

INFLUÊNCIA DO PROTOCOLO TRANSFUSIONAL SOBRE ALGUNS PARÂMETROS DE REACTIVIDADE IMUNOLÓGICA EM DOENTES SUBMETIDOS A DIÁLISE PERIÓDICA

J. PRATAS E SOUSA, RAUL MARTINS, OSCAR TELLECHEA, ROSÁRIO VIRGÍNIA FERREIRA, FILOMENA C. OLIVEIRA, H. BREDÁ COIMBRA, ADELINO MARQUES

Serviço de Nefrologia dos H.U.C. Serviço de Dermatologia dos H.U.C. Centro de Histocompatibilidade do Centro. Centro de Imunologia da Faculdade de Medicina de Coimbra. Faculdade de Medicina de Coimbra.

RESUMO

Apresentam-se e discutem-se os resultados preliminares de um estudo efectuado em 44 doentes com insuficiência renal crónica em hemodiálise, com o objectivo de caracterizar o seu tipo de reactividade imunológica, com relevo para o grau de imunocompetência celular, procurando, fundamentalmente, determinar qual a influência dos programas transfusionais nas alterações do seu perfil imunológico.

As provas laboratoriais utilizadas são: teste cutâneos (DNCB, *Multitest*); caracterização da população linfocitária T e B; doseamento das imunoglobulinas séricas; pesquisa de anti-corpos citotóxicos (B, T, B + T) face a um painel de cerca de 30 populações linfocíticas diferentes.

Os resultados mostram uma diminuição da imunoreactividade celular traduzida pela redução da hipersensibilidade do tipo retardado (*Multitest* e DNCB) que é mais acentuada nos doentes submetidos a transfusões sanguíneas.

Esta diminuição da reactividade celular não encontra paralelismo com o grau de sensibilidade do tipo humoral traduzida pela percentagem de anticorpos citotóxicos.

SUMMARY

Influence of the transfusional protocol on parameters of immunological reactivity in patients submitted to chronic hemodialysis

The authors present and discuss the preliminary results of a study made on 44 patients with chronic renal failure on hemodialysis. The goal of the study was to define their type of immunological reactivity, stressing the level of cellular immunocompetence, trying especially to determine what is the influence of blood transfusions on their immunologic profile.

The patients were evaluated by the followings assays: skin tests (DNCB, *Multitest*); typing of T and B lymphocytic populations; measurement of plasma immunoglobulins; search of cytotoxic antibodies after contact with 30 different lymphocytic populations.

The results show a break in the cellular immunoreactivity of these patients as shown by a lowering of delayed hypersensitivity (*Multitest* and DNCB) which is more marked in those submitted to blood transfusions.

This lowering of the cellular reactivity is not parallel to the degree of humoral sensitivity as expressed by the percentage of cytotoxic antibodies.

INTRODUÇÃO

O nível de reactividade imunológica encontra-se, em regra, significativamente diminuído nos doentes com Insuficiência Renal Terminal. Os mecanismos responsáveis pelo reduzido grau de imunocompetência encontrado nestes doentes não são inteiramente conhecidos e têm sido objecto de numerosos trabalhos.^{4, 7, 9, 15, 18, 19, 24, 25} Deles ressalta a preocupação de definir quais os principais aspectos da resposta imunológica que

se encontram mais significativamente alterados e quais os parâmetros de imuno-reatividade que poderão definir o tipo de resposta a um futuro transplante renal.^{4, 13, 24, 25}

Assim, parece haver uma crescente evidência de que a resposta imunológica dos doentes ao rim transplantado pode ser liminarmente previsível pela avaliação do nível de imunocompetência expresso através de alguns estudos e exames, nomeadamente^{6, 13, 24, 21}; caracterização da população linfocitária; tipo de resposta linfocitária a estímulos mitogénicos; grau de hipersensibilidade retardada face a testes cutâneos com antígenos microbianos e ao DNCB (Dinitro clorobenzeno).

Por outro lado, é hoje reconhecido o papel das transfusões

Comunicação ao 6.º Simpósio Português de Nefrologia (Porto 13, 14, 15 de Dezembro de 1984)

sanguíneas na melhoria da sobrevida do rim transplantado: a maioria dos resultados conhecidos apontam para um significativo aumento da percentagem de rejeições em grupos de doentes que nunca receberam qualquer transfusão, quando comparados com outros grupos submetidos a programas transfusionais^{2, 3, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 20, 24}. Contudo os mecanismos que justificariam esta diferença e explicariam a razão do efeito benéfico das transfusões não são bem conhecidos, adiantando-se, como hipóteses mais prováveis^{8, 11, 12, 13, 16, 20, 22, 23}; as transfusões sanguíneas permitiriam diferenciar os doentes em reactivos e não reactivos; factores humorais, como o aumento de anticorpos anti-idiotípicos, teriam um efeito imunossupressor; ultimamente tem ganho crescente favor a hipótese de as transfusões sanguíneas induzirem o aumento de células supressoras não específicas^{11, 12, 22, 23}

No trabalho que estamos a efectuar e do qual vamos apresentar alguns resultados preliminares estudámos um grupo de 44 doentes com Insuficiência Renal Terminal em programa de hemodiálise periódica, com o objectivo de caracterizar o seu tipo de reactividade imunológica, com relevo para o seu grau de imunocompetência celular, procurando, fundamentalmente, determinar qual a influência dos programas transfusionais nas alterações do seu perfil imunológico.

MATERIAL E MÉTODOS

População estudada

Estudamos 44 doentes com Insuficiência Renal Terminal em programa de hemodiálise periódica, com as seguintes características:

- SEXO: 31 doentes do sexo masculino (70,5%)
- 13 doentes do sexo feminino (29,5%)
- IDADE dos doentes: Média 51 anos (21 — 72 anos)
- TEMPO em tratamento hemodialítico: Média 22,7 meses (1 — 52 meses)
- ETIOLOGIA DA INSUFICIÊNCIA RENAL:
 - Nefropatia intersticial crónica11 doentes (25%)
 - Nefropatia glomerular crónica 6 doentes (13,5%)
 - Nefroangiosclerose 6 doentes (13,5%)
 - Nefropatia intersticial litiásica 4 doentes (9,0%)
 - Hipoplasia renal bilateral 1 doente (2,3%)
 - Nefropatia glomerular por L.E.D. .. 1 doente (2,3%)
 - Poliquistose renal 1 doente (2,3%)
 - Indeterminada14 doentes (35%)

- NÚMERO de transfusões administradas (sangue total ou sedimento eritrocítico):
 - 0 Transfusões — 10 doentes (23%)
 - 1-4 Transfusões — 20 doentes (45%)
 - ≥ 5 Transfusões — 14 doentes (32%)

A maioria dos doentes fazia 3 sessões semanais de hemodiálise com a duração de 4 horas e os rins artificiais utilizados eram de superfície capilar variando entre 0,9 m² e 1,4 m².

Apenas 1 doente era AgHbs +.

Nota: A análise estatística dos resultados (teste das diferenças de proporções) foi efectuado no Centro de Cálculo da Zona Centro.

ESTUDOS E EXAMES EFECTUADOS

Determinação do n.º absoluto de linfócitos e da população linfocitária procurando quantificar a percentagem de linfócitos T através da identificação das rosetas E totais e das rosetas E activas. Os linfócitos B foram quantificados atra-

vés da sua identificação pelas imunoglobulinas de membrana.

Avaliação da hipersensibilidade retardada utilizando os seguintes testes cutâneos:

— MULTITESTE (Instituto Mérieux), que permite testar a resposta a 7 antígenos diferentes. A leitura dos resultados, executada sempre pelo mesmo observador (O.T.), foi feita às 48 horas; foram medidos os diâmetros das pápulas cutâneas provocadas pelos diferentes antígenos e exprimiui-se o resultado global pela média aritmética desses diâmetros. (Fig. 1)

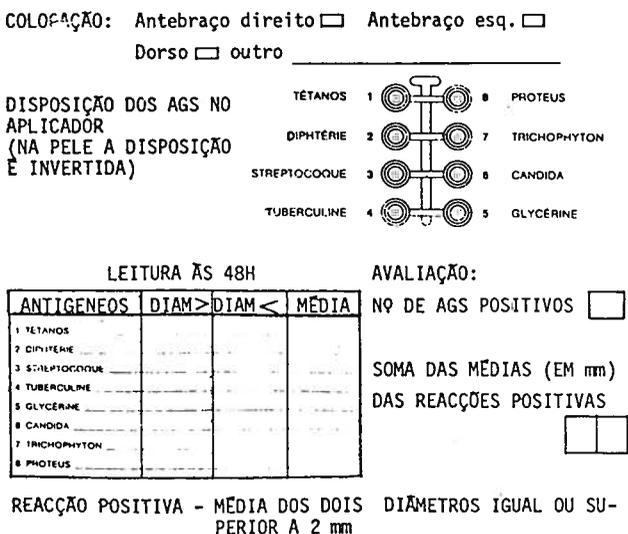


Figura 1 — Modelo da ficha utilizada (MULTITEST)

— D.N.C.B. (Dinitroclorobenzeno: é um hapteno pouco disseminado e por consequência com fraca possibilidade de ter sensibilizado a população em estudo, permitindo assim o desencadeamento de um resposta primária e uma mais precisa avaliação da capacidade reactiva individual^{1, 17}.

No nosso estudo aplicamos, em injeção intradérmica, uma dose sensibilizadora de 0,1 ml a 3% e uma dose de revelação de 0,1 ml a 0,1%, dividindo os doentes em duas classes, conforme a resposta obtida:

— Doentes não reactivos: sem lesão cutânea (0) ou só com eritema (+)

— Doentes reactivos: com pápula cutânea (+ +); pápula + vesiculação (+ + +).

Determinação das imunoglobulinas séricas (IgG, IgM e IgA) pelo método de imunodifusão radial.

Pesquisa de anticorpos citotóxicos com determinação do grau de sensibilização (em percentagem):

Fez-se passar o soro de cada doente por um painel de 30 populações linfocitárias diferentes, usando a técnica da linfotoxicidade, efectuado a 4º e a 37°C.

Pesquisaram-se: anticorpos anti-linf. T e B; anticorpos anti-linf. T; anticorpos anti-linf. B.

Os resultados foram expressos em percentagem (Quadro I)

QUADRO I

Anticorpos Citotóxicos T e B (%)

0	17
3 - 9%	18
10 - 20%	9

RESULTADOS

No estudo da população linfocitária dos 44 doentes obtivemos os seguintes resultados médios:

N.º absoluto de linfócitos:

1.539/mm³ (N.1500-4000).

Este resultado situou-se nos limites inferiores da normalidade.

Linfócitos T: Rosetas E.T.: 61% (N.60 — 75%)
 Rosetas E. Act: 41% (N.25 — 40%)
 Linfócitos B: 13% (N.12 — 25%)

A percentagem de linfócitos T (Rosetas E Totais e Rosetas E Activas) situou-se dentro dos valores normais, o mesmo acontecendo em relação à percentagem de linfócitos B (obtida após a exclusão dos macrófagos).

Aliás estes dados estão de acordo com os referidos pela maioria dos autores.

Doseamento das imunoglobulinas:

Ig G. 2.170 mg/dl (N 1050 — 1800 mg/dl)
 Ig A. 269 mg/dl (N 100 — 450 mg/dl)
 Ig M. 172 mg/dl (N 60 — 250 mg/dl)

Testes de hipersensibilidade retardada:

Multitest

Dos 44 doentes examinados, 10 (23%) mostraram-se anérgicos; os restantes 34 evidenciaram respostas positivas expressas por um diâmetro médio das pápulas de 5,4 mm.

Tomámos, como ponto de referência, um estudo efectuado pelo Instituto Mériex num grupo de 652 pessoas sem doença imunológica conhecida. Verificámos que a proporção de doentes anérgicos no nosso grupo é significativamente maior que a registada por aquele estudo (Quadro II).

QUADRO II

MULTITEST

	ESTUDO		CONTROLO
Efectivo Total	44		652
Anérgicos	10	p <0,05	46

QUADRO III

Multitest e número de transfusões

N.º de transfusões	0	1-4	≥ 5
Total de doentes	10	20	14
Doentes anérgicos	1 (100%)§	5 (25%)	4 (28,6%)
Dimensão média das pápulas (mm)	5,4	6,0	4,5

§: p<0,05

Verificámos ainda que a dimensão média das pápulas dos nossos doentes reactivos foi substancialmente menor que no grupo testemunho (5,4 contra 16,2 mm).

As variações da resposta ao Multitest em função do número de transfusões encontra-se expressa no (Quadro III).

Verificou-se que o grupo de doentes não transfundidos apresentou uma frequência de anergias significativamente menor que os grupos de doentes submetidos a transfusões sanguíneas.

Não se verificou porém diferença significativa entre o grupo de doentes com 1 a 4 transfusões e o dos doentes com mais de 5 transfusões.

Quanto às médias das dimensões das pápulas, não houve diferenças significativas entre os três grupos de doentes estudados.

Procurámos ainda, averiguar uma eventual diferença na resposta ao Multitest consoante o tempo de diálise, para o que dividimos os doentes em 3 grupos:

- Doentes com menos de 1 ano de diálise
- Doentes com 1-2 anos de diálise
- Doentes com mais de 2 anos de diálise.

Os resultados obtidos estão expresos no (Quadro IV); não se registaram diferenças significativas entre os três sub-grupos de doentes.

QUADRO IV

Multitest e tempo de diálise

Tempo de diálise	<1 ano	1-2 anos	>2 anos
Total de doentes	10	14	20
Doentes anérgicos	2 (20%)	2 (14,3%)	4 (20%)
Dimensão da pápula	7,1	5,0	4,8

DNCNB

Os resultados obtidos com este teste cutâneo estão expresos no (Quadro V), utilizando, como referência, um estudo efectuado por A. Santos Pinto e Arala Chaves num grupo de 35 indivíduos normais¹⁷.

Como se pode verificar, a proporção de doentes não reactivos é significativamente maior no grupo de doentes insuficientes renais em tratamento hemodialítico.

Quanto à variação de respostas ao DNCB face ao n.º de transfusões (Quadro VI) os resultados obtidos foram semelhantes aos do Multitest: o número de doentes não reactivos é significativamente maior nos grupos de doentes transfundidos, não se verificando todavia diferença significativa entre os doentes submetidos a 1-4 transfusões e os doentes a mais de 5 transfusões.

Também não se verificam diferenças significativas na resposta ao DNCB em função do tempo de diálise (Quadro VII).

Anticorpos citotóxicos

A percentagem de anticorpos citotóxicos na população de doentes estudada está expressa no (Quadro VIII).

A comparação dos níveis de anticorpos citotóxicos em função do número de transfusões mostra a existência de uma evidente ligação de sentido positivo entre essas duas variáveis (χ^2 calculado: 4,75; p <0,05 mas o seu significado é comprometido pelos baixos efectivos parcelares), o que está de acordo como referido na literatura quanto ao aumento dos

QUADRO V
MULTITEST

	ESTUDO	CONTROLO
Efectivo Total	44	35
Anérgicos	34	2

p < 0,05

QUADRO VI

D.N.C.B./ N.º de Transfusões

N.º Transfusões	0	1-4	≥5
Total de doentes	10	20	14
Doentes anérgicos	5 (50%) §	17 (85%)	12 (86%)

§: p < 0,05

QUADRO VII

D.N.C.B. e tempo de diálise

Tempo de diálise	<1 ano	1-2 anos	>2 anos
Total de doentes	10	14	20
Doentes anérgicos	7 (70%)	11 (78%)	16 (80%)

QUADRO VIII

Anticorpos Citotóxicos e N.º de Transfusões

	N.º de Transfusões		
	0 (10 doentes)	1-4 (20 doentes)	≥5 (14 doentes)
Sem Anticorpos Citotóxicos	7	7	3
Com Anticorpos Citotóxicos	3	13	11

anticorpos citotóxicos provocado pelas transfusões^{4,5} (Quadro VIII).

Procurámos verificar se os doentes caracterizados por níveis mais altos de anticorpos citotóxicos eram mais ou menos reactivos do ponto de vista da sua imunidade celular.

Embora o DNCB não nos possa dar resposta cabal a essa questão, porque não é um teste específico que traduza na íntegra os mecanismos complexos da imunidade celular, é contudo um teste que nos permite avaliar, in vivo, de forma relativamente fiel, o grau de competência celular dos doentes estudados.

Assim comparámos as reacções ao DNCB dos vários grupos de doentes consoante a sua taxa de anticorpos citotóxicos (Quadro IX).

Verificou-se que os doentes sensibilizados (presença de anticorpos citotóxicos) são mais frequentemente não reactivos ao DNCB que os doentes sem anticorpos, sendo a diferença estatisticamente significativa.

QUADRO IX

Anticorpos Citotóxicos / DNCB

	D.N.C.B.	
	Anérgicos	Reactivos
Sem Anticorpos Citotóxicos (17 doentes)	10	7
Com Anticorpos Citotóxicos (27 doentes)	24	3

§: p < 0.001

CONCLUSÕES

Embora os exames e os testes efectuados não nos permitam só por si determinar com exactidão o grau de imunocompetência dos doentes estudados, dão-nos contudo uma avaliação de alguns aspectos importantes do seu perfil imunológico.

Nomeadamente o MULTITEST e o D.N.C.B. são testes que nos permitem avaliar, in vivo, o grau de hipersensibilidade retardada e nos dão uma ideia aproximada do nível de imunocompetência celular dos indivíduos estudados^{1, 13, 24, 17}.

Assim, e com as reservas a que obriga o facto de termos estudado uma população não muito ampla, parece-nos poder concluir, com base nos resultados obtidos nos nossos doentes com Insuficiência Renal Terminal em programa de hemodiálise, que:

- A média do número absoluto de linfócitos se encontra no limite inferior de normalidade.

- A percentagem de linfócitos T e B é sensivelmente normal.

- A imunoreactividade celular, traduzida pelo grau de hipersensibilidade retardada, está diminuída.

- Tal diminuição parece ser mais acentuada nos doentes submetidos a transfusões sanguíneas.

- As pequenas diferenças no número de transfusões não pareceram influenciar os resultados dos testes cutâneos realizados.

- O tempo de diálise parece não influenciar os resultados dos testes efectuados.

- A percentagem de anticorpos citotóxicos é maior nos doentes submetidos a transfusões de sangue.

- Os doentes mais sensibilizados do ponto de vista da presença de anticorpos citotóxicos são menos reactivos face ao D.N.C.B.

BIBLIOGRAFIA

- 1 AHMED A.R., BLOSE A.D. «Delayed-Type Hypersensitivity Skin Testing». Arch. Dermatol. 1983; 119: 934-945.
- 2 D'APICE A.J.F., TAIT B.D. «The positive B-cell Cross-Match, A Marker of active Enhancement?» Transplantation Today 1978; V: 954-957.
- 3 CARPENTER C.B., MILFORD E.L., Renal Transplantation: Immunobiology, in «The Kidney» Brenner and Rector (Edits) 3 ed Saunders, 1986 cap. 44: 1907-1939.
- 4 CASCIANI C.V., SIMONE C. DE, ADOMO D., MELI D., CICOGNA V.A., PIZZA A., MASALA C., «Hemodialysis Patients Waiting for a Kidney Transplant: Immunologic Investigation». Transplantation Today 1978; V: 115-118.
- 5 CICCARELLI J., TERASAKI P., «Sensitization Patterns in transused Kidney Transplant Patients and their Possible Role in Kidney Graft survival». Transplantation Today 1982; VII: 1208-1211.
- 6 DICK H.M., WATSON M.A., TSAKINS D., HAMILTON, BRUGE J.D., «DNCB Testing, Blood Transfusion and Renal Graft Survival». Transplantation Today 1982; VII: 1151-1153.
- 7 DOBBELSTEIN H., «Immune System in Uremia». Nephron 1976; 17: 409-414.
- 8 VAN ES A.A., BALNER H., «Effect of Pretransplant Transfusion on Kidney Allograft Survival». Transplantation Today 1978; V: 127-137.
- 9 GOLDBLUM S.E., REED W.P., «Host defenses and Immunologic Alterations with Chronic Hemodialysis». Ann. Intern. Med. 1980; 93: 597-613.
- 10 INDIVERI F., FAGIOLO V., PELLEGRINO M.A., FERRONE S., «Uremic Patients Immunized with Planned Blood Transfusions: Detection of HLA antibodies with the cytotoxic Test and Indirect Rosette Microassay». Transplantation Today 1978; V: 167-169.
- 11 LENHARD V., MEASSEN G., GRONE-WILDE, WERNET P., O Pelz G., «Effect of Blood Transfusion on Immunoregulatory Mononuclear Cells in Prospective Transplant Recipients» Transplantation Today 1982; VII: 1011-1015.
- 12 KERMAN R.H., AGOSTINO C., VAN BUREN C.T., PAYNE W., FLECHNER S., CONLEY S., BREWER E., KAHAN B.D., «Effect of Blood Transfusion on Graft Survival and Immune Responsiveness». Transplantation Today 1982; VII: 1011-1025.
- 13 KERMAN R.H., FLOYD M., VAN BUREN C.T., KAHAN B.D., «Prediction of Cadaveric Allograft Survival Based on Pretransplant Nonspecific Immunocompetence». Transplantation Proceedings 1981; XIII: 1533-1535.
- 14 KISSMEYER - NIELSEN F., «Matching For HLA», in «Kidney Transplantation Principles and Practice» P.J. Morris (edit) 1979, Cap. 6: 107-126.
- 15 KUNORI T., FEHORMAN I., RINGDEN O., MÜLLER E., «In vitro characterization of Immunological Responsiveness of Uremic Patients» Nephron 1980; 26: 234-239.
- 16 MACLEOD A.M., MANSON R.J., STEWART K.N., POWER D.A., SHEWAN W.G., EDUARD N., CATTO G.R.D., «Fc-Receptor-Blocking Antibodies Develop After Blood Transfusions and Correlate with Good Graft outcome». Transplantation Today 1982; VII: 1019-1021.
- 17 PINTO A.A., CHAVES A., «Algumas considerações sobre a generalização de testes DNCB». «O Médico» 1972; Vol. LXIV: 451-453.
- 18 RASKA K., RASKOVA J., SHEA S.M., FRANKEL M.R., WOOD R.H., LIFTER J., GHOBRIAL J., EISINGER R., HOMER L., «T cell subsets and cellular immunity in End-Stage Renal Disease». Am. J. Med. 1983; 75: 734-740.
- 19 RASKOVA J., GHOBRIAL J., SHEA S.M., EISINGER R.P., RASKA K., «Suppressor Cells in End-Stage Renal Disease Functional Assays and Monoclonal Antibody Analysis». Am. J. Med. 1984; 76: 847-853.
- 20 VAN ROOD J.J., «Pretransplant Blood Transfusion: Sure! But how and why?». Transplantation Today 1982, VII: 915-916.
- 21 RUSS G.R., MIACH P., D'APICE A., KINCAID-SMITH P., «DNCB Skin Testing: Correlation with Graft Survival and effect of Blood Transfusion». Transplantation Proceedings 1984, XVI: 998-999.
- 22 SHENTON B.K., PROUD G., SMITH B.M., TAYLOR R.M.R., «Identification of Immunosuppressive Factors in Plasma Following Multiple Blood Transfusions». Transplantation Today 1978; V: 171-173.
- 23 SINGAL D.P., FAGNILI L., JOSEPH S., «Blood Transfusions Induce Antidiotypic Antibodies in Renal Transplant Patients». Transplantation Today 1982; VII: 1001-1008.
24. STILLER C.R., KROWN P.A., «Immunologic Monitoring: Current Perspectives and clinical Implications». Transplantation Proceedings 1981; XIII: 1699-1711.
- 25 WILSON W.E.C., KIRKPATRIK H., TALMAGE D.W., «Suppression of Immunologic Responsiveness in Uremia». Ann. Intern. Med. 1965; 62: 1-14.

Pedido de separatas:
 J. Pratas e Sousa
 Serviço de Nefrologia dos H.U.C.
 3000 Coimbra