo HHV-6 foi observada em 46,8% dos pacientes e em 15,6% para HHV-7. A concomitância de doenças foi observada nos pacientes com HCMV e HHV-6 em 21,9% casos e de 15,6% em pacientes com HHV-6 e HHV-7; não houve concomitância para doença HCMV e HHV-7 nem para os três vírus estudados.

A doença causada pelos betaherpesvírus estudados foi detectada com maior frequência ao redor da quinta semana. E os episódios de doença para HHV-6 e HHV-7 surgiram antes do aparecimento da doença por HCMV.

Figura 2: Número de episódios de doença viral detectada de acordo com a semana de coleta (HCMV = citomegalovírus; HHV-6 = herpesvírus humano tipo 6; HHV-7 = herpesvírus humano tipo 7)



DISCUSSÃO

A infecção por HCMV após o transplante de órgãos é uma das complicações virais mais importantes que pode acometer o paciente.^{1,2,6,8,10,13,19,23} Essa importância torna-se ainda mais evidente nesse contexto quando se observa que pode estar relacionada a uma miríade de complicações, como doenças oportunistas, rejeição celular aguda e crônica, infecções bacterianas, dentre outras.^{18,20-32} Nesse estudo, investigou-se a incidência das infecções pelos betaherpesvírus HCMV, HHV-6 e HHV-7 através de N-PCR, antigenemia e sorologia, e procurou-se determinar as correlações dos testes aplicados com os possíveis fatores de riscos relacionados ao impacto clínico após o transplante de fígado. Observou-se uma prevalência de 87,5% de indivíduos soropositivos para HCMV (IgG positiva), no pré-transplante, sendo esse achado compatível com a da literatura, que aponta a prevalência de infecção por HCMV em torno de 80%-100% da população brasileira.²¹ Em relação ao HHV-6 não foi possível a realização da sorologia dos respectivos doadores para determinação de infecção primária, reinfecção ou reativação. A pesquisa de anticorpos IgM para HHV-6 foi detectada em cinco pacientes (15,6%) no pré-transplante. Consecutivamente, na quarta semana após o transplante, oito (25%) pacientes apresentaram IgM positiva, 13 (40%) na décima segunda semana e em 15 (46%) na vigésima quarta semana após o enxerto.

Os resultados de IgM citados acima sugerem infecção primária ou uma reativação da doença após o enxerto, pois houve consecutivamente um aumento dos títulos de IgM no decorrer das semanas e, em muitos casos, correlações com a antigenemia ou PCRs positivos como mostra a (figura 1).

Na presente casuística, a detecção das infecções concentrou-se nos cinco primeiros meses de seguimento, período importante de adaptação pós-operatória em que o uso e controle da imunossupressão podem ser críticos.

A positividade para HHV-7 e HHV-6 foi detectada desde o dia 0 do estudo. Isso fez com que a ordem de reativação ou infecção nos transplantados fosse HHV-7 seguido pelo HHV-6 e, por último, o HCMV. Isso sugere que HHV-7 pode ter reativado infecções latentes por HCMV e HHV-6.

Este trabalho demonstrou correlação com dados da literatura^{2,6,8,9} e a grande importância destes agentes como causadores de morbidade em pacientes transplantados hepáticos.

CONCLUSÃO

A partir da vigilância pelas técnicas laboratoriais utilizadas nesse estudo, foi possível detectar as infecções e coinfeções pelos betaherpesvírus no pós-transplante hepático. Este estudo confirmou a relevância da infecção pelo HCMV, HHV-6 e HHV-7 nos transplantados. A realização de N-PCR e antigenemia simultaneamente são úteis para o diagnóstico desses agentes. É importante acompanhar as cargas virais após o transplante, e a antigenemia, além de ser uma técnica precoce de detecção, pode ser utilizada rotineiramente pelo benefício de baixo custo, comparada a técnicas de moleculares. Este foi um trabalho pioneiro de antigenemia para HHV-6 e HHV-7 na equipe e demonstrou, no entanto, que outros estudos são necessários para estabelecer o uso rotineiro de antigenemia para os betaherpesvírus, para compreender melhor os aspectos clínicos que envolvem esses agentes, assim como já vem sendo realizado para o HCMV após o enxerto.

ABSTRACT

Human herpesviruses HHV-6 and HHV-7 after primary infection remain latent in the body and can reactivate after immunosuppression.

Purpose: The laboratory surveillance of HHV-6 and HHV-7 and the evaluation of co-infection with HCMV human cytomegalovirus in post-liver transplantation were carried out through antigenemia, serology and N-PCR techniques. **Methods:** Samples from 32 patients, median age of 47 (18-66) years old, being 20 (62.5%) male and 12 (37.5%) were female. Biological monitoring began before transplant, weekly from 1st to 2nd months, biweekly in the 3rd month, and monthly from the 4th month to the 6th months. Extraction of lymphocytes was performed for the HHV-6 and HHV-7 antigenemia technique. Detection of IgM antibodies HHV-6 was done by the ELISA test. N-PCR and serology was applied for HCMV, HHV-6 and HHV-7. **Results:** With these methods, the detection of HHV-6 IgM was positive along the pre-transplant period in 15.6% of patients, 25% after the fourth week, 40.6% after the 12th week, and 46.9% at 24 weeks after the transplant. The HCMV, HHV-6 and HHV-7 antigenemias were positive in 46.9%, 62.5% and 46.8% respectively, N-PCR was positive for HCMV and HHV-6 in 81% of cases, and for HHV-7 in 46.8%. It was found that 50% of patients studied had HCMV disease. The disease caused by HHV-6 was present in 46.8% of patients and 15.6% for HHV-7. Concomitant disease was observed in patients with HCMV and HHV-6 in 21.9% and 15.6% of patients with HHV-6 and HHV-7. The disease caused by betaherpesvirus was more frequently detected around the fifth week. The HHV-6 and HHV-7 illness episodes preceded the onset of HCMV disease. **Conclusion:** This study confirmed the relevance of HCMV, HHV-6 and HHV-7 infections and the importance of using monitoring techniques for early detection of these agents allowing the use of a preemptive treatment with reduced risk to the disease.

Keywords: Immunosuppression; Liver transplantation; Cytomegalovirus; Human, Herpesvirus 6, Human; Human, Herpesvirus 7, Human; Prevalence.

REFERÊNCIAS:

- Guardia AC, Stucchi RS, Sampaio AM, Milan A, Costa SC, Pavan CR, et al. Human herpesvirus 6 in donor biopsies associated with the incidence of clinical cytomegalovirus disease and hepatitis C virus recurrence. *Int J Infect Dis*. 2012 Feb;16(2):e124-9.
- Costa FA, Soki MN, Andrade PD, Bonon SHA, Thomasini RL, Sampaio AM, et al. Simultaneous monitoring of CMV and human herpesvirus 6 infections and diseases in liver transplant patients: one-year follow-up. *Clinics*. 2011;66:949-53.
- Aquino VH, Figueiredo LTM. Cytomegalovirus Infection in renal Transplant Recipients diagnosed by nested-PCR. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2001;34(2):93-101.
- Banffs Schema for Grading Liver Allograft Rejection An International Consensus Document. *Hepatology*. 1997;25(3):658-63.
- Dockrell DH, Mendez JC, Jones M, Harmsen WS, Ilstrup DM, Smith TF, et al. Human herpesvirus 6 seronegativity before transplantation predicts the occurrence of fungal infection in liver transplant recipients. *Transplantation*. 1999;67(3):399-403.
- Härma M, Hockerstedt K, Krogerus L, Lautenschlager I. Pretransplant human herpesvirus 6 infection of patients with acute liver failure is a risk factor for posttransplant human herpesvirus 6 infection of the liver. *Transplantation*. 2006;81:367-72.
- Kotton CN, Humar A, Caliendo AM, Emery V, Lautenschlager I, Lazzarotto T, et al. Transplantation Society International CMV Consensus Group. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation*. 2010;89:779-95.
- Lautenschlager J, Lappalainen M, Linnavuori K, Suni J, Hockerstedt K. CMV infection is usually associated with concurrent HHV-6 and HHV-7 antigenemia in liver transplant Patients. *J Clin Virol*. 2002;25:57-61.
- Lautenschlager I, Halme L, Hockerstedt K, Krogerus L, Taskinen E. Cytomegalovirus infection of the liver transplant: virological, histological, immunological, and clinical observations. *Transpl Infect Dis*. 2006;8:21-30.
- Milan A, Sampaio AM, Guardia AC, Pavan CR, Andrade PD, Bonon SH, et al. Monitoring and detection of cytomegalovirus in liver transplant recipients. *Transplant Proc*. 2011;43:1360-1.
- Razonable RR, Paya C. The impact of HHV-6 and 7 infection on the outcome of liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2002;(8):651-8.
- Maya TC; Azulay, DR. Infecção pelo Citomegalovirus. In: Lupi O; Silva AS; Pereira Jr. Herpes – Clínica, Diagnóstico e Tratamento, 1º Ed., Medsi Editora Médica e Científica. 2000; 8:135-56.
- Thomasini RL, Sampaio AM, Bonon SH, Boin IF, Leonardi LS, Leonardi M, et al. Detection and monitoring of human herpesvirus 7 in adult liver transplant patients: impact on clinical course and association with cytomegalovirus. *Transplant Proc*. 2007;39:1537-9.
- Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definition of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2002;34:1094.
- Lee SO, Brown RA, Razonable RR. Clinical significance of pretransplant choromically integrated human herpesvirus-6 in liver transplant recipients. *Transplantation*. 2011;92:224-9.
- Sashihara J, Tanaka-Taya K, Tanaka S, Amo K, Miyagawa H, Hosoi G, et al. herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. *Blood*. 2002;100:2005-11
- Singh N, Carrigan DR. Human herpesvirus-6 in transplantation: an emerging pathogen. *Ann Intern Med*. 1996 Jun 15;124(12):1065-71.
- Seehofer D, et al. CMV hepatitis after liver transplantation: incidence, clinical course, and long-term follow-up. *Liver Transplantation*. 2002;8(12):1138-46
- Scott GM, Naing Z, Pavlovic J, Wasenko JM, Angus P, Jones R, et al. Viral factors influencing the outcome of human cytomegalovirus infection in liver transplant recipients. *J Clin Virol*. 2011;51:229-33.
- Lianghui G, Shusen Z, Tinoba L, Yan S, Welling W, Anwei L. Deferred versus prophylactic therapy with gancyclovir for cytomegalovirus in allograft liver transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2004;36:1502-5
- Costa SCB. Infecção por citomegalovirus (CMV); epidemiologia, diagnóstico e tratamento. *Revista Brasileira de Clínica Terapêutica* n. 25 1. 1999. p 18-28.
- Biganzoli P, Ferreyra L, Sicilia P, Carabajal C, Frattari S, Littvik A, et al. IgG Subclasses and DNA Detection of HHV-6 and HHV-7 in Healthy Individuals. *J Med Virol*. 2010;82:1679-83.
- Bonon SHA, Menoni SMF, Rossi CL, Souza CA, Costa SCB. Surveillance of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation patients. *J Infection*. 2005;50:130-13.
- Boutolleau DD, Cointe A, Gautheret-Dejean M, Mace H, Agut L, Grangeot-Keros, et al. No evidence for a major risk of roseolovirus vertical transmission during pregnancy. *Clin. Infect*. 2003;36:1634-5.
- Almeida LNB, Azevedo RS, Amaku M, Massad E. Cytomegalovirus seroepidemiology in an urban community of São Paulo, Brazil. *Rev Saúde Pública*. 2001;35(2):124-9.
- Feldstein AE, Razonable RR, Boyce TC, Freese, DK, El-Youssef M, Perrault J, et al. Prevalence and clinical significance of human herpesviruses 6 and 7 active infection in pediatric liver transplant patients. *Pediatr Transplant*. 2003;7:125-9.
- Ferreira W, Souza J. *Microbiologia – volume III. Lidel – edições técnicas, lda; Lisboa, Portugal* 2002
- Bresnahan WA, Shenk T. A Subset of Viral Transcripts Package Within Human Cytomegalovirus Particles. *Science*. 2000 Jun 30;288(5475):2373-6.
- Humar A, Malkan G, Moussa G, Greig P, Levy G, Mazzulli T. Human herpesvirus-6 is associated with cytomegalovirus reactivation in liver transplant recipients. *J Infect Dis*. 2000;181:1450-3.
- Linares L, Sanclemente G, Cervera C, Hoyo I, Cofán F, Ricart MJ, et al. Influence of Cytomegalovirus Disease in Outcome of Solid Organ Transplant Patients. *Transplantation proceedings*. 2011;43:2145-8.
- Scott GM, Naing Z, Pavlovic J, Wasenko JM, Angus P, Jones R, et al. Viral factors influencing the outcome of human cytomegalovirus infection in liver transplant recipients. *J Clin Virol*. 2011;51:229-33.
- Pannuti CS, Vilas B, Neto, LSVA, Ângelo, MJO, Sabbada E. Detecção de anticorpos IgM nas interações primárias e secundárias pelo citomegalovirus em pacientes submetidos a transplante renal. *Ver Inst Méd Trop*. 1987;29:317-22.

BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS PROTECT AGAINST FOLIC ACID-INDUCED ACUTE KIDNEY INJURY

Células-tronco mesenquimais protegem contra a lesão renal aguda induzida por ácido fólico

Marina Burgos-Silva¹, Cassiano Donizetti-Oliveira¹, Marco Antonio Cenedeze¹, Denise Maria Avancini Costa Malheiros², Marlene Antônia dos Reis³, Álvaro Pacheco-Silva¹, Patricia Semedo¹, Niels Olsen Saraiva Câmara^{1,4}

ABSTRACT

Acute kidney injury constitutes a syndrome responsible by a major percentage of acute kidney failures and it continues being associated to high mortality rates. Induced mainly by ischemia-reperfusion injury and nephrotoxic drugs, this condition is marked by a decrease in organ function and histopathological pattern of acute tubular necrosis. In search of more efficient therapies, a great deal of attention has been given to the therapeutic use of stem cells to treat kidney injuries. Bone marrow stem cells in particular have received a great attention due to its immunomodulatory properties, and its therapeutic mechanisms are intensely being studied in the literature. **Purpose:** In view of recent findings, the aim of our research was to get a better understanding on the potential role of bone marrow mesenchymal stem cells in a murine model of acute nephrotoxicity induced by folic acid. **Methods:** C57Bl/6j mice (8 weeks) were submitted to acute kidney injury by folic acid (200mg/kg) administered intraperitoneally. After 24 hours, mice received mesenchymal stem cells ($5 \cdot 10^5$ cells per animal) through retro-orbital intravenous injection. Mice were sacrificed after 24 hours and blood and kidneys were harvested for analysis. **Results:** Stem cell treatment conferred functional improvement seen through lower creatinine and urea serum levels in 8 week old C57Bl/6j mice in comparison to mice treated only with folic acid (200mg/kg body weight). This amelioration are also correlated to down regulation of kidney pro-inflammatory cytokine mRNA levels as TNF- α , IL-6 and IL-1 β in stem cell treated mice. In addition, treated mice demonstrated higher levels of immunostaining for proliferating cell nuclear antigen and a tendency towards a higher Bcl-2/Bax mRNA ratio, indicating higher tissue regeneration and protection against injury-induced apoptosis. **Conclusion:** These results indicate bone marrow stem cells as an efficient tool in nephrotoxic kidney injury treatment.

Keywords: Acute Kidney Injury; Mesenchymal Stem Cells; Immunomodulation; Folic Acid.

INTRODUCTION

Despite the advancements in replacement therapies and transplant research, acute kidney injury (AKI) is still associated to high hospital mortality rates (approximately 50 % of all AKI patients in intensive care units), and a high index of consequent chronic kidney disease.¹ Characterized by a rapid decline in the order of hours or weeks in the glomerular filtration rate and important acute tubular necrosis (ATN), immunologically, an expressive degree of tissue inflammation accompanies this functional impairment and amplifies organ tissue injury. In view of this, studies have long focused in immunoregulatory strategies to decrease kidney inflammation and restore organ homeostasis.

In the past two decades, especial attention has been given to particular therapeutic properties of stem cells. Defined according to its pluripotency and location of origin; along with its regenerative capacity, an important characteristic found in these cells has been its immunomodulatory ability. Many studies have demonstrated a special role for bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSC) in regulating injuries of inflammatory origin, mainly through paracrine pathways.^{2,3}

Instituição:

¹ Experimental and Clinical Immunology Laboratory. Division of Nephrology. Federal University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil;

² Pathology Department, University of São Paulo, São Paulo, Brazil;

³ Pathology Department, UFTM, Uberaba, Minas Gerais, Brazil

⁴ Laboratory of Transplantation Immunobiology, Department of Immunology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Correspondência:

Niels Olsen Saraiva Câmara, M.D.

Department of Immunology - Institute of Biomedical Science IV - USP

Rua Prof Lineu Prestes, 1730. 05508-900 São Paulo, SP, Brazil.

Phone: (5511) 3091-7388 Fax: (5511) 3091-7224

E-mail: niels@icb.usp.br

Recebido em: 01/06/2012

Aceito em: 28/06/2012

PURPOSE

It has been shown that folic acid component, also known as Vitamin B9 widely used in dietary fortification, in large doses induces nephrotoxicity in murines, compromising renal function and inducing inflammatory kidney damage,^{4,5} making it an ideal model for the study of AKI. Therefore, our study aimed a better understanding on the potential role of the BMSC treatment in a mouse model of acute kidney nephrotoxicity induced by folic acid.

METHODS

Animal model and sample preparation:

Male C57BL/6j mice (8weeks) were obtained from CEDEME (Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil). All procedures were done following the UNIFESP Research Ethics Committee (CEP process no. 1164/2008). Animals received folic acid (200mg/kg) in NaHCO₃ (0.15M) vehicle i.p. to induce acute kidney injury according to the protocol established by Klingler et al. At the determined time, animals were killed by anesthetic overdose, xilazine /ketamine (Agribands do Brasil Ltda, São Paulo) to obtain kidney and blood samples. Kidney fragments were snapped frozen in liquid nitrogen for gene expression assays or fixed in buffered formalin and embedded in paraffin for immunohistological assays. Blood samples were used for kidney functional analysis. Animals were divided into three groups, each with the respective sample number (unless where indicated otherwise): Ctr, exposed to no treatment (n=3); FA, submitted to FA treatment and killed 48h later (n=5); and FA+BMSC, which received BMSC 24 hours after FA treatment and which was killed 24 hours later (n=5).

Bone marrow-derived mesenchymal stem cells:

Bone marrow stem cells were extracted from C57Bl/6 mice tibia and femur and cultivated in Dulbecco's Eagle medium low glucose (Cultilab) supplemented with 10% bovine fetal serum for 4-5 passages at 5% CO₂, 37°C. BMSCs were then characterized for the positive and negative expression of mesenchymal stem cell specific membrane markers (CD45, CD103, CD34 and MCHI) through flow cytometry, FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). In parallel, BMSCs were also analyzed according to their adipogenic and osteogenic potential. BMSC adipogenesis was induced with low glucose DMEM medium supplemented with 10% FBS, dexamethasone (1 µM), isobutylmethylxanthine (0.5 mM), insulin (10 µg/ml), and indomethacin (100 µM) for 14 days. Osteogenesis was achieved with low glucose DMEM supplemented with 10% FBS, dexamethasone (0.1 µM), ascorbic acid (0.2 mM), and beta glycerol phosphate (10 mM) treatment for 28 days. Adipocyte lipid and osteocyte calcium deposit staining was done by Oil Red and Von Kossa, respectively. For BMSC treatment, cultivated BMSC were suspended in sterile phosphate buffered saline (PBS) and administered unto C57Bl/6 anesthetized mice (5.10⁵ cells) through retro-orbital intravenous injection.

Kidney function assays:

Serum creatinine and urea measurements were performed

through colorimetric assays based on the Jaffe and urease methods using deproteinized serum samples (Labtest, São Paulo, Brazil). Values were determined using a spectrophotometer and analyzed accordingly.

Gene expression assays:

a) RNA isolation: In brief, total RNA was extracted from snap frozen kidney fragments using Trizol Reagent[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and isolated using chloroform and isopropanol solutions; b) Single strand cDNA synthesis was performed using MML-V reverse transcriptase (Promega, Madison, USA). c) RT-PCR: Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using TaqMan primers (Applied Biosystem, USA) for the following molecules: TNF-α (Mm00443258_m1), IL-6 (00561420_m1), IL-1β (Mm01336189_m1) Bax (Mm00432050_m1) and Bcl-2 (Mm00477631). The Sequence Detection Software 1.9 (SDS) was used for the analysis, and mRNA expression was normalized to HPRT values. The values are expressed relative to a reference from the control samples. The Ct (threshold cycle) for the target gene and the Ct for the internal control were determined for each sample. Samples were run in triplicate. The relative expression of mRNA was calculated by 2-ΔΔCT. All the experimental samples are expressed as an n-fold difference relative to the calibrator.

Acute Tubular Necrosis (ATN):

HE-stained kidney histological sections were assessed for acute tubular necrosis and tissue regeneration and ranked according to the percentage of area affected.

Kidney cell mitosis:

In order to assess kidney regeneration, paraffin-embedded sections were submitted to immunohistochemistry after heat retrieval and stained for Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (diluted 1:200; clone PC10, DAKO), using a HRP-conjugated secondary antibody (Horseradish peroxidase), EnVision[™]+ Dual Link System-HRP (Dako, EUA) revealed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB)+ substrate-chromogen (Dako, EUA).

Statistic analysis: Data used was expressed as mean ± S.D. Differences between groups were evaluated for statistical significance using ANOVA followed by the Bonferroni test and Student's t-test. Differences were considered significant at P < 0.05.

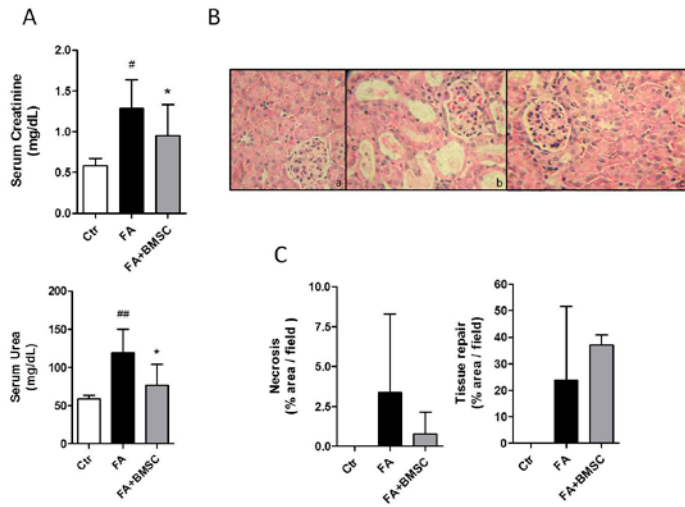
RESULTS

Kidney Function and ATN:

In order to evaluate AKI in FA-induced nephropathy, dose-response and time-response curves were established through kidney function analyses (data not shown). Serum creatinine and urea levels showed efficient kidney damage in FA-treated mice at 200mg/kg body weight and functional impairment peaked 48h after drug injection (data not shown). These references were therefore used for stem cell treatment evaluation. Initial function assays demonstrated that BMSC treatment 24h after AKI induction (FA+BMSC) conferred significant protection (p<0.05) in kidney function in comparison to folic acid only

(FA) -treated mice (Fig.1A). This amelioration also were correlated to a tendency towards lower ATN scores, as assessed by histopathological analyses (Fig.1B,C).

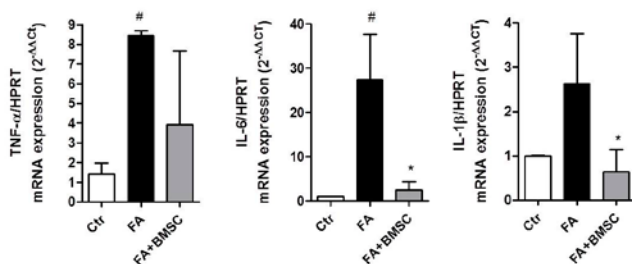
Figure 1. Kidney function and histomorphology 48h after FA (200mg/kg) or vehicle (NaHCO₃ 0,15M) injection; A) Serum creatinine and urea values for ctr, FA, and FA+BMSC-treated animals; Data expressed as mean of mg/dL $\pm$ SD B) Representative image for a) ctr, b) FA, and c) FA+BMSC-treated animals, magnification 40x. C) Tissue necrosis and repair scores found in kidneys (ctr, n=2; FA and FA+BMSC, n=3), expressed as mean of the percentage of affected areas per field evaluated $\pm$ SD. # p <0.05 vs. ctr, ## p <0.005 vs. ctr, * p <0.05 vs. FA.



Immunomodulation:

In order to elucidate the mechanism through which BMSCs exerted their therapeutic effects, our group studied a possible immunomodulatory role for these cells through RT-PCR gene expression for classical inflammatory pathways. While the FA group developed a significant pro-inflammatory profile indicated by significantly higher levels of TNF- α , IL-6 and a tendency towards higher IL-1 β mRNA expression, BMSC-treated animals displayed a reduction in the levels of these components, with a tendency towards lower TNF- α mRNA expression indicating a decrease in tissue inflammation for BMSC-treated mice (Fig. 2).

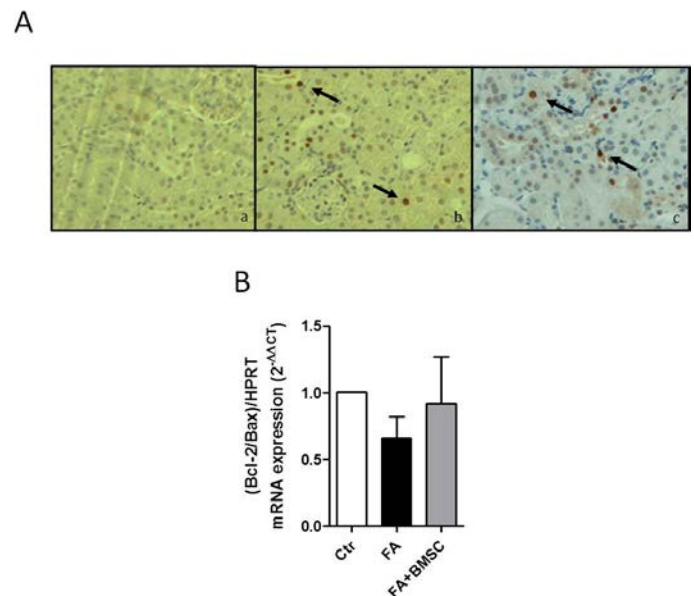
Figure 2. Tissue proinflammatory mRNA profile. TNF α , IL-6 and IL-1 β kidney mRNA expression, evaluated through RT-PCR and generated by referencing each gene to HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase - housekeeping gene) as an internal control (ctr, n=3; FA and FA+BMSC, n=3). Data expressed as the mean of 2- $\Delta\Delta$ Ct $\pm$ SD. # p <0.05 vs. ctr, * p <0.05 vs. AF.



Tissue regeneration:

Another mechanism of action postulated for MSC therapy consists in its regenerative properties. This phenomenon was assessed by immunohistochemistry staining for PCNA, which denotes mitotic cells. Positive staining confirmed this theory, as the AF+BMSC group displayed higher levels of mitotic cells when compared to the FA group (Fig. 3). In parallel, our group also assessed the tissue's anti-apoptotic index indicated by a Bcl-2/Bax mRNA ratio. FA-treated mice had an important tendency towards a lower anti-apoptotic index. In comparison, this tendency was reversed in the stem cell-treated group which displayed a Bcl-2/Bax mRNA ratio, similar to the control group, which were also correlated to PCNA mitosis results.

Figure 3. Kidney cell proliferative and apoptotic profile evaluation. A) Immunohistochemistry for PCNA. Representative image for a) ctr, b) FA, and c) FA+BMSC-treated animals. Full arrows indicate positive staining. Magnification 20x. B) (Bcl-2/ Bax) kidney mRNA expression evaluated through RT-PCR and generated by referencing each gene to HPRT as an internal control (ctr, n=2; FA and FA+BMSC, n=4). Data expressed as the mean of 2- $\Delta\Delta$ Ct $\pm$ SD.



DISCUSSION

Despite recent advances in the treatment of acute nephropathies, AKI continues to burden hospitals with high mortality rates and patient therapy costs. In search for more efficient therapies, increased interest has appeared in cell therapies towards the treatment of acute kidney diseases.

Mesenchymal stem cells (MSC) are progenitor cells found in a diversity of regions like blood, bone marrow, umbilical cord, dental pulp and adipose tissue.⁶ They possess considerable capacity for autorenovation and cellular differentiation. In addition, MSC are known for their important immunomodulatory properties,² possessing modulatory functions in vitro and in vivo, and therefore, being studied extensively as therapeutic tools in mediating pathologies of inflammatory origin.

FA also known as vitamin B9 is traditionally used in dietary fortification, prevention of prenatal neural development abnormalities and treatment of anemia and other pathologies such

as Alzheimer and Parkinson.^{7,8} Despite these effects, high doses of FA are known by inducing a significant kidney damage in mice and it has been used extensively as an experimental model of drug-induced nephropathy.^{4,5}

Initial results showed that BMSC treatment was efficient in mediating FA- induced kidney function impairment, as demonstrated by reduced serum urea and creatinine levels. This protection was corroborated by histopathology analyses which indicated lower scores of ATN and higher levels of tissue repair. These results confirm the protective functional benefits also seen in the stem cell treatment of other nephrotoxic injuries.^{9,10}

There are many mechanisms through which MSC mediate injury amelioration. One possibility suggests that transdifferentiation or stem cell fusion^{11,12} would allow the injury protection through the substitution/recovery of damaged cells. However, this phenomenon is rarely described in kidneys with studies involving stem cell treatment, and its actual contribution in injury protection is highly questionable.^{9,13} In search to clarify the mechanism for the BMSCs-mediated protection of FA nephropathy, our group focused in stem cell's paracrine immunomodulatory properties. Because increased amounts of inflammatory mediators activate the immune system and consequently amplifying tissue oxidative stress and secondary tissue injury, a controlled inflammatory process is considered beneficial and it is the aim of most therapies involving tissue injury. RT-PCR experiments showed a lower proinflammatory

profile in kidneys of BMSC-treated animals, seen by decreased levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β mRNA in comparison to animals treated only with FA. This indicated that MSC protected kidneys by partially regulating tissue inflammation, and it has confirmed other studies which also describe a decrease in the expression of proinflammatory molecules after MSC treatment.^{3,14} Our study also showed that BMSC treatment increased kidney cell turnover. Since the cell death is a common characteristic for acute kidney injury, 15 higher proliferation rates induced by BMSC increase the turnover of injured cells to healthy ones, and consequently help to restore tissue homeostasis.^{3,16} Therefore, our results also indicate that BMSC may accelerate tissue repairing through an increase in cell turnover.

CONCLUSION

In summary, our study found a protective role for BMSC treatment over folic acid-induced acute kidney injury. This therapy is correlated to kidney function and tissue structure preservation. These findings also correlated with a reduction in inflammatory mRNA, which indicates an immunomodulatory action and stimulates tissue regeneration. Therefore, we have concluded that BMSC treatment is a promising tool towards nephrotoxic acute kidney injury, and should be studied in view of future clinical use.

RESUMO

A insuficiência renal aguda (IRA) constitui uma síndrome responsável por grande parte das falências renais agudas e continua hoje associada a um alto índice de mortalidade. Desencadeada principalmente por processos de isquemia e reperfusão no órgão e drogas nefrotóxicas, essa síndrome é caracterizada fisiologicamente por uma perda repentina da função do órgão e dano estrutural histológico denominado necrose tubular aguda. Diante da busca por terapias mais eficazes, tem-se focado intensamente na possibilidade do uso de células-tronco na lesão renal. As células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea, em especial, têm recebido grande atenção devido às suas propriedades imunomoduladoras, e seus mecanismos terapêuticos estão sendo intensamente estudados na literatura. **Objetivo:** Em vista de estudos recentes, nosso trabalho buscou maior compreensão sobre o papel das células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea em um modelo murino de lesão renal aguda induzida por ácido fólico. **Métodos:** Camundongos C57Bl/6 (oito semanas) foram submetidos a lesão renal aguda por ácido fólico (200mg/kg de massa corporal) administrado intraperitonealmente. Após 24 horas, os animais receberam células-tronco mesenquimais ($5 \cdot 10^5$ células por animal) via injeção intravenosa pelo plexo retro-orbital. Os animais foram sacrificados após 24 horas e amostras de sangue e rins foram colhidas para análise. **Resultados:** Os animais tratados com células apresentaram melhora funcional representada pela redução dos níveis de creatinina e uréia sérica em camundongos C57Bl/6j, em comparação a animais tratados somente com AF. Esses dados correlacionam-se com a menor expressão do RNAm de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α , IL-6 e IL-1 β nos rins dos animais tratados com células. Ainda, os animais tratados com células demonstraram níveis de proliferação celular por imunohistoquímica de PCNA e tendência a uma maior razão de mRNA de Bcl2/Bax, indicando maiores índices de regeneração tecidual e proteção contra apoptose induzida por lesão. **Conclusão:** Esses resultados indicam que as células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea são uma ferramenta importante no tratamento à lesão renal nefrotóxica.

Descritores: Lesão Renal Aguda; Células-Tronco Mesenquimais; Imunomodulação; Ácido Fólico.

REFERÊNCIAS:

1. Mehta RL, Pascual MT, Soroko S, Savage BR, Himmelfarb J, Ikizler TA, et al. Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience. *Kidney Int.* 2004 Oct;66(4):1613-21.
2. Stagg J. Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin. *Tissue Antigens.* 2007 Jan;69(1):1-9.
3. Togel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Jul;289(1):F31-42.
4. Szczypka MS, Westover AJ, Clouthier SG, Ferrara JL, Humes HD. Rare incorporation of bone marrow-derived cells into kidney after folic acid-induced injury. *Stem Cells.* 2005;23(1):44-54.
5. Wan B, Hao L, Qiu Y, Sun Z, Cao Q, Zhang Y, et al. Blocking tumor necrosis factor-alpha inhibits folic acid-induced acute renal failure. *Exp Mol Pathol.* 2006 Dec;81(3):211-6.
6. Meirelles Lda S, Nardi NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci.* 2009;14:4281-98.
7. Kronenberg G, Colla M, Endres M. Folic acid, neurodegenerative and neuropsychiatric disease. *Curr Mol Med.* 2009 Apr;9(3):315-23.
8. Muller T. Role of homocysteine in the treatment of Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother.* 2008 Jun;8(6):957-67.
9. Kim JH, Park DJ, Yun JC, Jung MH, Yeo HD, Kim HJ, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells protect kidneys from cisplatin nephrotoxicity in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 May;302(9):F1141-50.
10. Hauser PV, De Fazio R, Bruno S, Sdei S, Grange C, Bussolati B, et al. Stem cells derived from human amniotic fluid contribute to acute kidney injury recovery. *Am J Pathol.* 2010 Oct;177(4):2011-21.
11. Strassburg S, Hodson NW, Hill PI, Richardson SM, Hoyland JA. Bi-directional exchange of membrane components occurs during co-culture of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells. *PLoS One.* 2012 Mar 15;7(3):e33739.
12. Beitnes JO, Oie E, Shahdadfar A, Karlsen T, Muller RM, Aakhus S, et al. Intramyocardial injections of human mesenchymal stem cells following acute myocardial infarction modulate scar formation and improve left ventricular function. *Cell Transplant.* 2012;21(8):1697-709.
13. Fang TC, Alison MR, Cook HT, Jeffery R, Wright NA, Poulosom R. Proliferation of bone marrow-derived cells contributes to regeneration after folic acid-induced acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Jun;16(6):1723-32.
14. Humphreys BD, Bonventre JV. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *Annu Rev Med.* 2008;59:311-25.
15. Zhou D, Li Y, Lin L, Zhou L, Igarashi P, Liu Y. Tubule-specific ablation of endogenous beta-catenin aggravates acute kidney injury in mice. *Kidney Int.* 2012 Sep;82(5):537-47.
16. Cantaluppi V, Gatti S, Medica D, Figliolini F, Bruno S, Deregibus MC, et al. Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int.* 2012 Aug;82(4):412-27.

MÉTODOS MOLECULARES NO DIAGNÓSTICO NÃO INVASIVO DA REJEIÇÃO AGUDA EM TRANSPLANTES RENAIIS.

Molecular methods in non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants.

Gabriel Joelsons¹, Tuany Domenico¹, Roberto Ceratti Manfro^{1,2}

RESUMO

O transplante renal é atualmente o tratamento de escolha para pacientes com doença renal crônica em estágio terminal. Dentre as complicações decorrentes do transplante, a rejeição aguda é considerada uma das principais, sendo a biópsia o padrão ouro para seu diagnóstico. Por ser um procedimento invasivo e potencialmente deletério, buscaram-se novos marcadores para o diagnóstico desse quadro. As ferramentas diagnósticas não invasivas apresentam diversas vantagens, que incluem principalmente a possibilidade de uso frequente e sequencial, facilitando a avaliação do estado imune do receptor. Nesta revisão, apresentam-se os métodos e as vantagens dos mesmos que estão sendo empregados atualmente na pesquisa em transplantes renais, a reação em cadeia da polimerase em tempo real, os micro-arranjos de DNA e mais recentemente os micro-RNAs. Existe a expectativa de que os microarranjos e micro-RNAs venham a desempenhar um papel crucial no transplante de órgãos em assuntos relacionados à identificação de mecanismos moleculares de rejeição aguda, injúria crônica, efeito de toxicidade das drogas imunossupressoras e tolerância. O desenvolvimento de técnicas moleculares capazes de fornecer um painel da atividade imunológica responsável pela agressão ao enxerto de forma não invasiva sugere a possibilidade futura de otimização e individualização do tratamento imunossupressor. Para a realização deste trabalho foi utilizada a busca em bases de dados internacionais (PUBMED, Web of Knowledge) através dos descritores “Transplante de Rim”, “Rejeição de Enxerto” e “Técnicas e Procedimentos Diagnósticos” e foram selecionados apenas estudos de periódicos indexados sendo referidos os estudos de maior importância clínica ou histórica na área.

Descritores: Transplante de Rim; Rejeição de Enxerto; Técnicas e Procedimentos Diagnósticos.

INTRODUÇÃO

O transplante renal é atualmente o tratamento de escolha para pacientes com doença renal crônica (DRC) em estágio terminal. Entretanto, pacientes a ele submetidos permanecem acometidos por episódios de disfunção aguda e crônica dos enxertos, as quais têm diversas etiologias, sendo que os episódios de rejeição aguda (RA) são considerados uma das principais complicações e podem ter impacto na função e na sobrevida dos enxertos.¹ O diagnóstico da rejeição aguda, assim como dessas outras causas de disfunção é baseado fundamentalmente nos resultados da análise histológica do tecido renal obtido por biópsia. Entretanto, existem diversos problemas com esse método, por exemplo, a infecção pelo vírus poliomax, que pode apresentar um quadro histológico muito semelhante ao da rejeição aguda e, muitas vezes, é difícil diferenciar a rejeição crônica da nefrotoxicidade por inibidores da calcineurina. Adicionalmente, a biópsia renal é um método invasivo, caro, com problemas de representatividade, variabilidade de interpretação e associado a complicações que podem ser bastante sérias.²

Os métodos auxiliares ao diagnóstico da RA são igualmente pouco precisos. As dosagens de creatinina, níveis séricos de fármacos imunossupressores e métodos de imagem padecem de

Instituição:

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

² Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, RS, Brasil.

Correspondência:

Roberto Ceratti Manfro

Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Av. Ramiro Barcelos 2350 – CEP 90040-003, Porto Alegre/RS, Brasil

Fax: 55 51 3359-8121

E-mail: rmanfro@hcpa.ufrgs.br

Recebido em: 04/06/2012

Aceito em: 28/06/2012

falta de acurácia adequada para o diagnóstico das disfunções de causa parenquimatosa. Isso evidencia a clara necessidade do desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, preferencialmente não invasivos, que possam ser utilizados como biomarcadores dos processos inflamatórios, tóxicos e fibróticos que acometem enxertos renais, auxiliando ou até mesmo substituindo o diagnóstico histopatológico.

Novos biomarcadores em transplante renal

Um biomarcador é definido como uma substância ou característica usada como indicador do estado biológico normal ou patológico, que pode ser objetivamente medida, e que reflete a ação das intervenções terapêuticas sobre a atividade da doença.³ Existem diversos tipos de biomarcadores que diferem predominantemente em seu objetivo, podendo ser: (a) preditivos, para a identificação do risco de doença; (b) de rastreamento: para a identificação de doença sub-clínica; (c) diagnósticos para o reconhecimento de doença; (d) de estadiamento: para a categorização da gravidade da doença; (e) de prognóstico utilizados para a predição do curso da doença ou da resposta terapêutica.⁴

Na prática dos transplantes renais, os biomarcadores são usados corriqueiramente para o acompanhamento da evolução do enxerto. Utilizamos marcadores de função e agressão ao enxerto, como a creatinina, proteinúria, métodos de imagem, anticorpos anti-HLA e biópsias protocolares ou de vigilância. Entretanto, esses biomarcadores utilizados na clínica apresentam deficiências tais como, falta de sensibilidade, serem tardios, invasivos e algumas vezes caros.

Adicionalmente, há situações nas quais existe necessidade de maior refinamento diagnóstico, como os enxertos sob risco aumentado de rejeições, os estados de imunossupressão excessiva, a ocorrência de fibrose tecidual, propiciar segurança da minimização e conversões da terapia imunossupressora e a identificação do desenvolvimento de tolerância aos aloantígenos. Atualmente, o processo de desenvolvimento e validação de biomarcadores é bastante complexo e visa assegurar que o teste em questão tenha utilidade clínica.⁵ Vide Figura 1.

Figura 1. Etapas de desenvolvimento e validação de biomarcadores

1. Seleção do biomarcador (ou conjunto de biomarcadores)
2. Coorte de validação
 - Estudo piloto
 - Validação metodológica
 - Validação clínica
3. Coorte de aprendizado
4. Coorte de confirmação
5. Confirmações por outros grupos
6. Ensaios guiados (multicêntricos)
7. Impacto nos resultados clínicos

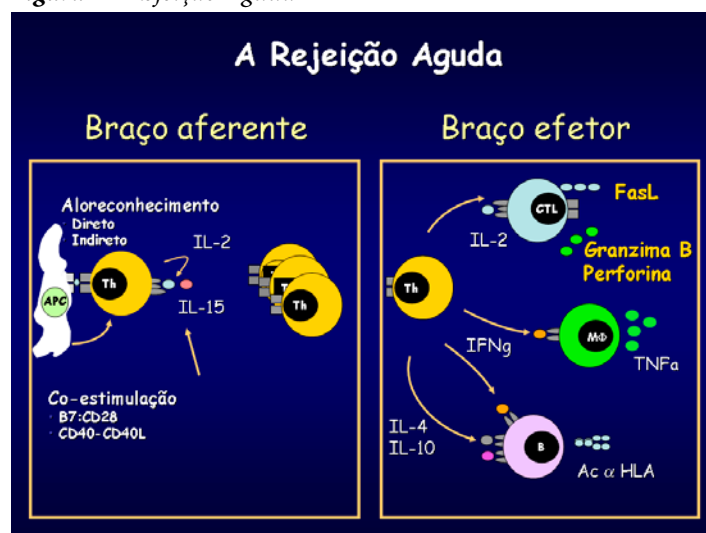
Neste trabalho, revisaremos o estado atual do desenvolvimento dos biomarcadores moleculares em desenvolvimento para uso em transplantes de órgãos sólidos, em especial os transplantes renais.

Rejeição aguda dos enxertos renais.

A RA clássica é caracterizada pela rápida diminuição da função do enxerto, que é atacado pelo sistema imune do hospedeiro, o qual reconhece e ataca antígenos presentes no órgão do doador. Conforme demonstrado de forma sucinta na Figura 2, o processo de rejeição inicia-se pelo reconhecimento dos antígenos de

histocompatibilidade (aloantígenos) do doador pelos linfócitos T do receptor.⁶ O reconhecimento ocorre em órgãos linfóides secundários, onde células apresentadoras de antígeno (monócitos/macrófagos, células dendríticas e células B) estimulam e ativam linfócitos T, que entram em expansão clonal e migram para o enxerto onde irão exercer sua função efetora. No mecanismo de rejeição celular, após a estimulação dos linfócitos, pela interação do TCR com o Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) juntamente com moléculas de adesão e co-estimulação, os complexos TCR/CD3 e CD4 ou CD8 tornam-se fisicamente associados e ativam várias enzimas intracelulares denominadas tirosino-quinases. Estas elevam a concentração de cálcio intracelular e ativam várias proteínas citoplasmáticas regulatórias denominadas fatores de transcrição. Entre esses fatores, destacam-se NF- κ B, Oct-1 e NFAT (fator nuclear de células T ativadas), que se ligam a regiões regulatórias dos genes de várias citocinas como interleucinas IL-2 e IL-4, interferon- γ e TNF- α . A ativação da imunidade celular seguida da resposta do tipo hipersensibilidade tardia com a ativação de monócitos/macrófagos e linfócitos citotóxicos parece ser o mecanismo final da agressão celular ao enxerto.

Figura 2 - Rejeição Aguda



Os linfócitos T CD8+, ou citotóxicos, são os principais efetores do reconhecimento e ataque das células-alvo. Os mediadores citolíticos melhor descritos são a perforina e a granzima, que ficam estocadas no citoplasma desses linfócitos, em grânulos semelhantes aos lisossomos e, quando as células são ativadas, migram para a membrana citoplasmática e fundem-se a ela, liberando os grânulos em direção à célula-alvo. Em decorrência do ataque citolítico, a célula alvo pode morrer por necrose (caracterizada por ruptura da membrana plasmática e destruição das organelas) ou apoptose (caracterizada por condensação da cromatina, fragmentação do DNA e bolhas de membrana com citoplasma condensado). Outra via de ataque citotóxico utilizada pelas células T CD8+ é a indução de morte celular via interação Fas/Fas ligante, que leva à apoptose das células-alvo.^{7,8} Outros mecanismos ocorrem na chamada rejeição humoral, ou mediada por anticorpos. De forma resumida, nesse tipo de rejeição ocorre ativação de linfócitos B que se diferenciam em plasmócitos, via estimulação por mediadores solúveis (interleucinas) produzidos por linfócitos T CD4+. Os anticorpos reconhecem sequências específicas de aminoácidos

presentes em antígenos HLA expressos na superfície das células endoteliais do enxerto, ativam a cascata do complemento e levam assim a dano da microcirculação do enxerto.^{9,10}

Mais recentemente foi demonstrado que a injúria causada pelo processo de isquemia e reperfusão no enxerto renal conduz à ativação do sistema imune, levando a processos capazes de afetar a integridade celular, acreditando ser um dos principais responsáveis pela lesão inicial do enxerto e por mediar, em longo prazo mudanças estruturais, incluindo a fibrose intersticial.¹¹ A Interleucina (IL)-17 foi originalmente descrita e clonada por Rouvier et al. e, subsequentemente, renomeada para IL-17A.¹² Essa fração é considerada o protótipo da família das IL-17. A identificação dessa nova família de citocinas designou uma nova linhagem celular T CD4 efetora, as Th17. Essas células produzem principalmente a IL-17A e a IL-17F, enquanto as demais células da resposta imune inata produzem os outros membros da família. Essa linhagem parece ter evoluído como um braço do sistema imune adaptativo especializado para uma proteção reforçada contra agentes não cobertos completamente pelas células Th1 ou Th2.^{13,14}

A IL-17 é uma citocina pleiotrópica com múltiplas funções, entre elas direcionar diversos tipos celulares como as células endoteliais e epiteliais, fibroblastos, macrófagos e outras células que promovem inflamação tecidual por diferentes caminhos, além de coordenar a inflamação do tecido, induzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias (tais como IL-6 e TNF), quimiocinas (tais como KC, MCP-1 e MIP-2) e metaloproteases de matriz, que intervêm na infiltração e destruição dos tecidos;¹⁰ além de mediar o recrutamento de neutrófilos, a IL-17 também promove a granulocitopoiese através da indução do fator de crescimento de colônia granulocítica (G-CSF) e fator de célula tronco (SCF), potencializando também a fagocitose e a citotoxicidade dos neutrófilos.¹⁵

Estudos indicam que o mRNA IL17 e a proteína aumentam em episódios de rejeição aguda em pacientes transplantados renais, hepáticos e pulmonares. Caldwell e colaboradores mostraram que a lesão de reperfusão de isquemia hepática que contribui para o aumento da imunidade específica ao aloantígeno por diversos mecanismos, conduz também ao aumento de células Th17.¹⁶ Estudos em modelos de murinos que foram induzidos à rejeição aguda renal identificaram uma elevação dos níveis de mRNA da IL-17 e consequentemente sua proteína dois dias pós-transplante, também detectado em amostras de urina e tecidos de pacientes com rejeição renal aguda.¹⁷

Caracteristicamente, o diagnóstico de rejeição aguda em enxertos renais é baseado na identificação anatomopatológica de infiltrados de células mononucleares em fragmentos renais obtidos por biópsias de enxertos com disfunção. O diagnóstico é feito através da padronização por um consenso internacional de nomenclaturas e critérios específicos para a caracterização histológica de rejeição do órgão, denominado classificação Banff,¹⁸ no qual a rejeição mediada por células T ou a rejeição mediada por anticorpos é diagnosticada com base em regras empíricas e as lesões são graduadas de maneira semi-quantitativa. Essa análise histológica, a partir de uma biópsia renal, é considerada o “padrão-ouro” no diagnóstico de rejeição do enxerto. Porém, uma vez que essa metodologia é baseada na remoção de fragmentos corticais de natureza focal intra-enxerto, essa não pode ser considerada uma técnica muito sensível, além de estar associada às complicações como sangramento, fístula arteriovenosa e perda do enxerto; também

é um método bastante agressivo e dispendioso.

O diagnóstico histopatológico da rejeição correlaciona-se com a resposta ao seu tratamento e com os desfechos do enxerto. Porém, sua acurácia nunca pôde ser validada devido ao fato de não haver outra metodologia independente da avaliação da existência de rejeição.^{2,19} Existem diversos aspectos negativos dessa técnica diagnóstica. Entre eles, destacam-se: (a) gradação das lesões feita de maneira arbitrária; (b) variação de representatividade entre fragmentos das punções de biópsia renal; (c) concordância entre diferentes avaliadores de 10-50% em relação à gradação das lesões e de 45-70% relacionado ao diagnóstico; (d) reprodutibilidade intra-observador de aproximadamente 80-85%.²⁰

A rejeição aguda subclínica (RASC) é diagnosticada por biópsias protocolares em enxertos com função estável. A exemplo do que vem ocorrendo com as rejeições agudas clinicamente manifestas, as RASC vêm apresentando incidência decrescente à medida que regimes imunossupressores mais potentes são utilizados.²¹ Nessa situação, por definição, os enxertos têm função estável e ocorre a presença de infiltrados linfo-monocitários característicos de rejeição aguda.²²

Médicos com experiência e conhecimento no uso clínico das drogas imunossupressoras e que sejam capazes de manejar adequadamente os atuais métodos diagnósticos são, em geral, capazes de reconhecer e tratar os eventos decorrentes da imunossupressão insuficiente, a rejeição aguda, ou da imunossupressão excessiva, a nefrotoxicidade e as infecções. O exercício da prática clínica, assim como o que foi aprendido em modelos experimentais, comprova a noção empírica de que as rejeições devem ser diagnosticadas com a maior precocidade possível e que essa precocidade tem implicação na reversibilidade do processo de rejeição. No entanto, são comuns situações de curso silencioso, nas quais faltam métodos diagnósticos apropriados e que, portanto, cursam sem diagnóstico, muitas vezes levando a processos irreversíveis. A crescente eficácia das medicações imunossupressoras evidenciou duas condições de importante impacto negativo na sobrevida dos transplantes renais, quais sejam o aumento significativo nos casos de nefropatia pelo vírus poliovírus²³ e a nefrotoxicidade pelos inibidores da calcineurina.²⁴ Por conseguinte, a comunidade de transplante está atualmente direcionada a desenvolver estratégias seguras, em propiciar baixa incidência de rejeição, de nefrotoxicidade e de infecções virais em um balanço entre a eficácia da imunossupressão e seus efeitos colaterais. Em paralelo, busca-se alcançar a situação ideal, ou seja, o desenvolvimento de tolerância aos antígenos do transplante.

Assim sendo, levando-se em consideração as limitações do método “padrão-ouro” atual e a necessidade de métodos diagnósticos acurados que propiciem diagnósticos precoces, preconiza-se que os ensaios não invasivos serão capazes de se tornar ferramentas para monitorização frequente e efetiva no período pós-transplante. Idealmente, esses ensaios devem ser capazes de detectar: [1] inflamação subclínica do enxerto; [2] fibrose intersticial e atrofia tubular subclínicas; [3] glomerulopatia do transplante subclínico e [4] agressão mediada por anticorpos. A base lógica para a detecção desses processos em estágio subclínico serve para a intervenção prévia ao dano causal da perda crônica de função e/ou insuficiência do enxerto.²⁵

Métodos Moleculares no Diagnóstico da Rejeição Aguda

O sistema histopatológico de uso corrente, a classificação Banff, possui critérios que se correlacionam com desfechos,

porém as decisões são arbitrárias e devem ser revistas por novos métodos de avaliação transcripcional, presentemente denominada transcriptômica, que dessa forma representa referencial independente.²⁶ A aplicação clínica das análises moleculares é também pertinente para que o entendimento de todo o transcriptoma forneça conhecimentos mais aprofundados das bases mecânicas das disfunções dos enxertos, da rejeição e de possíveis estados de tolerância. Estratégias complementares utilizando-se biomarcadores baseados na amplificação de ácidos nucleicos devem possibilitar no futuro o desenvolvimento do manuseio personalizado tanto do ponto de vista diagnóstico como de orientação terapêutica.²⁷

Em etapas subsequentes, essas ferramentas deverão identificar condições patológicas sem a necessidade de procedimentos invasivos e assim propiciar uma avaliação confiável do estado imune do receptor, permitindo a individualização da terapia imunossupressora. O aperfeiçoamento do entendimento dos mecanismos da resposta aloimune levou a que fossem testados marcadores moleculares de genes candidatos para a avaliação do transplantado renal. Posteriormente, novos estudos focaram em padrões de expressão em testes não invasivos de fluidos biológicos de acesso facilitado, como urina e sangue periférico.²⁸⁻³¹

As ferramentas diagnósticas não invasivas apresentam diversas vantagens, que incluem principalmente a possibilidade de uso frequente e sequencial, facilitando a avaliação do estado imune do receptor. Assim sendo, os parâmetros moleculares poderão vir a servir para direcionar a minimização da imunossupressão e sua individualização. Abordagens moleculares que incorporem um conjunto de marcadores podem vir a funcionar não apenas como uma metodologia substitutiva para o procedimento invasivo da biópsia tecidual, como também poderá fornecer informações

preditivas, diagnósticas e prognósticas e prover a compreensão da fisiopatologia das diferentes causas de disfunção do enxerto.³²

Adicionalmente, conforme já demonstrado em estudos clínicos, as avaliações moleculares propiciam a vantagem inequívoca de detectar o processo de agressão em sua fase de montagem, antes que tenha ocorrido deterioração funcional. Da mesma forma, as perturbações moleculares devem também preceder as alterações histológicas.^{25,32} Embora essa última afirmação possa ser vista como uma vantagem, ela é também um empecilho à validação adequada dos testes moleculares no cenário clínico em que a biópsia é usada como o padrão-ouro.

Os métodos moleculares surgiram como potencialmente adequados para o diagnóstico de disfunções dos enxertos renais. Nas fases iniciais do desenvolvimento clínico dos testes moleculares, em especial da reação em cadeia da polimerase em tempo-real (RT-PCR), ela foi utilizada em tecido de aloenxertos, sendo posteriormente aplicados em amostras não invasivas, sangue periférico e células do sedimento urinário. Os métodos atualmente empregados na pesquisa em transplantes renais são a RT-PCR, os micro-arranjos de DNA e mais recentemente os micro-RNAs.

Diversos estudos demonstraram a utilidade da mensuração da expressão gênica de genes relacionados ao ataque citolítico ao enxerto em tecido renal,²⁸ células do sangue periférico²⁹ e células do sedimento urinário.^{30,31} Mais recentemente, alguns estudos utilizando a técnica de microarranjos também foram capazes de prever episódios de rejeição aguda baseados em padrões de expressão gênica em relação a pacientes normais e com outras causas de disfunção.^{26,32,33} Assim sendo, fica claro que até o presente momento, os métodos moleculares foram testados predominantemente para o diagnóstico de RA de transplantes renais. (Figura 3)

Figura 3 - Principais metodologias aplicadas

Autor (ref)	Ano	n	Amostras	Metodologia	Marcadores
Vasconcellos (29)	1998	31/25	Tecido e SP	PCR competitiva	Perforina, Granzima B e FasL
Van Kooten (17)	1998	08/jun	Tecido	PCR competitiva	IL-17
Li (30)	2001	24/22	Urina	PCR competitiva	Perforina, Granzima B
Sarwal (46)	2003	67/50	Tecido	Microarranjos	n/a
Flechner (32)	2004	44/44	Tecido e SP	Microarranjos	n/a
Dias (38)	2004	35/35	Tecido	RT-PCR	Perforina, Granzima B, FasL
Muthukumar (8)	2005	83/83	Urina	RT-PCR	FOXP3, CD25, CD3 e Perforina
Renesto (31)	2007	72/72	Urina	RT-PCR	TIM3 e IFN-gamma
Brouard (33)	2007	91/91	SP	Microarranjos	n/a
Bunnag (42)	2008	83/83	Tecido	RT-PCR	FOXP3
Aquino-Dias (28)	2008	48/35	Tecido, SP e Urina	RT-PCR	Perforina, Granzima B, FasL, PI9 e FOXP3
Manfro (37)	2008	160/115	Tecido, SP e Urina	RT-PCR	TIM3
Sui (55)	2008	03/mar	Tecido	microarranjos, RT-PCR	20 miRNAs diferentes
Reeve (26)	2009	186/143	Tecido	Microarranjos	n/a
Anglicheau (52)	2009	33/32	Tecido e SP	microarranjos, RT-PCR	miR-142-5p, miR-155, miR-223
Newell (40)	2010	100/100	SP e Urina	microarranjos, RT-PCR	Granzima B, Perforina, PI9, FoxP3, CTLA4, TGFB, CTGF, IP10, MIG e CXCR3
Viklicky (43)	2010	64/64	Tecido	RT-PCR	TGF-B, TNF-a, MCP1, RANTES, FOXP3, Granzima B, Perforina e HMOX1 e outros
Lorenzen (58)	2011	88/81	Urina	RT-PCR	miR-10a, miR-10b, miR-210
Anglicheau (44)	2012	114/114	Urina	RT-PCR	Vimentina, HGF, Fibronectina, Perforina, TGF-B1, TIMP-1, Granzima B e outros

PCR em tempo real

PCR em tempo real é uma reação quantitativa altamente sensível e que permite a quantificação de transcritos raros e de pequenas variações na expressão gênica. O sistema da PCR em tempo real é baseado na detecção e quantificação de um repórter fluorescente, cuja quantidade aumenta de forma diretamente proporcional às quantidades do produto molecular amplificado na reação. Pelo registro da quantidade de fluorescência emitida a cada ciclo é possível monitorar a reação da RT-PCR durante sua fase exponencial, onde o aumento significativo dos produtos amplificados correlaciona-se com a quantidade inicial do produto (template) específico, marcador de um gene em particular, a ser avaliado.³⁴

A técnica quantitativa eliminou a variabilidade inerente à técnica da PCR convencional semi-quantitativa e permitiu a quantificação confiável de produtos de PCR na rotina clínica. Atualmente, essa técnica é comumente utilizada para determinar a expressão gênica de mRNAs e seus níveis de expressão. As análises podem ser absolutas, como no número de cópias de mRNA pela comparação a uma curva padrão, ou relativas a um calibrador pela análise por curva padrão ou pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.³⁵

Diversos mecanismos celulares que dizem respeito à sobrevivência, crescimento e diferenciação são refletidos por padrões alterados de expressão gênica e a habilidade de quantificar níveis transcripcionais de genes específicos é de fundamental importância para qualquer pesquisa sobre a expressão gênica. A PCR em tempo real (RT-PCR) é um método de amplificação enzimática *in vitro* de seqüências definidas de cDNA, podendo ser utilizada para comparar níveis de mRNA em diferentes populações ou amostras para caracterizar padrões de expressão de mRNAs em patologias específicas. A PCR convencional não proporciona resultados quantitativos, exceto na modalidade denominada PCR competitiva, trabalhosa, artesanal e de difícil reprodutibilidade.³⁶

O primeiro estudo a avaliar a expressão gênica em amostras não invasivas, no caso o sangue periférico foi de Vasconcellos e colaboradores, em 1998. Nesse estudo, correlacionou-se a expressão gênica de transcritos de mRNA pela técnica de PCR competitiva no tecido e sangue periférico, tendo sido analisadas as expressões dos genes Perforina, Granzima B e Fas-Ligante. Foi encontrado que a expressão gênica dessas moléculas que codificam o ataque citolítico nas células mononucleares do sangue periférico correlaciona-se com sua expressão *intra*-enxerto. Adicionalmente, encontrou-se elevada acurácia diagnóstica para o evento rejeição aguda pela análise das quantificações desses genes, especialmente nas análises combinadas.²⁹

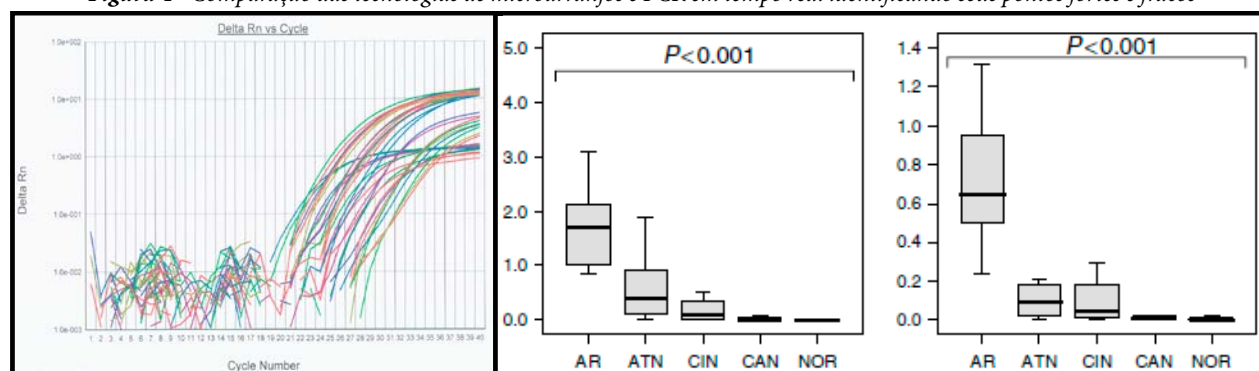
As análises em urina foram inicialmente realizadas por Li e colaboradores, que avaliaram quantificações mRNA dos genes da Perforina e Granzima B extraído de células do sedimento

urinário, correlacionando-as às quantificações obtidas a partir do tecido obtido por biópsias renais, novamente utilizando a técnica de PCR competitiva. Os autores encontraram que níveis elevados dos transcritos desses genes na urina foram capazes de diferenciar pacientes normais de pacientes com rejeição aguda, propiciando assim esse diagnóstico de forma não invasiva.³⁰ Posteriormente, em trabalho oriundo do mesmo grupo, Muthukumar e colaboradores, também avaliando o mRNA extraído de células do sedimento urinário, dessa vez pela técnica de RT-PCR, demonstraram elevada expressão do gene Forkhead Box 3 (FOXP3), e foram capazes de distinguir pacientes com rejeição aguda de pacientes com doença crônica do enxerto renal e de biópsias normais. Interessantemente nesse estudo, a análise dos níveis de mRNA de FOXP3 foi capaz de identificar os pacientes em risco de perda de enxerto nos seis meses posteriores ao episódio de rejeição aguda.⁸

Mais recentemente, Renesto e colaboradores descreveram a utilização de uma molécula especificamente expressa em células Th1 diferenciadas chamada TIM3 como marcadora de rejeição aguda a partir do RNA extraído de células do sedimento urinário. Níveis elevados de TIM3 foram encontrados em pacientes com RA, comparados a outras condições clínicas, mais uma vez sugerindo o uso dessa metodologia como uma ferramenta não invasiva promissora para avaliação das disfunções de enxertos renais.³¹ Essa mesma molécula foi estudada de forma pareada em tecido, células do sedimento urinário e do sangue periférico por Manfro e colaboradores em pacientes com DGF e com disfunção aguda de enxertos renais. Nos casos de DGF, a avaliação dos parâmetros diagnósticos para RA apresentou acurácia de 100% nos dois compartimentos periféricos na diferenciação de necrose tubular aguda (NTA). Nos casos de disfunção aguda do enxerto, as acurácias ficaram em torno de 90% na diferenciação entre rejeição aguda, nefrotoxicidade por inibidores de calcineurina, IFTA e rins normais.³⁷

Aquino-Dias e colaboradores analisaram moléculas de ataque citolítico como a Perforina, Granzima B, Fas-ligante e uma serpin proteínase - PI-9 além do gene de células T-regulatórias - FOXP3. Esse estudo avaliou a utilidade dessa metodologia não invasiva em pacientes acometidos por DGF e disfunção aguda do enxerto. Os resultados evidenciaram expressão aumentada dessas moléculas nos grupos de pacientes com rejeição aguda e no grupo com rejeição aguda superposta à NTA, diferenciando-as de pacientes com NTA pura nefrotoxicidade por IC, IFTA e pacientes com biópsias protocolares normais. Como pacientes em DGF não têm atualmente um marcador não invasivo acurado de rejeição aguda, essa abordagem, se adequadamente confirmada em estudos longitudinais, será de grande utilidade clínica.²⁸ Na figura 4, é mostrado o gráfico de ampliação do mRNA e as quantificações para o gene da Perforina em uma porção dos pacientes arrolados nesse último estudo descrito.

Figura 4 - Comparação das tecnologias de microarranjos e PCR em tempo real identificando seus pontos fortes e fracos



Interessantemente, os estudos de marcadores moleculares demonstram que, nas duas condições RA e RASC, ocorre expressão aumentada dos mesmos genes relacionados ao ataque citolítico, sendo que na RA, esses mRNAs estão presentes em maior quantidade.³⁸

Relatos preliminares de dois grandes consórcios internacionais, o Immune Tolerance Network (ITN) e Indexes of Tolerance (IOT) da União Europeia evidenciaram observações similares em relação à hiperexpressão de genes de células B em pacientes que desenvolveram tolerância, comparados com pacientes sob regime convencional de imunossupressão.^{39,40} Na mesma direção, a baixa expressão de mRNA do marcador CD20 de células B foi observada em enxertos que perderam função como consequência de rejeição por células T ou mediada por anticorpos, se comparadas aos indivíduos/enxertos que tiveram um curso favorável.⁴

Dentre candidatos a potenciais marcadores, estudos recentes têm sugerido a avaliação de um subgrupo de células T regulatórias (Tregs) chamado FoxP3 em nível protéico e transcripcional diretamente do enxerto e sua correlação com outros compartimentos como sangue periférico e urina. Estudos como o de Bestard et al.,⁴¹ demonstraram que sob baixas condições inflamatórias, as Tregs parecem ter impacto favorável, exercendo papel regulatório nos infiltrados mononucleares intra-enxerto. Reciprocamente, quando a rejeição está se estabelecendo e, por conseguinte um importante processo inflamatório instaura-se no enxerto, esse subgrupo de células T só seria capaz de contrabalançar as funções efetoras destrutivas das células T citotóxicas ao invés de desempenhar uma função preventiva ou pró-tolerogênica.⁴²

Nas rejeições mediadas por anticorpos (RMA) parece haver menos componentes regulatórios (Tregs e células B) do que em rejeições mediadas por células T. Em estudo de Viklicky et al, pacientes que perderam o enxerto após RMA apresentaram uma ausência ainda maior de regulação (baixa expressão de FoxP3, RANTES, TGF-B1 e CD20). O melhor preditor de perda de enxerto dentro de 12 meses foi definido por baixa expressão de TGF-B1 e CD20.⁴³

Avaliando fibrose tubulointersticial, Anglicheau e colaboradores avaliaram os níveis de mRNA de diversas moléculas na urina de pacientes com diagnóstico histológico de fibrose e de pacientes com biópsias normais. Um modelo composto pelos níveis de mRNA de quatro genes (vimentina, NKCC2, E-Caderina e 18S ribossomal) obteve 77% de sensibilidade e 87% de especificidade no diagnóstico de fibrose, reforçando a ideia da utilização dessa técnica como ferramenta diagnóstica não invasiva das agressões ao enxerto renal.⁴⁴

Esses dados sugerem que a falta de uma contra-regulação adequada possa ser um elemento chave na patogênese de RMAs severas que resultam em perda do enxerto.⁴

Microarranjos (Microarrays)

A utilização de microarranjos de DNA na busca da identificação de uma “assinatura molecular” para gerar perfis quantitativos de expressão de mRNA, permitindo a mensuração detalhada da expressão gênica em escala global tem sido amplamente empregada na investigação do complexo processo imunológico que sucede o transplante renal desde 2001.⁴⁵ O principal objetivo desses estudos é definir um grupo de genes de relevância diagnóstica que possa posteriormente ser utilizado como biomarcador através da técnica de PCR quantitativo.

A técnica de microarranjos de DNA foi mais recentemente utilizada em estudos com pacientes transplantados. Estudos utilizando essa tecnologia para estabelecer perfis de expressão de mRNA identificaram que a rejeição aguda está associada a importantes

perturbações na expressão de múltiplos genes, incluindo aqueles envolvidos no ciclo celular, metabolismo e imunidade.³² No estudo pioneiro de Sarwal e colaboradores, demonstrou-se que esses testes moleculares poderiam evidenciar um painel de genes relacionados à resposta imunológica contra o enxerto. Nesse estudo, biópsias de pacientes com rejeição aguda que eram indistinguíveis por análise histológica convencional revelaram diferenças na expressão gênica associada a diferenças de componente imunológico e celular e curso clínico. Foram encontrados também aglomerados de células B em biópsias associadas com rejeição severa de enxerto, o que sugere um papel relevante das células B na rejeição aguda.⁴⁶

Flechner e colaboradores publicaram o primeiro estudo utilizando essa metodologia em RNA, obtido de células mononucleares do sangue periférico, obtidas concomitante às amostras de biópsia. Seus resultados evidenciaram uma assinatura transcripcional capaz de diferenciar RA, disfunção aguda sem rejeição e transplantes com função estável sem histórico de rejeição. Uma peculiaridade desse estudo foi demonstrar que mesmo que essa assinatura molecular em sangue periférico tenha sido capaz de distinguir entre RA e pacientes com função estável, os padrões de expressão gênica foram muito diferentes dos padrões expressos no tecido.³²

Brouard e colaboradores avaliaram a utilização da monitorização molecular como ferramenta não invasiva de tolerância operacional em pacientes transplantados renais. Esse estudo teve como objetivo a identificação de biomarcadores de tolerância operacional em sangue periférico, com intuito de utilizá-los para determinação da frequência desse estado em pacientes com função renal estável na presença de imunossupressores. Em um primeiro momento, foram segregados 49 genes relacionados à tolerância e posteriormente analisados por microarranjos e PCR em tempo real, e 33 deles conseguiram diferenciar os fenótipos de tolerância e rejeição crônica com alta especificidade e sensibilidade. A assinatura genética demonstrada sugeriu um padrão de redução de sinalização coestimulatória, quiescência imunológica, apoptose e respostas de células T de memória. Identificou-se no sangue periférico de transplantados renais um grupo de genes associados à tolerância operacional que pode vir a ser útil como ferramenta não invasiva para guiar a administração de medicação imunossupressora.³³

Posteriormente, Reeve e colaboradores compararam a abordagem molecular com a histopatológica para o diagnóstico da rejeição aguda de transplantes renais. Esse estudo sugere que a abordagem molecular é mais fidedigna em representar o estado de agressão imunológica ao enxerto, uma vez que o diagnóstico histopatológico tem bases empíricas e observacionais (tratamento-dependente), sem um background explicativo da biologia mecanicista responsável pelo dano acarretado ao enxerto. Portanto, de acordo com os autores, as discordâncias entre as técnicas são esperadas e a metodologia molecular é mais poderosa e acurada para a avaliação do estado imune do paciente. A significância desses resultados no contexto da monitorização de pacientes submetidos a transplante renal pode explicar a falha de mais de uma década de trabalhos que analisaram em células do sangue periférico a ativação de antígenos baseada nos achados em biópsias de enxertos com rejeição e outros modelos imunes. É possível que o perfil de expressão gênica dos linfócitos do sangue periférico represente a adequação da imunossupressão, de tal forma que em pacientes que venham a rejeitar, reflitam a imunossupressão insuficiente, comparados com pacientes transplantados com função renal estável sem mecanismos operantes de agressão aloimune.²⁶

Na metodologia dos microarranjos, o fato de se demonstrar que os

transcritos ocorrem de maneira coordenada sugere que um limitado número de transcritos de genes seja necessário para a classificação de rejeição versus não rejeição. Por fim, um fato muito importante a ser considerado ao se desenhar uma ferramenta não invasiva para monitorização do enxerto é sua aplicabilidade. Atualmente, as análises por microarranjos ainda são muito onerosas, demoradas e sua avaliação estatística costuma ser muito mais complexa e de difícil resolução para utilização na rotina clínica, onde a análise de alguns genes de interesse por PCR em tempo real parece ser uma abordagem mais viável e recomendável.²⁵ É importante mencionar que a reprodutibilidade de genes diferencialmente expressos pode ser afetada por vários fatores como a metodologia, diferenças inerentes entre os indivíduos e populações e a escolha de limiares, faltando ainda uma padronização e reprodutibilidade intra e inter laboratórios.⁴

MicroRNAs

Outro importante avanço na biologia celular foi a descoberta dos microRNAs (miRNAs); o primeiro, lin-4, foi identificado em 1993 por Lee e colaboradores, através de um estudo genético em nematódeos *Caenorhabditis elegans*, onde foi observada a capacidade de um miRNA alterar a expressão de determinado gene (lin-14).^{47,48} Quase uma década depois, no ano de 2000, um segundo miRNA (let-7) foi descoberto, e com ele foi vista outra característica relevante dos miRNAs: a conservação deles através das espécies.⁴⁹

A ligação desses micros fragmentos de RNA com o RNA mensageiro (mRNA) e sua conservação através das espécies atraiu a atenção de pesquisadores, expandindo a pesquisa nessa área.^{48,50} Atualmente, centenas já foram clonados e previstos pela bioinformática. Estima-se que o genoma humano contém em torno de 800-1000 miRNAs, sendo parte comum aos primatas.⁵⁰

MicroRNAs são codificados por genes específicos, expressos no núcleo e submetidos a várias etapas de processamento até atingir sua forma madura, que varia de 19 a 25 nucleotídeos. A parte funcional é incorporada ao complexo silenciador induzido por RNA (RISC), composto por múltiplas proteínas que guiam a maquinaria silenciadora para o RNA mensageiro alvo, inibindo a tradução ou promovendo sua degradação.⁵¹

Atualmente, persiste uma lacuna no conhecimento dos mecanismos que fazem um miRNA escolher silenciar ou degradar seus alvos, visto que comprovadamente, um único miRNA pode inibir vários mRNAs e a expressão de um único mRNA pode ser regulada por vários miRNAs distintos que atuam em conjunto.⁵¹⁻⁵³ Os miRNAs regulam seus genes alvos através de dois mecanismos: por repressão translacional ou por degradação do RNA mensageiro. Estima-se que pelo menos metade dos mRNAs expressos podem ser regulados por miRNAs.⁵⁴

Esses pequenos fragmentos de RNA demonstram ter controle de processos como desenvolvimento, proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo e oncogênese. Apesar de se saber pouco sobre o processo de regulação dos miRNAs, sabe-se que a desregulação desses pode levar à perturbação e supressão de genes que operam na sinalização de cascatas intracelulares, levando a condições de doença ou de sua progressão.⁵¹⁻⁵³

Diferentes estudos sugerem que os miRNAs participam ativamente da regulação e do desenvolvimento de células imunes.⁵¹⁻⁵³

Já foram identificados miRNAs específicos que apresentam significativo impacto na diferenciação de células B e T e no processo celular necessário para a imunidade inata e adaptativa, incluindo inflamação, sinalização via TCR e receptores de células "toll-like" (TLR), produção de citocinas, da função celular das células Treg e apresentação de antígenos.⁵¹

No transplante renal, uma questão crítica e não resolvida é a base mecânica para as principais perturbações na expressão gênica durante um episódio de rejeição. Em um estudo, Sui e colaboradores compararam níveis de expressão de miRNAs em biópsias de pacientes submetidos a transplante renal que desenvolveram quadro de rejeição aguda e amostras de rins normais para averiguar a existência de relação entre miRNAs e rejeição aguda. O estudo identificou 71 miRNAs e desses, 20 miRNAs possuíam expressão diferenciada, sendo que 12 tinham seus níveis diminuídos e oito aumentados, quando comparados a pacientes com função renal normal.⁵⁵

Em seguida, Anglicheau e colaboradores investigaram a associação de rejeição aguda com alterações significativas na expressão de miRNAs em tecido de enxertos renais e observaram se esses padrões de expressão intraenxerto de miRNAs seriam suficientes para diagnosticar rejeição aguda e prever a função renal. Como resultado, encontrou-se que determinados miRNAs (miR-142-5p, miR-155 e miR-223) que estão hiperexpressos em biópsias com RA estão também presentes em altos níveis em células mononucleares do sangue periférico em comparação com os miRNAs hipoexpressos (miR-30a-3p, miR-10b ou let-7c) em biópsias sem RA. Outro achado importante desse estudo foi que dos 53 miRNAs diferencialmente expressos entre biópsias de RA e normais, 43 encontravam-se hipoexpressos e somente 10 estavam hiperexpressos.⁵²

Shan e colaboradores revisaram o papel dos miRNAs nas células do sistema imune, com o objetivo de encontrar potenciais biomarcadores para transplantes de órgãos sólidos. Foram evidenciados marcadores imunológicos como o miR-181a que está relacionado com a modulação da sensibilidade de células T através da alteração do sinal do TCR, assim, é possível supor que a diminuição da expressão do miR-181a conduziria à redução da sinalização dos TCR e da atividade das células T ao aloantígeno. Outro marcador citado nesta revisão é o miR-142-3p, que está relacionado com a função das células Treg, tendo sua expressão regulada direta ou indiretamente pelo gene FOXP3, que quando a reprime, conduz um aumento na produção de AMP cíclico, transferindo-o para células TCD4+ convencionais causando supressão das Tregs.⁵⁶

Um terceiro marcador citado por Shan e que foi bastante enfatizado é o miR-155, que está relacionado com várias partes do sistema imune. Esse miRNA está envolvido com a função das células dendríticas, apresenta um efeito anti-inflamatório, participa da resposta das células T e está caracterizado como regulador de resposta de células B.⁵⁶

Em concordância com o estudo citado, outro autor, Barnejee e colaboradores encontraram evidências de que o miR-155 é capaz de inibir a expressão do sinalizador do receptor de interferon- γ (IFN- γ Ra), sugerindo que esse miRNA pode servir como um regulador rápido e reversível para células que estão submetidas à diferenciação antes da estabilização do gene, influenciando diretamente a diferenciação de células TCD4+ e contribuindo para a diferenciação das células T helper tipo1.⁵⁷

Visto o potencial dos miRNAs, pesquisadores têm procurado não só marcadores intra-enxerto, mas também o reflexo deles em células do sangue periférico e urina. Lorenzen e colaboradores testaram a hipótese que miRNAs encontrados no sedimento urinário de pacientes com rejeição aguda e outras alterações poderiam não só servir como marcadores, mas também como preditores da sobrevida do enxerto. Foram testados 81 pacientes, para os miR-10a, miR-10b e miR-210 detectados na urina, encontrando-se resultados significativos, principalmente para o miR-210 que, entre outras

características, está diminuído em pacientes transplantados renais com rejeição aguda, além de ser capaz de prever o declínio do índice de filtração glomerular, um anos após o transplante. Postula-se assim que o miR-210 seja um potencial marcador para rejeição renal aguda e preditor da função do enxerto em longo prazo.⁵⁸

Micro-RNAs estão profundamente envolvidos com eventos que determinam rejeição, tolerância e manutenção da homeostase, além dos padrões de expressão de miRNA e dos seus níveis estarem altamente relacionados com a diferenciação de linfócitos e sua ativação. A expressão gênica de alguns miRNAs pode representar o comportamento fisiológico após um transplante, detectando precocemente alterações que indiquem rejeição ou desvios no comportamento celular.

Perspectivas no uso dos testes moleculares em transplante renal

Existe a expectativa de que os microarranjos venham a desempenhar papel crucial no transplante de órgãos em assuntos relacionados à identificação de mecanismos moleculares de rejeição aguda, injúria crônica, efeito de toxicidade das drogas imunossupressoras e tolerância. É também esperado que eles

ajudem a identificar novos alvos de drogas para um tratamento com imunossupressores pós-transplante mais personalizado. Mais importante, espera-se que os microarranjos ajudem a definir biomarcadores para uso não invasivo e para o diagnóstico clínico de rejeição e de tolerância. Na abordagem clínica, existem duas razões principais para que se utilize um número pequeno de genes para monitoramento clínico por RT-PCR. A primeira é o custo; a RT-PCR é consideravelmente menos onerosa para testar um número restrito de genes, podendo ser realizada rapidamente e na maior parte dos laboratórios. Os microarranjos, que utilizam tecnologia mais cara são úteis para testar múltiplos genes, em geral centenas. A segunda diz respeito à análise dos resultados com as duas metodologias. Os microarranjos são complexos e requerem muito tempo e pessoal altamente treinado para sua interpretação, ao passo que os dados provenientes da RT-PCR são de análise consideravelmente mais simples e rápida. Adicionalmente, a RT-PCR é mais sensível em detectar pequenas mudanças na expressão gênica. A comparação das tecnologias de microarranjos e PCR em tempo real identificando seus pontos fortes e fracos foi proposta por Kahtri e colaboradores e está apresentada na figura 5.⁵⁹

Figura 5. Comparação das tecnologias de Microarranjos e PCR em Tempo Real

Microarranjos	PCR em Tempo Real
- Custo efetivo no rastreamento de milhares de genes. Muito dispendioso para rastreamento de apenas dezenas de genes	- Custo efetivo em testar no máximo algumas dezenas de genes. Cara e consome tempo para testar centenas de genes
- Tecnologia relativamente nova e requer expertise na análise dos dados	- Análise de dados simplificada e de fácil aplicabilidade na rotina clínica
- Baixa sensibilidade devido a não detecção de transcritos pouco abundantes na amostra.	- Alta sensibilidade permite a detecção de transcritos pouco abundantes em uma amostra.
- Baixa especificidade por hibridização cruzada, erros no desenho das sondas. Limitada na detecção de splice-alternativos.	- Alta especificidade; possibilidade de desenhar primers para identificação de transcritos splice-variantes

Embora o potencial impacto clínico das assinaturas de expressão gênica que podem prever a RA e monitorar a imunossupressão seja claro, as possíveis contribuições para entendimento da biologia do transplante também são importantes considerações. Por conseguinte, o objetivo máximo da assinatura da expressão gênica é identificar genes específicos e associá-los a rotas de mecanismos celulares mediadores de rejeição, lesão e reparo tecidual, imunossupressão e tolerância. Com o conhecimento dos mecanismos de ação é possível que se desenvolvam novas drogas e abordagens mais eficazes que permitam a monitorização segura do curso clínico e de eventuais estados de tolerância ao enxerto.⁵³

O desenvolvimento de técnicas moleculares capazes de fornecer um painel da atividade imunológica responsável pela agressão ao enxerto de forma não invasiva sugere a possibilidade futura da otimização e individualização do tratamento com drogas imunossupressoras.

Situações clínicas nas quais a monitorização dos processos nocivos

ao enxerto é feita por biópsias, como a DGF, RASC, IFTA, entre outras, poderão vir a ser diagnosticadas por métodos moleculares não invasivos.

No entanto, existem diversas premissas a serem cumpridas para que os testes moleculares possam alcançar a arena clínica. Especificamente, os testes deverão: [1] ser avaliados em diferentes coortes de pacientes; [2] ser avaliados em séries de pacientes consecutivos com múltiplas patologias para permitir a verdadeira determinação de seus parâmetros diagnósticos; [3] ser reproduzidos por grupos independentes; [4] ser avaliados longitudinalmente para determinar a habilidade de um dado ensaio de detectar processos patológicos precocemente e tardiamente pós-transplante, assim como avaliar seu comportamento em condições intervenientes; [5] demonstrar que o teste candidato retorna aos valores basais com terapia efetiva. Além de satisfazer esses critérios básicos, um teste útil também deve ser capaz de detectar níveis sub-clínicos de agressão para que a intervenção precoce seja uma opção potencial.²⁵

ABSTRACT

Kidney transplantation is the treatment of choice for many end-stage kidney disease patients. Acute rejection remains a significant complication, and the graft biopsy is still the gold diagnostic standard. As it is invasive and potentially harmful, there are searches for new markers to diagnose such condition. Non-invasive diagnostic tools have several advantages mainly including possibility of frequent and sequential use to easily assess the immune status of the receptor. This review presents the methods and advantages of the molecular approaches currently used in researching kidney transplantation, real time polymerase chain reaction, DNA microarrays, and more recently, micro-RNAs analyzes. It is expected that microarrays and micro-RNAs may attain a crucial role to the organ transplantation in matters related to the identification of molecular mechanisms of acute rejection, chronic injury, effect of immunosuppressive drug toxicity and tolerance. The development of molecular techniques capable of noninvasively provide a panel for the immunological activity mediating injury to the graft suggests possibility of optimization and individualization of the immunosuppressive therapy. For this review, we used searching tools on international databases (PubMed, Web of Knowledge) through the descriptors "Kidney transplantation", "Graft Rejection" and "Diagnostic Techniques and Procedures". We selected only studies from indexed journals and referred to studies of major clinical or historical importance in the area.

Keywords: Kidney Transplantation; Graft Rejection; Diagnostic Techniques and Procedures.

REFERÊNCIAS:

1. Nankivell B, Alexander S. Rejection of the Kidney Allograft. *N Engl J Med*. 2010;363:15
2. Colvin RB, Cohen AH, Saiontz C, Bonsib S, Buick M, Burke B, et al. Evaluation of pathologic criteria for acute renal allograft rejection: reproducibility, sensitivity, and clinical correlation. *J Am Soc Nephrol*. 1997;8:1930-41.
3. Biomarkers definition working group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69:89-95.
4. Bestard O, Cruzado JM, la Franquesa M, Grinyó JM. Biomarkers in renal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15:467-73.
5. Azuaje F, Devaux Y, Wagner D. Challenges and standards in reporting diagnostic and prognostic biomarker studies. *Clin Transl Sci*. 2009;2:156-61.
6. Walsh PT, Strom TB, Turka LA. Routes to transplant tolerance versus rejection: the role of cytokines. *Immunity*. 2004;20:121-31.
7. Muthukumar T, Ding R, Dadhania D, Medeiros M, Li B, Sharma VK, Hartono C, et al. Serine proteinase inhibitor-9, an endogenous blocker of granzyme B/perforin lytic pathway, is hyperexpressed during acute rejection of renal allografts. *Transplantation*. 2003;75:1565-70.
8. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, et al. Messenger RNA for FOX P3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med*. 2005;353:2342-51.
9. Gloor J, Cosio F, Lager DJ, Stegall MD. The spectrum of antibody-mediated renal allograft injury: implications for treatment. *Am J Transplant*. 2008;8:1367-73.
10. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo V. TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nature Immunology*. 2007;8:345-50.
11. Jang HR, Ko GJ, Wasowska BA, Rabb H. The interaction between ischemia reperfusion and immune responses in the kidney. *J Mol Med*. 2009;87:859-64.
12. Rouvier E, Luciani MF, Mattei MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol*. 1993;150: 5445-56.
13. Weaver CT, Hattori RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:821-52.
14. Torchinsky MB, Garaude J, Martin AP, Blander JM. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. *Nature*. 2009;458:78-82.
15. Peck A, Mellins ED. Precarious Balance: Th17 Cells in Host Defense. *Infect Immun*. 2010;78(1):32-8.
16. Caldwell CC, Okaya T, Martignoni A, Husted T, Schuster R, Lentsch AB. Divergent functions of CD4-T lymphocytes in acute liver inflammation and injury after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;289:G969-G976.
17. Van KC, Boonstra JG, Paape ME, Fossiez F, Banchereau J, Lebecque S, et al. Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9:1526-34.
18. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant*. 2008;8:753-60.
19. Gaber LW, Moore LW, Alloway RR, Flax SD, Shokouh-Amiri MH, Schroder T, et al. Correlation between Banff classification, acute renal rejection scores and reversal of rejection. *Kidney Int*. 1996;49:481-7.
20. Marcussen N, Olsen TS, Benediktsson H, Racusen L, Solez K. Reproducibility of the Banff classification of renal allograft pathology. Inter- and intraobserver variation. *Transplantation*. 1995;60:1083-9.
21. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. *Transplantation*. 2004;78:242-9.
22. Rush DN, Henry SF, Jeffery JR, Schroeder TJ, Gough J. Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. *Transplantation*. 2004;77:208-11.
23. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation*. 2005;79:1277-86.
24. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med*. 2003;349:2326-33.
25. Nickerson P. Post-transplant monitoring of renal allografts: are we there yet? *Curr Opin Immunol*. 2009;21:563-8.
26. Reeve J, Einecke G, Mengell M, Sis B, Kayser N, Kaplan B, et al. Diagnosing rejection in renal transplants: a comparison of molecular- and histopathology-based approaches. *Am J Transplant*. 2009;9:1-9.
27. Strom TB. Rejection – More than the eye can see. *N Engl J Med*. 2005;353:2394-96.
28. Aquino-Dias E, Joelsons G, da Silva DM, Berdichevski RH, Ribeiro AR, Veronese FJ, et al. Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney Int*. 2008;73:877-84.
29. Vasconcellos LM, Schachter AD, Zheng XX, Vasconcellos LH, Shapiro M, Harmon WE, et al. Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation*. 1998;66:5626.
30. Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, et al. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med*. 2001;344:947-54.
31. Renesto PG, Ponciano VC, Cenedeze MA, Saraiva-Câmara NO, Pacheco-Silva A. High expression of Tim-3 mRNA in urinary cells from kidney transplant recipients with acute rejection. *Am J Transplant*. 2007;7:1661-5.
32. Flechner SM, Kurian SM, Head SR, Sharp SM, Whisenant TC, Zhang J, et al. Kidney transplant rejection and tissue injury by gene profiling of biopsies and peripheral blood lymphocytes. *Am J Transplant*. 2004;4:1475-89.

33. Brouard S, Mansfield E, Braud C, Li L, Giral M, Hsieh SC, et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:15448-53.
34. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methos Appl*. 1995;4:357-62.
35. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ Method. *Methods*. 2001;25:402-8.
36. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000;25:169-93.
37. Manfro RC, Aquino-Dias EC, Joelsons G, Nogare AL, Carpio VN, Gonçalves LF. Noninvasive Tim-3 messenger RNA evaluation in renal transplant recipients with graft dysfunction. *Transplantation*. 2008;86:1869-74.
38. Dias ECA, Veronese FJV, Gonçalves LFS, Manfro RC. Molecular markers in subclinical acute rejection of renal transplants. *Clin Transplant*. 2004;18:281-7.
39. Hernandez-Fuentes M, Sawitzki B, Perucha E, et al. Identification of immune tolerance in renal transplants. *Am J Transplant*. 2008;8(Suppl 2):292.
40. Newell KA, Asare A, Kirk AD, Gislis T, Bourcier K, Suthanthiran M, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. 2010;120:1836-47.
41. Bestard O, Cruzado JM, Rama I, Torras J, Gomà M, Serón D, et al. Presence of FoxP3+ regulatory T cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:2020-6.
42. Bunnag S, Allanach K, Jhangri GS, Sis B, Einecke G, Mengel M, et al. FOXP3 expression in human kidney transplant biopsies is associated with rejection and time post transplant but not with favorable outcomes. *Am J Transplant*. 2008;8:1423-33.
43. Viklicky O, Hribova P, Volk HD, Slatinska J, Petrasek J, Bandur S, et al. Molecular phenotypes of acute rejection predict kidney graft prognosis. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21:173-80.
44. Anglicheau D, Muthukumar T, Hummel A, Ding R, Sharma VK, Dadhania D, et al. Discover and validation of a molecular signature for the noninvasive diagnosis of human renal allograft fibrosis. *Transplantation*. 2012 Jun 15;93(11):1136-46.
45. Jun AS, Liu SH, Koo EH, Do DV, Stark WJ, Gottsch JD. Microarray analysis of gene expression in human donor corneas. *Arch Ophthalmol*. 2001;119:1629-34.
46. Sarwal M, Chua MS, Kambham N, Hsieh SC, Satterwhite T, Masek M, et al. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Eng J Med*. 2003;349:125-38.
47. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*. 1993;75:843-54.
48. Liu J. Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20:214-21.
49. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403:901-6.
50. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:28-97.
51. Harris A, Krams SM, Martinez OM. MicroRNAs as Immune Regulators: Implications for Transplantation. *Am J Transplant*. 2010;10:71319.
52. Anglicheau D, Sharma VK, Ding R, Hummel A, Snopkowski C, Dadhania D, et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:5330-5.
53. Hartono C, Muthukumar T, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of acute rejection of renal allografts. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15:35-41.
54. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136:215-33.
55. Sui W, Dai Y, Huang Y, Lan H, Yan Q, Huang H. Microarray analysis of MicroRNA expression in acute rejection after renal transplantation. *Transpl Immunol*. 2008;19:81-5.
56. Shan J, Feng L, Luo L, Wu W, Li C, Li S, et al. MicroRNAs: potential biomarker in organ transplantation. *Transpl Immunol*. 2011;24:210-5.
57. Banerjee A, Schambach F, DeJong CS, Hammond SM, Reiner SL. MicroRNA-155 inhibits IFN-gamma signaling in CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. 2010;40:225-31.
58. Lorenzen JM, Volkmann I, Fiedler J, Schmidt M, Scheffner I, Haller H, et al. Urinary miR-210 as a mediator of acute T-cell mediated rejection in renal allograft recipients. *Am J Transplant*. 2011;11:2221-7.
59. Khatri P, Sarwal MM. Using gene arrays in diagnosis of rejection. *Curr Opin Organ Transplant*. 2009;14:34-9.

FATORES DE INTERFERÊNCIA NO PROCESSO DE DOAÇÃO DE ÓRGÃOS E TECIDOS: REVISÃO DA LITERATURA

Interference factors in process and tissue donation of organs: review of literature

Livia Diederichsen de Brito¹, Rita Gomes Prieb²

RESUMO

O transplante de órgãos e tecidos é uma prática frequente na rotina médica. Para a doação, é necessário apenas o consentimento da família. Todavia, no processo, alguns entraves diminuem o número de doações. Objetivos: Através da revisão da literatura, objetivou-se identificar quais os fatores que interferem no consentimento de familiares de potenciais doadores falecidos após constatação de morte encefálica no processo de doação de órgãos e tecidos. Além disso, procurou-se identificar quais as condições consideradas adequadas para abordagem aos familiares dos potenciais doadores e avaliar o efeito da comunicação da má notícia no consentimento da doação de órgãos e tecidos. Método: Revisão da literatura, utilizando a base de dados OvidMedline, empregando as seguintes palavras-chave: “organ” ou “tissue” e “don*” ou “consent”, no período de junho de 2008 a maio de 2012. A busca limitou-se a artigos publicados em língua portuguesa e inglesa e que incluíam seres humanos adultos. Resultados e Discussão: Os fatores de recusa no consentimento mais citados são: dificuldade de compreensão do diagnóstico de morte encefálica, desconhecimento do desejo do falecido sobre a doação dos órgãos, necessidade da família de preservar a integridade do corpo do falecido, divergência de opiniões entre familiares a respeito da doação, tempo escasso para a tomada de decisão de doar e falha na comunicação entre o profissional e a família. O local não se configura como um fator de interferência, sendo somente destacada a importância da realização da entrevista em local privativo. Conclusão: O transplante de órgãos vem se firmando como prática que dá esperança de nova condição de vida para milhares de pessoas que apresentam disfunções diversas. Entretanto, para que isso ocorra, é importante que a captação de órgãos seja efetiva. Diversos fatores são apontados como de possível recusa como os supracitados. Sendo assim, para aumentar o índice de doações é importante que uma equipe de profissionais habilitados seja capacitada e ofereça não só um espaço de continência, mas também de acolhimento à família abordada. Além disso, a comunicação entre os membros da equipe e os familiares deve ser eficaz, favorecendo assim a intenção da doação.

Descritores: Comunicação; Doação de Órgão, Relações Profissional-Família

INTRODUÇÃO

O processo de doação de órgãos e tecidos, como o próprio nome sugere, é um processo que se inicia com a identificação e manutenção do paciente diagnosticado com morte encefálica e é concluído com a efetivação do transplante.¹

A doação de órgãos pode ser feita entre doadores vivos, denominada doação intervivos ou através da doação de um paciente clinicamente morto para um receptor, designada de “doação de doador falecido”. A doação de doador falecido é a mais frequente nos processos de transplante, mas a doação intervivos, de acordo com a literatura, é uma prática habitual e que deveria ser vista como uma forma complementar do programa de doação de doador falecido.² A doação de doador falecido somente é realizada após a confirmação da morte encefálica.² De acordo com a Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos,³ morte encefálica caracteriza-se pela irreversibilidade de todas as funções do cérebro, progredindo assim para o óbito.

Conforme determina o Ministério da Saúde, para ser um doador não é preciso documento de comprovação do desejo da parte do paciente, sendo necessário apenas que a família do doador autorize a doação.⁴

Instituições:

¹ Residência Integrada Multiprofissional em Saúde – Ênfase Adulto Crítico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

² Serviço de Psicologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Correspondência:

Livia Diederichsen de Brito

Ramiro Barcelos, 2350, Santa Cecília, CEP 90035-903, Porto Alegre/RS

Tel.: 51 9236-4177

E-mail: liviadbrito@hotmail.com

Recebido em: 01.06.2012

Aceito em: 28.06.2012

No Brasil, assim como em outras partes do mundo, a taxa de recusa no consentimento por parte das famílias é bastante elevada e pode chegar a mais de 50%.^{5,6} Uma das razões atribuídas à carência na doação de órgãos e tecidos apontados pela literatura é a falha na comunicação entre os profissionais da saúde e a família do doador.⁷

A intervenção psicológica no âmbito hospitalar é bastante ampla, podendo atuar diretamente com o paciente e também como parte de uma equipe multidisciplinar especializada no atendimento de clientela específica como, por exemplo, os familiares dos pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva.⁸

Tendo em vista a importância do assunto e a participação do profissional psicólogo, como parte da equipe capacitada para a comunicação entre profissionais de saúde e os familiares sobre uma possível doação de órgãos, propôs-se esta revisão, que abordará as possíveis razões de recusa por parte dos familiares para a doação de órgãos de um paciente com diagnóstico de morte encefálica.

OBJETIVO

Identificar, através de dados publicados na literatura, os fatores que interferem no consentimento dos familiares de potenciais doadores falecidos, após a constatação de morte encefálica no processo de doação de órgãos e tecidos. Além disso, procurou-se identificar as condições consideradas adequadas para a abordagem dos familiares de potenciais doadores e avaliar o efeito da comunicação da má notícia no consentimento da doação de órgãos e tecidos.

MÉTODO

Para a revisão, realizou-se uma busca na base de dados OvidMedline, utilizando os metadados “organ” ou “tissue” e “don*” ou “consent”. A busca limitou-se a artigos publicados em língua portuguesa e inglesa e que incluíam seres humanos, no período entre junho de 2008 e maio de 2012, que estivessem disponíveis de forma completa e gratuita na rede mundial de computadores. O período de quatro anos para a busca foi definido em razão de já haver outro artigo⁹ que abordou, através de uma revisão sistemática da literatura, o assunto até maio de 2008.

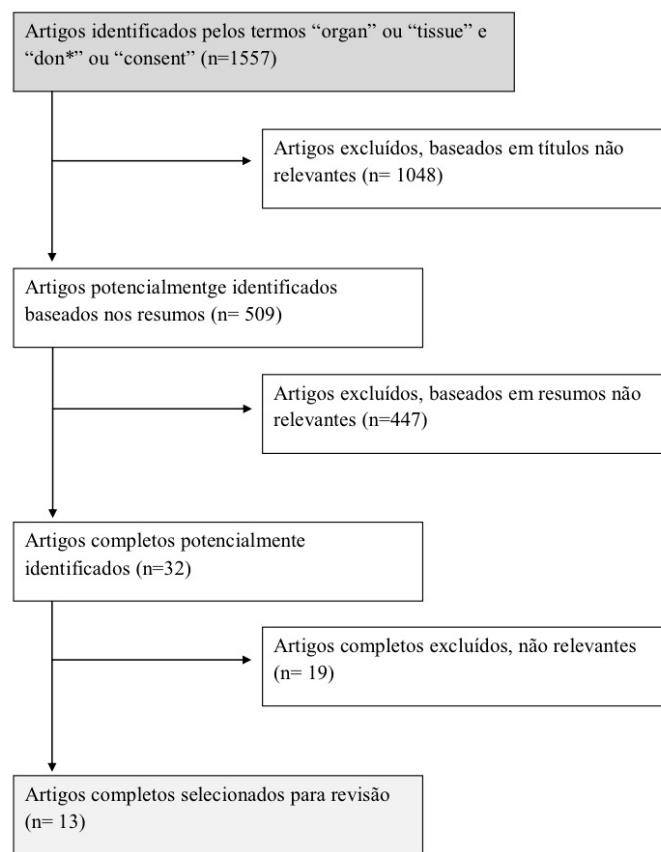
Como critérios de inclusão, foi utilizada a busca por publicações que abordassem: 1) assuntos relativos ao consentimento e resultado da solicitação da doação de órgãos e 2) doação de órgãos de indivíduos adultos.

Como critérios de exclusão foram considerados: 1) artigos em que foi relatada recusa na doação por fatores não modificáveis, tais como religião, cultura, geografia e etnia; 2) que abordaram a doação de órgãos de crianças e adolescentes; 3) estudos que descreveram avaliação neurológica incompleta de pacientes potenciais doadores; e 4) estudos que abordaram somente a parte clínica do processo de doação de órgãos e tecidos.

A busca revelou um total de 1557 artigos relacionados às palavras chaves utilizadas. Para a seleção dos artigos para a revisão, consideraram-se inicialmente os títulos, depois os resumos e, finalmente, o texto completo da publicação.

Todos os 1557 títulos foram avaliados, sendo selecionados 509 resumos. Desses, foram selecionados 32 artigos que foram revisados, alcançando uma seleção de 13 artigos, que foram utilizados para a presente revisão (Figuras 1 e 2).

Figura 1. Fluxograma da seleção dos artigos identificados para o estudo



Para a construção da revisão propriamente dita, foi feita uma introdução contemplando alguns conceitos relacionados ao assunto e os resultados posteriormente foram descritos para melhor compreensão.

RESULTADOS

Diversos fatores são apontados na literatura como fatores de interferência no consentimento de familiares de potenciais doadores no processo de doação de órgãos e tecidos. Os mais frequentemente apontados são:

1. Diagnóstico de morte encefálica

A morte encefálica, como já referida, é quando há um cessar de todas as funções das estruturas neurológicas, sendo definida através de alguns testes complementares.¹⁰ Todavia, muitas vezes ocorre falta de compreensão por parte da família sobre o diagnóstico de morte encefálica, uma vez que, a olhos vistos, o paciente segue apresentando características vitais como batimento cardíaco e outras, como se ainda estivesse gozando de vida plena. É descrito que em muitos casos a comunicação da morte encefálica é feita de forma inadequada, utilizando linguagem complexa e de difícil compreensão.^{1,9,11-16}

2. Desconhecimento da vontade expressa do paciente falecido

Outro fator de recusa apontado com frequência é quando a família desconhece o desejo do paciente em relação à doação de órgãos, optando, então, por não consentir na doação.^{12,13,16,17}

Figura 2. Razões listadas pelos familiares quanto à recusa na doação de órgãos, que mais apareceram nos artigos revisados.

Achados Principais	Estudo	Autores
Inadequação de comunicação entre equipe de saúde e familiares;	A paradigm shift in the approach to families for organ donation: honoring patients' wishes versus request for permission in patients with department of motor vehicles donor designations	Christmas et al, 2008
Diagnóstico de morte encefálica;	Exploring the psychological effects of deceased organ donation on the families of the organ donors	Merchant et al, 2008
Diagnóstico de morte encefálica; Desconhecimento da vontade expressa do paciente falecido; Preservação da integridade do corpo; Discordância de opiniões entre familiares; Inadequação de comunicação entre equipe de saúde e familiares;	A recusa familiar para a doação de órgãos e tecidos para transplante	Moraes et al, 2008
Discordância de opiniões entre familiares; Tempo para tomada de decisão; Inadequação de comunicação entre equipe de saúde e familiares;	Family, patients, and organ and tissue donation: who decides?	Schirmer et al, 2008
Diagnóstico de morte encefálica; Tempo para tomada de decisão; Inadequação de local para conversa; Inadequação de comunicação entre equipe de saúde e familiares;	Modifiable factors influencing relatives' decision to offer organ donation: systematic review	Simpkin et al, 2008
Diagnóstico de morte encefálica; Desconhecimento da vontade expressa do paciente falecido; Tempo para tomada de decisão; Discordância de opiniões entre familiares; Inadequação de local para conversa;	Barriers to obtaining family consent of potential organ donors	Brown et al, 2010
Diagnóstico de morte encefálica; Inadequação de comunicação entre equipe de saúde e familiares	Estressores vivenciados pelos familiares no processo de doação de órgãos e tecidos para transplante	Cinque et al, 2010
Diagnóstico de morte encefálica; Tempo para tomada de decisão;	Perceived support among families deciding about organ donation for their loved ones: donor Vs nondonor next of kin	Jacoby, et al, 2010
Diagnóstico de morte encefálica Tempo para tomada de decisão; Inadequação de local para conversa;	Organ donation experiences of family members	Manuel et al, 2010
Desconhecimento da vontade expressa do paciente falecido; Preservação da integridade do corpo; Inadequação de comunicação entre equipe de saúde e familiares.	Determinants of family consent to tissue donation	Siminoff et al,
Diagnóstico de morte encefálica Desconhecimento da vontade expressa do paciente falecido; Preservação da integridade do corpo; Discordância de opiniões entre familiares;	Causes of family refusal for organ donation	Ghorbani et al, 2011
Preservação da integridade do corpo;	How does the general public view posthumous organ donation? A meta-synthesis of the qualitative literature	Newton, 2011
Inadequação de comunicação entre equipe de saúde e familiares.	An exploratory study of relational, persuasive, and nonverbal communication in requests for tissue donation	Siminoff et al, 2011

3. Preservação da integridade do corpo

Alguns autores apontam ainda que a preocupação da família em manter a integridade do corpo do falecido é fator relevante no consentimento para a doação.^{12,16-18}

4. Discordância de opiniões entre familiares

Outro fator de interferência no consentimento para a doação é a discordância de opinião entre os familiares. A literatura aponta que, quando um membro da família não concorda com a doação, mesmo que os demais estejam de acordo, é comum que a decisão seja tomada conforme a opinião de uma minoria, atitude esta tomada para que não haja maiores conflitos entre os familiares, que já se mostram emocionalmente fragilizados e fisicamente esgotados.^{12,13,16,19}

5. Tempo para tomada de decisão

Alguns artigos destacam que, entre a comunicação do

diagnóstico de morte encefálica e a solicitação para a doação dos órgãos e tecidos, os familiares não dispõem de tempo suficiente para que a melhor decisão possa ser tomada, havendo assim a negativa no consentimento.^{9,13-15,19}

6. Inadequação de comunicação entre equipe de saúde e familiares

Receber a notícia de morte encefálica e dos critérios para a comprovação do diagnóstico, de maneira intranquila, no qual há o uso de uma linguagem de difícil compreensão, corrobora para negativa no consentimento.^{1,6,9,12,17,19,20}

7. Inadequação de local para conversa

Por fim, a adequação do local onde a abordagem com o familiar é realizada também é apontada como fator relevante para a tomada de decisão das famílias, sendo destacada em alguns artigos a importância de se realizar a abordagem em um local privado onde não haja interrupções.^{9,13,15}

DISCUSSÃO

O conceito de trocar um órgão enfermo por um órgão sadio remonta da antiguidade e já estava presente em representações de arte medievais. Todavia foi apenas em meados da década de 1960 que essa prática foi efetivamente inserida na rotina médica.²¹

O processo de doação é definido como um conjunto de ações e procedimentos que transformam um potencial doador em um doador efetivo.^{1,7} O processo inicia-se com a identificação, avaliação e manutenção do paciente diagnosticado com morte encefálica e é concluído com a efetivação do transplante. Contudo, o processo completo inclui diversos passos, como o comunicado da morte a uma central de notificação, captação e distribuição de órgãos; entrevista com os familiares; consentimento familiar; notificação do doador para a central de notificação; captação e distribuição de órgãos; distribuição dos órgãos e tecidos; seleção dos receptores; existência de uma equipe de transplante; extração dos órgãos selecionados e por fim, a liberação do corpo do potencial doador.¹

O início do processo só ocorre após a comprovação da morte encefálica do paciente, todavia, ele só é efetivado após a autorização de familiares próximos como cônjuges, pais ou filhos, irmãos.²² A abordagem do(s) familiar(es) é essencial no processo de doação, pois pode culminar com a autorização ou recusa da doação.²³ Duas condições são apontadas como prioritárias para a adequada comunicação entre profissionais de saúde e familiares: o local onde é realizada a abordagem e a forma com que o entrevistador realiza a abordagem sobre o consentimento da doação. Com relação ao local, no âmbito da psicologia denominamos de “setting”. No ambiente hospitalar, deparamo-nos com alguns desajustamentos do “setting”, tais como a falta de privacidade e interrupções, além de situações de barulhos e tempo restrito.²⁴

Em relação à comunicação entre profissional e família, a forma com que o entrevistador realiza a abordagem sobre o consentimento da doação pode interferir nesse consentimento; sendo assim, o entrevistador deve assumir uma postura adequada, sendo cordial e compreensivo.^{5,25} Tal fator tende a favorecer o vínculo de confiança do familiar para com a equipe e, consequentemente, há uma neutralização da resistência no consentimento por parte da família.²⁶ Mesmo em casos em que a decisão recaia na recusa, essa deve ser respeitada. O clima confortável para que o familiar tome sua decisão faz-se necessário, para que sentimentos de coação e culpas não tomem conta desses, reforçando a dor da perda que envolve a notícia do falecimento.⁵

Em diversos países, a doação de órgãos é compulsória. Entretanto, em muitos países delega-se aos familiares a decisão sobre a doação.²³ Para tanto, os familiares mais próximos, conforme citado anteriormente, são chamados e submetidos a uma entrevista, sendo esse um passo importante no processo de doação,²² bem como a forma com que ela é conduzida, já que o consentimento familiar é a chave principal para a efetivação da doação. A família é o elemento primordial no processo e deve receber assistência, antes e depois da notificação da morte encefálica do seu familiar.¹ Essa assistência prestada não deve ser longa e a equipe deve estar atenta aos primeiros sinais de sofrimento após a notificação da morte, para oferecer ajuda psicológica e auxiliar na tomada de decisão da família diante da doação.²³

Sendo a comunicação uma habilidade vital para o desenvolvimento do ser humano, na literatura são citadas algumas técnicas para transmissão de uma má notícia que incluem: a escolha e preparação do local onde a notícia será dada; a notícia deverá ser dada de maneira clara e sem eufemismos; todos os questionamentos devem ser respondidos e deve ser oferecido ao familiar um acolhimento.²⁷

Alguns autores apontam que, quando a abordagem é realizada de maneira imprópria¹ ou quando o entrevistador não possui uma postura adequada durante a abordagem,⁹ aumenta a possibilidade da recusa no consentimento por parte da família. Sendo assim, uma simples modificação na abordagem que é realizada com os familiares, atendendo suas demandas psíquicas, poderá aumentar as chances de aceitação da doação.^{6,23} Portanto, promover treinamento aos profissionais que realizam este tipo de abordagem, reforçando sua habilidade empática,¹⁷ a fim de estabelecer uma relação de confiança entre o profissional e a família, respeitando a autonomia desta,¹⁹ é indicado como um fator que favorece a aceitação da doação.

Entretanto, nos artigos analisados, somente é destacada a importância de realizar a comunicação em um local privado,^{9,13,15} sendo esse fator positivo no processo de doação. Todavia, os artigos não ressaltam qual seria a forma de estruturação deste “setting” para que essa abordagem aproxime-se de um possível ideal.

O processo de doação de órgãos é longo e causa intenso sofrimento e desgaste aos familiares.¹ A falta de tempo para discussão e reflexão sobre a doação entre as familiares do paciente é apontado¹⁹ como um fator negativo do processo e um dos motivos de recusa no consentimento. Logo, oferecer tempo suficiente para que a família possa decidir sobre a doação é importante, tanto para que a família possa estruturar-se internamente, quanto para que a tomada da decisão seja realizada de maneira consciente.⁹

De acordo com a lei brasileira 9.434/1997,²⁸ nos casos de captação de órgãos para doação, a família deve receber o corpo do falecido devidamente recuperado, de modo a alcançar tanto quanto possível seu aspecto anterior.^{1,12} Entretanto, essa é uma preocupação apontada por familiares de doadores que se mostram preocupados em preservar a integridade do corpo após o óbito.^{16,18} Desta forma, a recusa é justificada pelo desejo da família de não mutilar e desfigurar o corpo de seu parente,¹⁷ decisão essa que deve ser respeitada pela equipe que realiza a abordagem.

A morte ainda é um momento traumático que provoca muito estresse às famílias.¹ Nas situações em que os familiares não possuem a mesma opinião sobre o processo de doação, esse momento estressante pode ainda acarretar desacordos de opiniões e até conflitos entre os familiares.¹² A fim de minimizar um maior estresse nessa família, o familiar favorável pela doação, opta por concordar com o não consentimento evitando assim conflitos maiores entre os demais familiares.

O advento da doação de órgãos e, consequentemente, a aceitação dela, no entanto, inevitavelmente aborda a temática a respeito da morte,⁸ que sempre foi um tema considerado tabu para a espécie humana e ainda hoje vivemos numa sociedade em que pouco se discute sobre ela.²⁹

Portanto, oferecer a notícia sobre o diagnóstico de morte encefálica, fazendo uso de uma linguagem simples, explicando os critérios para o diagnóstico e oferecendo tempo para a

tomada da decisão da família,¹⁵ pode contribuir para a aceitação do consentimento.

Para ser um doador é necessária apenas a autorização da família,³⁰ entretanto, é frequente a família desconhecer o desejo do paciente a respeito da doação de órgão,^{12,13,16,17} sendo esse um fator significativo para a negação do consentimento. É importante conhecer a opinião em vida do falecido a respeito da doação, pois no momento em que a família precisa tomar uma decisão, ela tende respeitar o desejo do indivíduo falecido, sendo a recusa em alguns casos, o comprometimento com o desejo do ente, mas em outros casos, a negação pode ser uma forma da família de amenizar seu próprio sofrimento.¹²

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O transplante de órgãos vem firmando-se como uma prática que dá esperança de uma nova condição de vida para milhares de pessoas que apresentem disfunções diversas. Entretanto, para que isso ocorra, é importante que a captação de órgãos seja efetiva. Para tanto, é necessária a autorização dos familiares do paciente, num processo que pode ser doloroso quando somado ao processo da perda em si dos familiares. Diversos fatores são apontados como de possível recusa, como os supracitados. Entretanto, além desses, outro fator de interferência no processo de doação de órgãos e tecidos, como o pré-atendimento, é

indicado na literatura. Contudo esse item não era contemplado nos artigos revisados, não tendo sido incluído na revisão. Sendo assim, para aumentar o índice de doação, é importante que uma equipe de profissionais habilitados seja capacitada e que essa ofereça não só um espaço de continência, mas também de acolhimento à família abordada. Além disso, a comunicação entre os membros da equipe e os familiares deve ser eficaz, favorecendo assim a intenção de doação.

A inserção do psicólogo no ambiente hospitalar tem ocorrido gradualmente com o passar do tempo. Cada vez mais, o profissional da psicologia encontra-se inserido em diversas áreas do hospital, fazendo parte de equipes multiprofissionais. Hoje, não só o tratamento direto do paciente está entre as funções do psicólogo, mas também o acolhimento e acompanhamento aos familiares de pacientes internados, por exemplo, em uma unidade de terapia intensiva.

É premente a capacitação da equipe de profissionais para realizar a abordagem, e que haja um ambiente específico e apropriado para a realização do diálogo. A criação de um protocolo de entrevista com familiares poderia ser uma alternativa, de modo a auxiliar os profissionais durante a abordagem da doação. Além disso, é importante a divulgação a respeito da doação de órgãos através de campanhas educativas para fazer a população em geral discutir o assunto no âmbito familiar e social.

ABSTRACT

Organ and tissue transplantation is an increasingly common practice in medical routine. In Brazil, to donate the only requirement is the relatives' consent. However, the amount of donation is often reduced due to some barriers. **Purposes:** By a literature review aimed to identify factors affecting the consent of relatives of the dead body of potential donors after brain death in the process of organ donation. In addition, we seek to identify what conditions it is appropriate to deal with the families of potential donors and also to evaluate the effect of bad news on the consent of organ and tissue donation. **Methods:** The study was conducted through a literature review using the OvidMedline database using the keywords "organ" or "tissue" and "don*" or "consent", from June 2008 to May 2012. The search was limited to articles published in Portuguese and English and that included adult humans. **Results and Discussion:** The factors to refuse consent most cited were difficulty in understanding the diagnosis of brain death, ignorance of the deceased's wishes about organ donation, the family's desire to preserve the integrity of the body of the deceased, divergence of opinions among the families about the donation, the scarce time for the decision to donate and the failure in communication between the family and the health care professional. The setting for discussion is not set up as interference factor for donation but it was only highlighted the importance of conducting the interview in a private location. **Conclusion:** Organ transplantation is establishing itself as a practice that gives hope of a new condition of life for thousands of people who have various dysfunctions. However, for this to occur, it is important that organ harvesting is effective. Several factors are cited as possible refusal as above. For that reason, to increase the rate of donation, it is important that a team of skilled and qualified professionals is that not only provides a forum for continence, but also addressed the host family. Furthermore, communication between team members and family members must be effective, thus favoring the intention of donation.

Keywords: Communication, Organ Donors, Professional-Family Relations.

AGRADECIMENTO

Agradeço à Wília Marta E. D. de Brito pela dedicação e colaboração intelectual neste trabalho, ao psicólogo e também amigo, Rodrigo Souza, pelo auxílio técnico. Agradeço ainda, os médicos Ricardo Kuchenbecker e Cristiano Franke e ao biólogo José Roberto Goldim pelas sugestões na elaboração deste.

REFERÊNCIAS:

1. Cinque VM, Bianchi ERF. Estressores vivenciados pelos familiares no processo de doação de órgãos e tecidos para transplante. *Rev Esc Enferm USP*. 2010;44(4):996-1002.
2. Manyalich M, Paredes D, Vilardell J. Aspectos generales. In: Matesanz R, et al. *El modelo Español de Coordinación y Trasplantes*. Madrid: Aula Médica; 2008. p.181-85.
3. ABTO: Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos. 2011. Disponível em: <http://www.abto.org.br/abtov02/portugues/populacao/doacaoOrgaosTecidos/entendendoMorteEncefalica.aspx?idCategoria=4>.
4. Brasil Ministério da Saúde. Portal da Saúde: Transplantes. 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1004.
5. Rech TH, Rodrigues EMF. Entrevista familiar e consentimento. *Rev Bras Terap Intensiva*. 2007;19(1):85-9.
6. Christmas AB, Mallico EJ, Burris GW, Bogart TA, Norton AJ, Sing RF. A paradigm shift in the approach to families for organ donation: honoring patients' wishes versus request for permission in patients with department of motor vehicles donor designations. *The Journal of Trauma*. 2008;65(5):1507-10.
7. Santos MJ, Massarollo MCKB. Processo de doação de órgãos: percepção de familiares de doadores cadáveres. *Rev Latino-am Enfermagem*. 2005;13(3):382-87.
8. Amorim SF. Intervenção psicológica no hospital geral. In: Bruscatto W, Benedetti C, Lopes SRA, et al. *A prática da psicologia hospitalar na Santa Casa de São Paulo*. São Paulo: Casa do Psicólogo; 2004. p.71-8.
9. Simpkin AL, Robertson LC, Barber V, Young JD. Modifiable factors influencing relatives' decision to offer organ donation: systematic review. *BMJ*. 2009 Apr 21;338:b991
10. Escudero D. La muerte encefálica exploración clínica y métodos diagnósticos instrumentales. In: Matesanz R, et al. *El modelo Español de Coordinación y Trasplantes*. Madrid: Aula Médica; 2008. p.121-34.
11. Merchant SJ, Yoshida EM, Lee TK, Richardson P, Karlsbjerg KM, Cheung E. Exploring the psychological effects of deceased organ donation on the families of the organ donors. *Clin Transplant*. 2008;22:341-47.
12. Moraes EL, Massarollo MCKB. A recusa familiar para a doação de órgãos e tecidos para transplante. *Rev Latino-am Emfermagem*. 2008;16(3):458-64
13. Brown CVR, Foulkrod KH, Dworaczyk S, Thompson K, Elliot E, Cooper H, et al. Barriers to obtaining family consent for potential organ donors. *The Journal of Trauma*. 2010;68(2):447-51.
14. Jacoby L, Jaccard J. Perceived support among families deciding about organ donation for their loved ones: donor Vs nondonor next of kin. *Am J Crit Care*. 2010;19:52-61.
15. Manuel A, Solberg S, MacDonald S. Organ donation experiences of family members. *Nephrology Nursing Journal*. 2010;37(3):299-37.
16. Ghorbani F, Khoddami-Vishteh HR, Ghobadi O, Shafaghi S, Louyeh AR, Najafizadeh K. Causes of family refusal for organ donation. *Transplant Proceedings*. 2011;43:405-06.
17. Siminoff LA, Traino HM, Gordon N. Determinants of family consent to tissue donation. *The Journal of Trauma*. 2010;69(4):956-63.
18. Newton JD. How does the general public view posthumous organ donation? A meta-synthesis of the qualitative literature. *BMC Public Health*. 2011;11:791.
19. Schirmer J, Roza BA. Family, patients, and organ and tissue donation: Who decides? *Transplant Proceedings*. 2008;40:1037-40
20. Siminoff LA, Traino HM, Gordon NH. An exploratory study of relational, persuasive, and nonverbal communication in requests for tissue donation. *J Health Commun*. 2011;16(9):955-75.
21. Matesanz R. Los inicios de los trasplantes em España y em el mundo. In: Matesanz R, et al. *El modelo Español de Coordinación y Trasplantes*. Madrid: Aula Médica; 2008. p.1-9.
22. Griffith R, Tengnah C. Consent to organ donation part 1: the current arrangements. *British Journal of Community Nursing*. 2009;14(12):544-47.
23. Santiago PGC. La entrevista familiar técnica y resultados. In: Matesanz R, et al. *El modelo Español de Coordinación y Trasplantes*. Madrid: Aula Médica; 2008. p.105-19.
24. Simonetti A. *Manual de psicologia hospitalar o mapa da doença*. São Paulo: Casa do Psicólogo; 2004.
25. Martins CM, Cosmo M. A centralidade da família no processo de doação de órgãos e tecidos. *J Bras Transpl*. 2009;12(4):1169-220.
26. Quintana AM, Arpini DM. Doação de órgãos: possíveis elementos de resistência e aceitação. *Bol. de Psi*. 2009;609(130):91-102.
27. Leal F. Transmissão de más notícias. *Rev Port Clin Geral*. 2001;19:40-3.
28. Brasil. Lei n. 9.434, de 4 de fevereiro de 1997. Dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 5 fev. 1997. P.2191-3.
29. Kübler-ross E. *Sobre a morte e o morrer*. São Paulo: Martins Fontes; 1998.
30. Brasil Ministério da Saúde. Portaria MS no 1.262, de junho de 2006 – DOU 19.06.2006. Disponível em: http://www.adote.org.br/pdf/portaria_1262.pdf.

SEGURANÇA NO USO DE PROBIÓTICOS EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS

Safety use of probiotics in immunocompromised patients

Mayra Vieira Unterkircher, Tatiana Teixeira Gomes, Elizabeth Cardoso, Miyoko Nakasato, Lis Proença Vieira

RESUMO

Apesar dos inúmeros benefícios promovidos pelos probióticos, há relatos na literatura de infecções relacionadas ao seu uso e o imunocomprometimento pode ser um fator de risco para o seu desenvolvimento. Com o intuito de verificar a segurança da ingestão de probióticos por pacientes imunocomprometidos, realizou-se uma revisão bibliográfica nas bases MEDLINE/PUBMED, SciELO, Scirus e LILACS, seguida de pesquisa por referência cruzada. Foram selecionados 12 artigos, com relato de 21 casos de infecções, especialmente bacteremia e fungemia por probióticos em pacientes com algum tipo de comprometimento imunológico. Os efeitos adversos, quando presentes, ocorrem principalmente em pacientes pós-transplante, após manipulação dentária, em uso de cateter venoso central, com alteração cardíaca pré-existente e em uso de antibióticos de largo espectro. Desse modo, embora não haja comprovação efetiva de prejuízos a imunocomprometidos, o uso de probióticos pode trazer riscos para essa população, de modo que se recomenda observação e cautela na sua indicação e avaliação cuidadosa dos efeitos adversos.

Descritores: Probióticos, Segurança, Imunidade, Infecção, Transplante

INTRODUÇÃO

A palavra probiótico tem sua origem na língua grega (proviotká), que significa “para vida”¹ e pode ser definido como “um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta beneficemente o animal hospedeiro, melhorando o equilíbrio microbiano”.²

Classifica-se o organismo como sendo probiótico quando atende os seguintes critérios: origem humana; não patogênico; resistente ao processamento na produção de alimentos; permanecer viável após contato com suco gástrico e bile; adesão à célula epitelial intestinal; capacidade de persistir no trato gastrointestinal e de influenciar atividade metabólica local.³

Os microrganismos usados como probióticos são as bactérias ácido-láticas, bactérias não ácido-láticas e leveduras. Os mais utilizados para produção alimentar são do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*.^{4,5} São aprovados para consumo humano pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei rhamnosus*, *Lactobacillus casei defens*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*.⁶

Apesar dos inúmeros benefícios dos probióticos, muitos micro-organismos dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium* foram isolados em pacientes, havendo relatos na literatura sobre a ocorrência de bacteremia, endocardite, meningite e pneumonia, mostrando a capacidade de translocação desses micro-organismos.^{7,8}

Instituição:

Serviço de Nutrição e Dietética do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, São Paulo, Brasil

Correspondência:

Lis Proença Vieira

Av. Doutor Eneas de Carvalho Aguiar, 44 – CEP 05403-000- São Paulo/SP

Fax: +55 11 2661-5428

E-mail: lis.vieira@incor.usp.br

Recebido em: 22.06.2012

Aceito em: 10.07.2012

Algumas bactérias probióticas têm como mecanismo de ação uma forte adesão à mucosa intestinal, o que pode aumentar a translocação bacteriana e a virulência, tornando-as perigosas.⁹ Os fatores de risco para o desenvolvimento de infecções por esses microrganismos parecem ser predominantemente o imunocomprometimento ou em neutropenia prolongada, como no caso de pacientes transplantados, pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV), com câncer, em uso de antibióticos, pós-cirúrgicos e em uso de radioterapia.¹⁰⁻¹³

Como há relatos na literatura científica que um número expressivo de infecções pode estar relacionado aos probióticos, tem-se questionado sobre a segurança na indicação desse tipo de produto para pacientes em estado crítico, principalmente em imunocomprometidos.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi verificar a segurança da ingestão de alimentos contendo probióticos por pacientes imunocomprometidos.

MÉTODOS

Foi realizada ampla revisão bibliográfica sobre a segurança do uso de probióticos por pacientes imunocomprometidos.

As fontes de informações utilizadas foram os bancos de dados MEDLINE/PUBMED, SciELO, Scirus e LILACS, independente da data de publicação e tipo de estudo. Os descritores usados foram: Probiótico; Segurança; Infecção; Transplante; Imunidade; Terapia Imunossupressora; Lactobacillemia; Bacteremia, limitando-se aos artigos em seres humanos e língua em inglês, espanhol e português.

Os artigos potencialmente elegíveis foram triados após leitura do título e resumo daqueles trazidos na busca eletrônica. Consideraram-se pertinentes todos os artigos com descrição de alguma infecção ou efeito adverso causado por microrganismos probióticos relacionados ou não ao uso de suplementos com probióticos e estudos sobre a relevância dos micro-organismos probióticos como agentes patogênicos.

Em seguida, foi realizada leitura completa dos artigos selecionados e pesquisa manual por referência cruzada dos mesmos, possibilitando a inclusão de novos estudos. O critério de inclusão dos artigos obtidos nos bancos de dados e por referência cruzada foi a presença de eventos adversos causados por microrganismos probióticos em pacientes imunocomprometidos.

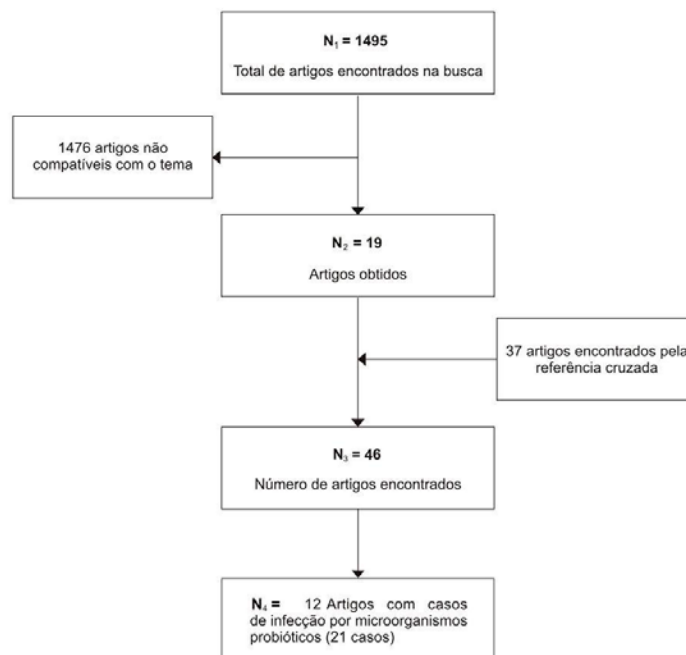
RESULTADOS

A busca inicial resultou em 1495 artigos nas bases de dados. Desses, 1476 foram descartados por não serem compatíveis com o tema. A partir dos 19 artigos selecionados, adicionaram-se 37 encontrados por referência cruzada, totalizando 56 artigos potencialmente elegíveis, dos quais 12 preencheram os critérios de inclusão (Figura 1).

Infecções por micro-organismos probióticos em indivíduos imunocomprometidos

Foram identificados 21 casos de infecções por microrganismos probióticos em pacientes com algum tipo de imunocomprometimento (Tabela 1). Desses, as principais

Figura 1. Fluxograma da seleção dos artigos identificados para o estudo



condições clínicas foram pós-transplantados¹⁴⁻¹⁸ (sete casos), leucemia mieloide aguda^{16,17,19} (cinco casos) e infecção por HIV^{14,20,21} (três casos), entre outros.²²⁻²⁵

O evento adverso mais comum foi a bacteremia e febre (sete casos cada), seguido de fungemia (seis casos), septicemia e endocardite (ambos com um caso). Os microrganismos isolados mais comuns foram os *Lactobacillus rhamnosus* (seis casos), *Saccharomyces cerevisiae* (cinco casos), *Lactobacillus casei* (três casos), *Lactobacillus paracasei* (um caso) e *Saccharomyces boulardii* (um caso). Em cinco casos,^{16,18} não foi especificada a espécie do microrganismo, mas apenas seu gênero (*Lactobacillus*). Em 15 casos houve cura do paciente.^{14,16-22,24,25}

Em oito casos constatou-se o uso de suplementos contendo probióticos com quantidades que variaram de 200mg a 1000mg ao dia na forma de sachês, comprimidos e iogurtes contendo probióticos, com a principal finalidade de tratar diarreia. Nos estudos em que houve uso de iogurte enriquecido com probióticos não foram identificadas suas quantidades.^{23,24}

Normalmente, são adicionados *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, não sendo informadas todas espécies. O caso de endocardite em que foi isolado *L. casei*, a infecção foi atribuída ao consumo habitual de grande quantidade de iogurte, mas não se tem informação suficiente de sua relação temporal.²⁴

Observou-se que as complicações que surgiram durante a intervenção com suplementos contendo probióticos, variaram de quatro a 18 dias do seu início.^{14,19,21,22,25} Em apenas um caso, os sintomas apareceram 15 dias após descontinuar o tratamento.¹⁴

Fatores predisponentes a infecções por micro-organismos probióticos

Artigos encontrados na literatura atentam para os fatores de risco no desenvolvimento de infecção por *Lactobacillus* que

incluem a neutropenia persistente, utilização de antibióticos, imunossupressão, descontaminação seletiva do intestino à qual alguns receptores de transplante de fígado submetem-se, câncer, diabetes mellitus, transplantes, cirurgias recentes, entre outros. Além disso, os procedimentos cirúrgicos abdominais, como a

colocação de alça em Y de Roux, pode alterar a flora intestinal, resultando em infecção.^{18,23,26,27}

Autores sugerem que a utilização frequente de antibióticos como a vancomicina por pacientes em unidades de tratamento intensivo e neutropênicos pode ser responsável pelas possíveis

Tabela 1. Casos de pacientes imunodeprimidos que apresetaram infecção por microrganismos probióticos.

Paciente				Intervenção (probiótico)			Resultado		
Referência	Desenho estudo	Idade/ Sexo	Doença de base	Via adm.	Quant.	Objetivo	Evento adverso	Micro-organismo isolado	Resultado
Riquelme et al.14	EC	42a/F	"Transplante renal e pancreático, DM "	Comprimido	1000mg/dia	T. diarreia	Fungemia	S. cerevisiae	Curado
	EC	41a/M	"Meningoencefalomielite secundária, HIV"	Comprimido	750mg/dia	T. diarreia	Fungemia	S. cerevisiae	Curado
Kalima et al.15	EC	5a/M	Transplante medula óssea	-	-	-	Febre, sepse	L. rhamnosus	Morte
Husni et al.16	RS	56a/M	Sarcoidose	-	-	-	Bacteremia	L. casei	Curado
	RS	57a/M	LMA, DM, IRC	-	-	-	Bacteremia	Lactobacillus	Morte
	RS	46a/F	Transplante pulmonar, FP	-	-	-	Bacteremia	Lactobacillus	Morte
	RS	37a/F	Transplante cardíaco, DM	-	-	-	Bacteremia	L. casei	Curado
	RS	35a/M	Linfoma não-Hodgkin, IRC	-	-	-	Bacteremia	Lactobacillus	Morte
	RS	36a/M	Transplante pulmão	-	-	-	Bacteremia	Lactobacillus	Morte
	RS	36a/M	Transplante pulmão	-	-	-	Bacteremia	Lactobacillus	Morte
Fruchart et al.17	EC	22a/M	LMA/Neutropenia	-	-	-	Febre, pneumonia	L. rhamnosus	Curado
	EC	63a/M	LMA/Neutropenia	-	-	-	Febre	L. paracasei	Curado
	EC	54a/M	LMA/Neutropenia	-	-	-	Febre, pneumonia	L. rhamnosus	Curado
	EC	49a/M	Transplante Medula Óssea	-	-	-	Febre	L. rhamnosus	Curado
Antony et al.18	R	57/F	Transplante cardíaco	-	-	-	Bacteremia	Lactobacillus	Curado
Cesaro et al.19	EC	8 m/M	LMA	Oral	-	"Prevenção de diarreia"	Fungemia	S. cerevisiae	Curado
Schlegel et al.20	EC	4a/F	HIV, Linfoma	-	-	-	Febre, fraqueza	L. rhamnosus	Curado
Hennequin et al.21	EC	36a/-	HIV, Linfoma	Sachê	1500mg/dia	T. diarreia	Fungemia	S. boulardii	Curado
Bassetti et al.22	EC	51/ -	Imunossupressão	Comprimido	1g/dia	"T. diarreia (C.difficile)"	"Fungemia Febre"	S. cerevisiae	Curado
MacGregor et al.23	EC	42a/F	Síndrome de Sjögren, IRI,	Oral, iogurte	-	T. diarreia	Septicemia	L. rhamnosus	Morte
Zé-Zé et al.24	EC	53/M	"Febre reumática, extração dentária"	Oral, iogurte	-	"Consumo habitual"	Endocardite	L. casei	Curado
Fredenucci et al.25	EC	49/M	Imunossupressão	Sachê	200mg/dia	T. diarreia	Fungemia	S. cerevisiae	Curado

Figura 2. Fatores de risco para sepse por probióticos.⁹

Principais fatores de risco 1- Imunocomprometidos; 2- Prematuridade. Menores fatores de risco 1- Cateter Venoso Central; 2- Barreira epitelial intestinal prejudicada (diarreia, inflamação intestinal); 3- Administração do probiótico por jejunostomia; 4- A administração concomitante de antibióticos de largo espectro em que probiótico é resistente; 5- Probióticos com propriedades de aderência da mucosa elevada ou conhecida patogenicidade; 6- Doença valvular cardíaca (para Lactobacillus apenas).
--

infecções por probióticos, pois altera a flora gastrointestinal, resultando na seleção de espécies resistentes a esses antibióticos, promovendo a translocação bacteriana.^{17,18,20}

Boyle et al.⁹ relacionaram os fatores de risco para infecção por cepas probióticas (Tabela 2). O autor sugere que na presença de pelo menos um fator de risco principal é necessária cautela na utilização de probióticos.

A infecção das bactérias probióticas não ocorre necessariamente por translocação. Há relatos de infecção por procedimentos dentários mais invasivos, seguidos ou não da ingestão de grande quantidade de alimentos contendo microrganismos probióticos,^{8,18,24,28-30} por contaminação pela enfermagem no manuseio de produtos contendo probióticos na presença de cateter venoso central,^{9,29,31,32} por pneumonia por *Lactobacillus* via doador de pulmão³³ e por broncoaspiração por dano do nervo vago, associada a doença do refluxo gastroesofágico.³⁴

Em pacientes críticos e em cuidados de terapia intensiva, o ambiente hostil cria no intestino alterações no equilíbrio da microflora favorecendo o crescimento de microrganismos patógenos. Estudos mostram que as cepas probióticas disponíveis usadas atualmente não fornecem benefícios iniciais e precisam de administração por mais de sete dias para apresentar efeitos clinicamente benéficos (redução na taxa de infecção, sepse grave, dias de internação e mortalidade) em pacientes críticos com trauma, quando há perda de bactérias ácido-láticas após curto período em unidade de terapia intensiva.^{35,36}

Relevância clínica e prognóstico das infecções por microrganismos probióticos

Alguns estudos encontrados na literatura tentaram descobrir quais doenças de base foram mais comuns para ocorrência de infecção por cepas probióticas. Cannon et al.³⁷ conduziram um estudo com mais de 200 relatos em literatura sobre infecção por *Lactobacillus*, nos quais foi encontrado maior número de infecções por *L. casei*, *L. rhamnosus* e *L. plantarum*. Dentre os malefícios, foram encontradas bacteremia, endocardite e infecções localizadas. O autor atentou ao fato de que nos pacientes que apresentaram endocardite, 63% tinham doença cardíaca estrutural subjacente e em 47% dos casos ocorreu uma condição dental, a qual foi uma possível causa de predisposição à doença. Em três casos, “o grande consumo de lácteos” foi apontado como possível fator de risco. Os fatores de risco mais comuns foram câncer, uso de antibióticos de amplo espectro, diabetes e transplante (sendo o hepático, renal, pulmonar, cardíaco e de medula óssea os mais comuns, sucessivamente), sendo que a mortalidade foi de aproximadamente 30%. De acordo com esse autor, a elevada taxa de mortalidade pode ser explicada pelas condições imunodeprimidas dos pacientes, uma vez que a presença de *Lactobacillus* foi proposta para ser um “marcador de doença grave e mal prognóstico”. Anthony et al.¹⁸ avaliaram 53 infecções por *Lactobacillus*, nas quais 45% dos pacientes apresentavam condição imunocomprometida e 22% haviam sido submetidos à cirurgia recente, não encontrando pacientes com infecções por cateter venoso central. Os autores constataram que apenas três mortes ocorreram, provavelmente por *Lactobacillus*. Husni et al.¹⁶ basearam-se em 45 pacientes com bacteremia ao longo de 15 anos. Condições como câncer (40%), cirurgia recente (38%) e diabetes mellitus (27%) eram recorrentes. Vinte e dois pacientes estavam na unidade de terapia intensiva, 11 recebendo terapia imunossupressora, 11 recebendo

nutrição parenteral total e 23 tinham recebido antibióticos, sem atividade contra *Lactobacillus*, antes da ocorrência de bacteremia. Trinta e um pacientes morreram, mas apenas uma morte foi atribuída à bacteremia por *Lactobacillus*.

Em uma revisão de fatores de risco em 89 pacientes com bacteremia foram encontrados 22 casos infectados com o gênero *Lactobacillus* e 25 casos com a espécie de *L. Rhamnosus*. Em 82% dos casos, os pacientes tinham comorbidades graves ou fatais. Fatores predisponentes para bacteremia foram imunossupressão, pré-hospitalização prolongada, e pré-intervenções cirúrgicas. A mortalidade foi de 26% em um mês e de 48% em um ano.²⁶

Por outro lado, em um dos estudos mais conhecidos na literatura, a fim de avaliar o potencial de lactobacilos para causar infecções graves, Saxelin et al.³⁸ estudaram a prevalência de bacteremia, não necessariamente em imunocomprometidos durante quatro anos (1989-1992), no Sul da Finlândia, e compararam as características dos isolados de sangue e de cultura de espécies de *Lactobacillus* nos laticínios. O estudo incluiu 3.317 culturas de sangue isoladas e nenhum deles correspondeu a uma espécie encontrada nos laticínios. Assim, foi possível concluir que o risco de infecção era extremamente baixo.

Rayes et al.³⁹ conduziram um estudo prospectivo duplo-cego randomizado com 66 pacientes submetidos a transplante hepático em uso de nutrição enteral, na qual um grupo recebeu uma composição de quatro microrganismos probióticos e quatro prebióticos e um outro grupo recebeu somente quatro tipos de prebióticos. Infecções pós-operatórias ocorreram em apenas um paciente do primeiro grupo contra 16 do outro, sendo a maioria por infecção urinária. O autor sugeriu que a prevenção da translocação bacteriana por pré e probióticos foi o principal mecanismo de ação, e que fibras isoladas reduziram a translocação por meio da estimulação do crescimento da microflora comensal e, conseqüentemente, do aumento na produção de ácidos graxos de cadeia curta, que são conhecidos por estabilizar a barreira intestinal e o sistema imune local.

Em pacientes infectados com HIV há poucos relatos de infecção causada por probióticos. Irvine et al.⁴⁰ em um estudo retrospectivo observacional avaliou o uso de iogurtes contendo probióticos em longo prazo em pacientes infectados por HIV para avaliar a função imunitária (contagem de células CD4). Após início do consumo, houve aumento das células CD4 nos pacientes que ingeriram probióticos em comparação aos que não ingeriram, concluindo que os probióticos podiam proporcionar uma intervenção eficaz para retardar a deterioração do sistema imunológico em pacientes com HIV.

Efetividade e segurança em ensaios clínicos

Salminen et al.⁴¹ avaliaram a eficácia e segurança do *Lactobacillus rhamnosus* GG na melhora dos sintomas gastrointestinais em pacientes infectados pelo HIV sob terapia anti-retroviral. Não houve diferenças significativas entre os grupos de tratamento com relação à frequência ou consistência da diarreia, não foram relatados eventos adversos e o número de células CD4 manteve-se estável. Em outro estudo, 24 adultos com HIV com sinais clínicos de diarreia moderada, contagem de CD4 até 200 células/mm³ e sem uso de antirretrovirais ou suplementos alimentares receberam 100 ml de iogurte suplementado ou não durante 15 dias. Os perfis hematológicos, as contagens de células CD4 e a qualidade de vida foram avaliados no início do estudo e em 15 e

30 dias de alimentação com iogurte. Não foi observada alteração significativa nos parâmetros hematológicos de ambos os grupos antes e depois da alimentação com iogurte probiótico.⁴² Para avaliar a segurança e tolerância da ingestão probiótica por indivíduos infectados com HIV, 39 indivíduos consumiram *L. reuteri* ou um placebo durante 21 dias em estudo duplo-cego. Foram coletados dados hematológicos, perfil imunológico, exames de urina e físico, tolerância gastrointestinal e dados microbiota fecais. Não foram observadas alterações significativas em quaisquer dos parâmetros analisados. O autor concluiu que o *L. reuteri* pode ser usado em indivíduos HIV-positivos sem qualquer problema de segurança e tolerância.⁴³

Já em pacientes que recebem suporte nutricional, o uso de probióticos pode apresentar problemas específicos de segurança. Whelan & Myers³¹ investigaram a segurança dos probióticos nessa população em uma revisão sistemática. Como resultado, foram encontrados 20 relatos de eventos adversos em 32 pacientes, os quais se referiam a infecções devidas a *Lactobacillus rhamnosus* GG ou *Saccharomyces boulardii*, sendo os fatores de risco a presença de cateter venoso central e distúrbios associados ao aumento da translocação bacteriana. O efeito dos probióticos foi positivo ou nulo sobre os resultados relacionados com a segurança desses micro-organismos como mortalidade e infecções. Observou-se aumento de complicações, que eram em grande parte não infecciosas e em grupos específicos de doentes (pós-transplante e pancreatite).

DISCUSSÃO

Os probióticos são considerados pela Food and Drug Administration (F.D.A.) como “Geralmente Considerados como Seguros” (*Generally Regarded As Safe* – G.R.A.S.). A designação G.R.A.S. é usada para adjuntos de alimentos que não podem satisfazer a exigência normal de avaliação de segurança, mas têm sido amplamente utilizados sem qualquer prejuízo para os consumidores. Essa nomeação para a maioria dos probióticos tem ofuscado a questão da translocação bacteriana. Isso é importante especialmente nos casos envolvendo cepas específicas, quando a capacidade de translocação pode afetar a saúde de pacientes imunocomprometidos.^{7,44} Salminen et al²⁶ afirmam que possíveis efeitos adversos deveriam ser constantemente apurados e ilustrados na literatura.

Guidelines internacionais como a *American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* (A.S.P.E.N.) recomendam o uso de probióticos, porém, baseados apenas em dois artigos científicos envolvendo pacientes com transplante hepático.⁴⁵ A *Food and Agriculture Organization* (FAO/OMS) recomenda que os probióticos devem ser avaliados por uma série de parâmetros, incluindo padrões de susceptibilidade aos antimicrobianos, produção de toxinas, atividades metabólicas e hemolítica, infecciosidade em modelos animais imunocomprometidos, efeitos colaterais e incidentes adversos em seres humanos. A *European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatitis and Nutrition* (ESPGHAN) resumiu sua abordagem aos probióticos da seguinte forma: “Probióticos até então utilizados em ensaios clínicos podem ser geralmente considerados como seguros. No entanto, a vigilância de possíveis efeitos colaterais, tais como infecções no grupo de alto risco (grupo criticamente doente), está faltando e é necessária”. Embora existam orientações sobre a escolha de espécies de probióticos e na avaliação de sua eficácia e segurança, ainda não há um consenso internacional de

regulamentação de produtos alimentares probióticos.^{36,46,47}

Os micro-organismos probióticos mais relacionados à infecção foram o *Lactobacillus rhamnosus* e o *Saccharomyces boulardii*, porém, a espécie *S. boulardii* não é aprovada pela ANVISA. Sendo assim, o *Lactobacillus rhamnosus* é o microrganismo que necessita maior cautela em sua utilização, principalmente quando seu uso for para o tratamento de diarreia.

De acordo com esta revisão bibliográfica, os desfechos com mortalidade não podem ser relacionados ao uso de suplementos com probióticos, pois embora o micro-organismo isolado tenha sido uma cepa probiótica, os pacientes não receberam suplementação, o que reforça o potencial patogênico desses micro-organismos mesmo endógenos. No entanto, os estudos apontam que pacientes imunocomprometidos apresentam riscos de infecção e recomendam cautela em sua utilização, embora não haja consenso na comprovação dos prejuízos. Os efeitos adversos foram numericamente poucos, porém quando presentes, ocorreram em pacientes submetidos a transplantes, após manipulação dentária, em uso de cateter venoso central, com alteração cardíaca pré-existente e em uso de antibióticos de largo espectro.

Alguns autores questionam se as cepas são endógenas ou ingeridas e avaliaram que essa pergunta não pode ser respondida com facilidade, pois as espécies exatas e subespécies dos isolados não foram determinadas de forma confiável, e muitas vezes não foram aplicados métodos de identificação para discriminar os tipos de micro-organismos.⁴⁸

A abordagem sobre o tema do uso de probióticos em pacientes imunocomprometidos é escassa e poucos estudos foram realizados a fim de avaliar a eficácia e segurança desse produto nessa população.

Uma das limitações encontradas neste estudo foi a escassez de ensaios randomizados sobre a segurança do uso de probiótico, especificamente em imunocomprometidos, sendo registrados apenas em alguns estudos de casos ou em parte de estudos com diversas patologias. Nos casos encontrados, nem todas as mortes foram comprovadamente decorrentes de infecção de microrganismos ingeridos, dificultando a avaliação dos probióticos. Outra limitação foi a falta de informação sobre a quantidade de probióticos ingerida ou sua espécie.

Apesar dos benefícios promovidos pelos probióticos, deve ser realizada uma análise de risco-benefício individual e vigilância de rotina para eventos adversos quando utilizados em pacientes com comprometimento imunológico

CONCLUSÃO

Diante dos relatos encontrados na literatura sobre o risco de infecções por micro-organismos probióticos em pacientes imunocomprometidos é prudente evitar o uso desse tipo de suplemento nessa população. Embora não haja comprovação efetiva de prejuízos a imunocomprometidos, o uso de probióticos pode trazer riscos para essa população, de modo que se recomenda observação e cautela na sua indicação e avaliação cuidadosa dos efeitos adversos.

Pesquisas futuras devem investigar os mecanismos pelos quais a flora intestinal interage com o epitélio intestinal na saúde e na doença. Também deve ser considerado o acompanhamento de pacientes em uso de probióticos e ensaios clínicos nessa população, observando eventos adversos relacionados a algum micro-organismo específico, cuja utilização deva ser claramente contraindicada.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer aos nossos familiares por todo apoio para a conclusão deste trabalho, ao Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela colaboração e a todos aqueles que, de uma forma direta ou indiretamente, colaboraram com este estudo.

ABSTRACT

Despite numerous benefits sponsored by probiotics, there are reports in the literature of infections associated to its use and the immunocompromise can be a risk factor for its developing. Aiming to verify the safety of ingestion of probiotics by immunocompromised patients, literature review was performed using sources from MEDLINE / PubMed, SciELO, LILACS and Scirus, followed by cross-reference search. It was selected 12 articles with 21 case reports of infections, particularly bacteremia and fungemia by probiotics in patients with some type of immunocompromise. The adverse events, whenever they were present mainly occur in post-transplant patients, after dental manipulation, use of central venous catheter, pre-existing cardiac abnormality and use of broad spectrum antibiotics. Thereby, although there is no effective proof of damages to immunocompromised patients, using probiotics may pose risks to such population, so that it is recommended observation and caution in its indications, and careful evaluation of adverse effects.

Keywords: Probiotics, Safety, Immunity, Infection, Transplantation

REFERÊNCIAS:

1. Nogueira JCR, Gonçalves MCR. Probióticos - Revisão da Literatura. Rev. Bras. de Ciências da Saúde. 2011;15(4):487-92.
2. Fuller R. Probiotics in human medicine. Gut; 1991;32:439-42.
3. Szajewska H, Setty M, Mrukowicz J, Guandalini S. Probiotics in gastrointestinal diseases in children: hard and not-so-hard evidence of efficacy. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2006;42(5):454-75.
4. Damião AOMC. Prebióticos, Probióticos e Simbióticos da diarreia aguda. [Acesso em: 7 Abril 2012]. Disponível em: http://www.medcenter.com/Medscape/infosites/Nestle/pdf/FiberMais_Flora.pdf
5. Coppola MM, Turnes CG. Probióticos e resposta imune. Ciência Rural. 2004;34(4):297-1303.
6. Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos . IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas, Julho, 2008. [Acesso em: 29 de Março de 2012]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm.
7. Min-Tze L. Safety of probiotics: translocation and infection. Nut Rev. 2008; 66(4):192-202.
8. Mackay AD, Taylor MB, Kibbler CC, Hamilton-Miller JMT. Lactobacillus endocarditis caused by a probiotic organism. Clin. Microbiol. Infect. 1999;5:290-2.
9. Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang MLK. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? Am J Clin Nutr. 2006;83:1256-64.
10. Antony SJ. Lactobacilemia: An emerging cause of infection in both the immunocompromised and the immunocompetent host. J. Natl Med Assoc. 2000;92:83-86.
11. Fradiani PA, Petrucca A, Ascenzioni F, Di Nucci G, Teggi A, Bilancini S et al. Endocarditis caused by Lactobacillus jensenii in an immunocompetent patient. J Med Microbiol. 2010;59:607-9.
12. Snyderman DR. The Safety of Probiotics. Clin Infect Dis. 2008;46:S104-111.
13. Williams NT. Probiotics - Clinical Review. Am J Health-Syst Pharm. 2010;67:449-58.
14. Riquelme AJ, Calvo MA, Guzmán AM, Depix MS, García P, Pérez C et al. Saccharomyces cerevisiae fungemia After Saccharomyces boulardii Treatment in Immunocompromised Patients. J Clin Gastroenterol. 2003;36(1):41-3.
15. Kalima P, Masterton RG, Roddie PH, Thomas AE. Lactobacillus rhamnosus Infection in a Child Following Bone Marrow Transplant. J Infect. 1996;32:165-7.
16. Husni RN, Gordon SM, Washington JA, Longworth DL. Lactobacillus bacteremia and endocarditis: review of 45 cases. Clin Infect Dis. 1997;25:1048-55.
17. Fruchart C, Salah A, Gray C, Martin E, Stamatoullas A, Bonmarchand G, et al. Lactobacillus Species as Emerging Pathogens in Neutropenic Patients. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1997;16:681-4.
18. Antony SJ, Charles W, Stratton J, Dummer S. Lactobacillus Bacteremia: Description of the clinical course in adult patients without endocarditis. Clin Infect Dis. 1996;23:773-8.
19. Cesaro S, Chinello P, Rossi L, Zanesco L. Saccharomyces cerevisiae fungemia in a neutropenic patient treated with Saccharomyces boulardii. Support Care Cancer 2000;8:504-5.
20. Schlegel L, Lemerle S, Geslin P. Lactobacillus species as opportunistic pathogens in immunocompromised patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1998;17:887-8.
21. Hennequin C, Kauffmann-Lacroix C, Jobert A, Viard JP, Ricour C, Jacquemin JL et al. Possible role of catheters in Saccharomyces boulardii fungemia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000;19:16-20.
22. Bassetti S, Frei R, Zimmerli W. Fungemia with Saccharomyces cerevisiae after treatment with Saccharomyces boulardii. Am J Med. 1998;105:71-2.
23. MacGregor G, Smith AJ, Thakker B, Kinsella J. Yoghurt biotherapy: contraindicated in immunosuppressed patients? Postgrad Med J 2002;78:366-7.
24. Zê-Zê L, Tenreiro R, Duarte A, Salgado MJ, Melo-Cristino M, Lito L et al. Case of aortic endocarditis caused by Lactobacillus casei. J Med Microbiol. 2004;53:451-3.

25. Fredenucci I, Chomarat M, Boucaud C, Flandrois JP. *Saccharomyces boulardii* fungemia in a patient receiving Ultra-levure therapy. *Clin Infect Dis*. 1998;27:222–3.
26. Salminen MK, Rautelin H, Tynkkynen S, Poussa T, Saxelin M, Valtonen V et al. *Lactobacillus* Bacteremia, Clinical Significance, and Patient Outcome, with Special Focus on Probiotic *L. Rhamnosus* GG. *Clin Infect Dis*. 2004;38:62–9.
27. Land MH, Rouster-Stevens K, Woods CR, Cannon ML, Cnota J, Shetty AK. *Lactobacillus* sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics*. 2005;115(1):178–81.
28. Makaryus AN, Yang R, Hahn RT, Kort S. A Rare Case of *Lactobacillus acidophilus* Presenting as Mitral Valve Bacterial Endocarditis. *Echocardiography*. 2005;22(5):421–5.
29. Marteau PR. Probiotics in Clinical Conditions. *Clin Rev Allergy and Immunol*. 2002;22:255–73.
30. Presterl E, Kneifel W, Mayer HK, Zehetgruber M, Makristathis A, Graninger W. Endocarditis by *Lactobacillus rhamnosus* due to Yogurt Ingestion? *Scand J Infect Dis*. 2001;33:710–4.
31. Whelan K, Myers CE. Safety of probiotics in patients receiving nutritional support: a systematic review of case reports, randomized controlled trials, and nonrandomized trials. *Am J Clin Nutr*. 2010;91:687–703.
32. Carretto E, Barbarini D, Marzani FC, Fumagalli P, Monzillo V, Marone P et al. Catheter-related Bacteremia due to *Lactobacillus rhamnosus* in a Single-lung Transplant Recipient. *Scand J Infect Dis*. 2001;33:780–2.
33. Jones SD, Fullerton DA, Zamora MR, Badesch DB, Campbell DN, Grover FL. Transmission of *Lactobacillus* Pneumonia by a Transplanted Lung. *Ann Thorac Surg*. 1994;58:887–9.
34. Luong ML, Sareyyupoglu B, Nguyen MJ, Silveira FP, Shields RK, Potoski BA, et al. *Lactobacillus* probiotic use in cardiothoracic transplant recipients: a link to invasive *Lactobacillus* infection? *Transpl Infect Dis*. 2010;12:561–4.
35. Knight DJW, Ala' Aldeen D, Bengmark S, Girling KJ. The effect of synbiotics on gastrointestinal flora in the critically ill. *Br J Anaesth*. 2004;92:307–8.
36. Singhi SC, Baranwal A. Probiotic Use in the Critically ILL. *Indian J Pediatr*. 2008;75:621–7.
37. Cannon JP, Lee TA, Bolanos JT, Danziger LH. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24:31–40.
38. Saxelin M, Chuang N, Chassy B, Rautelin H, Makeui PH, Salminen S, et al. *Lactobacilli* and Bacteremia in Southern Finland, 1989–1992. *Clin Infect Dis*. 1996;22:564–6.
39. Rayes NA, Seehofer D, Theruvatha T, Schillerb RA, Langrehra JM, Jonasa S, et al. Supply of Pre- and Probiotics Reduces Bacterial Infection Rates After Liver Transplantation— A Randomized, Double-Blind Trial. *Am J Transplant*. 2005;5:125–30.
40. Irvine SL, Hummelen R, Hekmat S, Looman CWN, Habbema JDF, Reid G. Probiotic Yogurt Consumption is Associated With an Increase of CD4 Count Among People Living With HIV/AIDS. *J Clin Gastroenterol*. 2010;44:e201–5.
41. Salminen MK, Tynkkynen S, Rautelin H, Poussa T, Saxelin M, Ristola M, et al. The efficacy and safety of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG on prolonged, noninfectious diarrhea in HIV Patients on antiretroviral therapy: a randomized, placebo-controlled, crossover study. *HIV Clin Trials*. 2004;5(4):183–91.
42. Anukam KC, Osazuwa EO, Osadolor HB, Bruce AW, Reid G. Yogurt containing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. reuteri* RC-14 helps resolve moderate diarrhea and increases CD4 count in HIV/AIDS patients. *J Clin Gastroenterol*. 2008;3(42):239–43.
43. Wolf BW, Wheeler KB, Ataya DG, Garleb KA. Safety and Tolerance of *Lactobacillus reuteri* Supplementation to a Population Infected with the Human Immunodeficiency Virus. *Food Chem Toxicol*. 1998;36:1085–94.
44. Food and Agriculture Organization. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food 2002. [Acesso em 23 outubro 2012]. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>
45. American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (ASPEN). Guidelines for the Provision and Assessment of Nutrition Support Therapy in the Adult Critically Ill Patient: Society of Critical Care Medicine (SCCM) and JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2009;33(3).
46. European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatitis and Nutrition (ESPGHAN) Committee on Nutrition. Probiotic bacteria in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38:365–74.
47. Senok AC, Ismael AY, Botta GA. Probiotics: facts and myths. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11(12):958–66.
48. Sipsas SV, Zonios DI, Kordossis T. Safety of *Lactobacillus* strains used as probiotic agents. *Clin Infect Dis* 2002;34:1283–4.

NORMAS DE PUBLICAÇÃO

O JBT - Jornal Brasileiro de Transplantes, ISSN 1678-3387, órgão oficial da ABTO - Associação Brasileira de Transplante de Órgãos, destina-se à publicação de artigos da área de transplante e especialidades afins, escritos em português, inglês ou espanhol.

Os manuscritos submetidos à Revista, que atenderem às “Instruções aos Autores” e estiverem de acordo com a política Editorial da Revista, após aprovação pelo Conselho Editorial, serão encaminhados para análise e avaliação de dois revisores, sendo o anonimato garantido em todo o processo de julgamento. Os comentários serão devolvidos aos autores para as modificações no texto ou justificativas de sua conservação. Somente após aprovação final dos editores e revisores, os trabalhos serão encaminhados para publicação. Serão aceitos Artigos Originais, Artigos de Revisão, Apresentação de Casos Clínicos, Cartas ao Editor, Ciências Básicas Aplicadas aos Transplantes, Opinião Técnica, Prós e Contras, Imagem em Transplante e Literatura Médica e Transplantes.

ARTIGOS ORIGINAIS

São trabalhos destinados à divulgação de resultados da pesquisa científica. Devem ser originais e inéditos. Sua estrutura deverá conter os seguintes itens: Resumo (português e inglês), Introdução, Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências. Devem ter, no máximo, 45 referências.

ARTIGOS DE REVISÃO

Constituem da avaliação crítica e sistemática da literatura sobre um assunto específico, podendo ser: Revisão Acadêmica, Revisão de Casos, Revisões Sistemáticas, etc. O texto deve esclarecer os procedimentos adotados na revisão, a delimitação e os limites do tema, apresentar conclusões e ou recomendações e ter, no máximo, 60 referências.

APRESENTAÇÃO DE CASOS CLÍNICOS

Relata casos de uma determinada doença, descrevendo seus aspectos, história, condutas, etc... incluindo breve revisão da literatura, com 20 referências, no máximo.

CARTAS AO EDITOR

Tem por objetivo discutir trabalhos publicados na revista ou relatar pesquisas originais em andamento. Devem ter, no máximo, três laudas e cinco referências.

CIÊNCIAS BÁSICAS APLICADAS AO TRANSPLANTE

Artigos de revisão sobre temas de ciência básica, cujo conhecimento tem repercussão clínica relevante para Transplantes. Devem ter, no máximo, dez laudas e 15 referências e serão feitas apenas a convite do JBT.

OPINIÃO TÉCNICA

Destina-se a publicar uma resposta a uma pergunta de cunho prático através de opinião de um especialista (Quem? Quando? Como? Onde? Por quê?). Devem ter, no máximo, seis laudas e apresentarem até quinze referências.

PRÓS E CONTRAS

Frente a uma questão, dois autores serão escolhidos pela editoria do JBT, para discutirem os aspectos positivos e os negativos de um assunto controverso. São dois autores, um escrevendo a favor e o outro contra uma determinada proposição. Cada autor deve escrever no máximo três laudas e cinco referências.

IMAGEM EM TRANSPLANTE

Uma imagem relacionada a Transplante, patognomônica, típica, de US, RX, CT, RNM, foto de cirurgia, microscopia, sinal clínico, etc., seguida de um texto curto, explicativo, com, no máximo, 15 linhas e cinco referências.

LITERATURA MÉDICA E TRANSPLANTES

Um artigo original de qualquer área médica, incluindo transplantes, que seja importante para o conhecimento do médico transplantador, poderá ser revisado, e o resumo do trabalho original será publicado, seguido de um pequeno resumo comentado ressaltando sua importância. O resumo deve ter até duas laudas e apresentar a referência completa do trabalho. Autores serão convidados para esse tipo de publicação, mas poderão ser considerados para publicação no JBT trabalhos enviados sem convites quando considerados relevantes pelos editores.

PONTO DE VISTA

Temas sobre transplantes de órgãos ou tecidos, elaborados por autores da área, convidados pela editoria da revista. Deverão conter 1.200 palavras, no máximo.

ESPECIAL

Artigo, Documento, Trabalho, Parecer, que não se enquadre em nenhuma das especificações acima, publicado apenas por convite da Revista ou após parecer da Editoria, mas que venha trazer à comunidade transplantadora, informações de grande importância, e portanto, sem necessidade de seguir as normas clássicas da revista.

As normas que se seguem, devem ser obedecidas para todos os tipos de trabalhos e foram baseadas no formato proposto pelo International Committee of Medical Journal Editors e publicado no artigo: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Ann Intern Med 1997;126:36-47, e atualizado em outubro de 2001. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org>

NORMAS PARA ELABORAÇÃO DO MANUSCRITO

Requisitos técnicos

- O trabalho deverá ser digitado em espaço duplo, fonte Arial tamanho 12, margem de 2,5 cm de cada lado, com páginas numeradas em algarismos arábicos, na sequência: página de título, resumos e descritores, texto, agradecimentos, referências, tabelas e legendas.
- Permissão à ABTO para reprodução do material.
- Declaração que o manuscrito não foi submetido a outro periódico,
- Aprovação de um Comitê de Ética da Instituição onde foi realizado o trabalho, quando referente a trabalhos de pesquisa envolvendo seres humanos.
- Termo de responsabilidade do autor pelo conteúdo do trabalho e de conflitos de interesses que possam interferir nos resultados.

Observações:

- Com exceção do item “a”, os documentos acima deverão conter a assinatura do primeiro autor, que se responsabiliza pela concordância dos outros co-autores.
- Há em nosso site, modelo de carta para acompanhar os trabalhos, onde já constam as informações referentes aos itens b, c, d, e.

Após as correções sugeridas pelos revisores, a forma definitiva do trabalho deverá ser encaminhada, preferencialmente, por e-mail ou, uma via impressa, acompanhada de CD-ROM. Os originais não serão devolvidos. Somente o JBT-Jornal Brasileiro de Transplantes poderá autorizar a reprodução em outro periódico, dos artigos nele contidos.

PREPARO DO MANUSCRITO

A página inicial deve conter:

- Título do artigo, em português (ou espanhol) e inglês, sem abreviaturas; que deverá ser conciso, porém informativo;
- Nome de cada autor - sem abreviatura, afiliação institucional e região geográfica (cidade, estado, país);
- Nome, endereço completo, telefone e e-mail do autor responsável;
- Fontes de auxílio à pesquisa, se houver.

RESUMO E ABSTRACT

Para os artigos originais, os resumos devem ser apresentados no formato estruturado, com até 350 palavras destacando: os objetivos, métodos, resultados e conclusões. Para as demais seções, o resumo pode ser informativo, porém devendo constar o objetivo, os métodos usados para levantamento das fontes de dados, os critérios de seleção dos trabalhos incluídos, os aspectos mais importantes discutidos, as conclusões e suas aplicações.

Abaixo do resumo e abstract, especificar no mínimo três e no máximo dez descritores (keywords), que definam o assunto do trabalho. Os descritores deverão ser baseados no DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) publicado pela Bireme que é uma tradução do MeSH (Medical Subject Headings) da National Library of Medicine e disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br>.

Os resumos em português (ou espanhol) e inglês deverão estar em páginas separadas. Abreviaturas devem ser evitadas.

TEXTO

Iniciando em nova página, o texto deverá obedecer à estrutura exigida para cada tipo de trabalho (vide acima). Com exceção de referências relativas a dados não publicados ou comunicações pessoais, qualquer informação em formato de “notas de rodapé” deverá ser evitada.

AGRADECIMENTOS

Após o texto, em nova página, indicar os agradecimentos às pessoas ou instituições que prestaram colaboração intelectual, auxílio técnico e ou de fomento, e que não figuraram como autor.

REFERÊNCIAS

As referências devem ser numeradas consecutivamente, na mesma ordem em que foram citadas no texto e identificadas com números arábicos, sobrescritos, após a pontuação e sem parênteses.

A apresentação deverá estar baseada no formato denominado “Vancouver Style”, conforme exemplos abaixo, e os títulos de periódicos deverão ser abreviados de acordo com o estilo apresentado pela List of Journal Indexed in Index Medicus, da National Library of Medicine e disponibilizados no endereço:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/linkout/journals/jourlists.cgi?typeid=1&type=journals&operation=Show>

Para todas as referências, cite todos os autores até seis. Acima de seis, cite os seis primeiros, seguidos da expressão et al.

Alguns exemplos:

ARTIGOS DE PERIÓDICOS

Donckier V, Loi P, Closset J, Nagy N, Quertinmont E, Lê Moine O, et al. Preconditioning of donors with interleukin-10 reduces hepatic ischemia-reperfusion injury after liver transplantation in pigs. *Transplantation*. 2003;75:902-4.

Papini H, Santana R, Ajzen, H, Ramos, OL, Pestana, JOM. Alterações metabólicas e nutricionais e orientação dietética para pacientes submetidos a transplante renal. *J Bras Nefrol*. 1996;18:356-68.

RESUMOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

Raia S, Massarollo PCP, Baia CESB, Fernandes AONG, Lallee MP, Bittencourt P et al. Transplante de fígado “repique”: receptores que também são doadores [resumo]. *JBT J Bras Transpl*. 1998;1:222.

LIVROS

Gayotto LCC, Alves VAF. Doenças do fígado e das vias biliares. São Paulo: Atheneu; 2001.

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical microbiology. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.

CAPÍTULOS DE LIVROS

Raia S, Massarollo PCB. Doação de órgãos. In: Gayotto LCC, Alves VAF, editores. Doenças do fígado e das vias biliares. São Paulo: Atheneu; 2001. p.1113-20.

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. The genetic basis of human cancer. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

Sokal EM, Cleghorn G, Goulet O, Da Silveira TR, McDiarmid S, Whittington P. Liver and intestinal transplantation in children: Working Group Report

[Presented at 1st World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 35 Suppl 2:S159-72.

TESES

Couto WJ. Transplante cardíaco e infecção [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2000.

Pestana JOM. Análise de ensaios terapêuticos que convergem para a individualização da imunossupressão no transplante renal [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2001.

DOCUMENTOS ELETRÔNICOS

Matsuyama M, Yoshimura R, Akioka K, Okamoto M, Ushigome H, Kadotani Y, et al. Tissue factor antisense oligonucleotides prevent renal ischemia reperfusion injury. *Transplantation* [serial online] 2003 [cited 2003 Aug 25];76:786-91. Available from: URL: <http://gateway2.ovid.com/ovidweb.cgi>.

HOMEPAGE

Cancer-Pain.org [homepage na Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [atualizada em 2002 May 16; acesso em 2002 Jul 9]. Disponível em: <http://www.cancer-pain.org/>

PARTE DE UMA HOMEPAGE

American Medical Association [homepage na Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [atualizada em 2001 Aug 23; acesso em 2002 Aug 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [aproximadamente 2 telas]. Disponível em: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

Obs: Dados não publicados, comunicações pessoais, deverão constar apenas em “notas de rodapé”. Trabalhos enviados para a revista devem ser citados como trabalhos no “prelo”, desde que tenham sido aceitos para publicação. Deverão constar na lista de Referências, com a informação: [no prelo] no final da referência, ou [in press] se a referência for internacional.

TABELAS, FIGURAS, E ABREVIATURAS

Tabelas

Devem ser confeccionadas com espaço duplo. A numeração deve ser seqüencial, em algarismos arábicos, na ordem que foram citadas no texto. Devem ter título, sem abreviatura, e cabeçalho para todas as colunas. No rodapé da tabela deve constar legenda para abreviaturas e testes estatísticos utilizados. Devem ser delimitadas, no alto e embaixo por traços horizontais; não devem ser delimitadas por traços verticais externos e o cabeçalho deve ser delimitado por traço horizontal. Legendas devem ser acompanhadas de seu significado. No máximo, quatro tabelas deverão ser enviadas.

Figuras (gráficos, fotografias, ilustrações)

As figuras devem ser enviadas no formato JPG ou TIF, com resolução de 300dpi, no mínimo. Ilustrações extraídas de outras publicações deverão vir acompanhadas de autorização por escrito do autor/editor, constando na legenda da ilustração a fonte de onde foi publicada. As figuras deverão ser enviadas em branco e preto.

Abreviaturas e Siglas

Devem ser precedidas do nome completo quando citadas pela primeira vez. Nas legendas das tabelas e figuras, devem ser acompanhadas de seu significado. Não devem ser usadas no título.

ENVIO DO MANUSCRITO

Os trabalhos devem ser enviados através do e-mail: abto@abto.org.br