

Universidade da Beira Interior

Faculdade de Ciências da Saúde

Mestrado Integrado em Medicina



**Transplantação Renal:
Mecanismos de Rejeição e Tolerância**

Filipe Alexandre Barata Lopes Vicente

Orientação Científica de Prof. Doutor Luís Taborda Barata

Covilhã, Junho de 2008

Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da Saúde
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina

**TRANSPLANTAÇÃO RENAL:
MECANISMOS DE REJEIÇÃO E TOLERÂNCIA**

Filipe Alexandre Barata Lopes Vicente

Orientação Científica de Prof. Doutor Luís Taborda Barata

Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da Saúde
para obtenção do grau de Mestre em Medicina

SUMÁRIO

O transplante renal é hoje considerado como a melhor arma terapêutica para os doentes renais em estadio final, aumentando não só a sobrevida dos doentes, como também a sua qualidade de vida, relativamente aos doentes em diálise.

A rejeição tem sido um dos obstáculos à sua plena implementação. Recorre-se a testes de histocompatibilidade e a potentes fármacos imunossuppressores para controlar a rejeição e promover a tolerância.

Nesta monografia abordamos os mecanismos celulares e moleculares presentes rejeição (celular e humoral) e na tolerância.

Também fazemos referência às estratégias indutoras de tolerância, assim como aos principais fármacos incluídos nos protocolos imunossuppressores.

ABSTRACT

Renal transplantation is presently seen as the best choice for treatment of the end stage renal disease, improving patient survival and quality of life when compared with patients on dialysis.

Rejection has been a major obstacle to its widespread implementation. Histocompatibility tests and powerful immunosuppressive drugs are used to control rejection, and promote tolerance.

In this monograph we describe the molecular and cellular mechanisms of rejection (cellular and humoral) and tolerance.

We also discuss tolerance-induction strategies, as well as to the drugs included in the immunosuppressive protocols.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Luís Tabora Barata pela pertinente orientação ao longo do trabalho e pela referência que sempre foi, enquanto professor, durante estes 6 anos de curso.

À minha família pelo apoio incondicional de sempre.

Com o objectivo de facilitar o processo de colheita da informação necessária para a execução deste trabalho, procedeu-se à revisão bibliográfica sobre a temática.

A pesquisa de artigos científicos foi realizada no período de 1 de Dezembro de 2007 a 31 de Maio de 2008, utilizando o motor de busca *Google Scholar* e as bases de dados do *Pubmed* e *UpToDate*.

As palavras-chave utilizadas foram as seguintes: *kidney transplant, renal transplant, renal transplantation, kidney transplantation, allograft rejection, organ tolerance, immunosuppressive drugs*.

Seleccionaram-se os artigos em língua inglesa com data de publicação de 1999 até 2008, escolhendo os artigos com ‘abstract’ e ‘fulltext’.

ÍNDICE

SUMÁRIO.....	2
AGRADECIMENTOS.....	3
ÍNDICE.....	5
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
I. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Aspectos epidemiológicos e clínicos da transplantação renal.....	11
1.1.1. Relevância e contexto clínico.....	11
1.1.2. Prognóstico/evolução pós-transplantação.....	13
1.2. Mecanismos imunitários ligados à rejeição de transplantes renais.....	24
1.2.1. Rejeição Aguda	25
1.2.1.1. Rejeição aguda mediada por células.....	26
1.2.1.2. Rejeição Aguda Humoral	35
1.2.2. Rejeição Crônica.....	46
1.2.3. Critérios histológicos de rejeição.....	51
1.2.4. Imunidade inata na transplantação renal.....	54
1.3. Testes de histocompatibilidade e monitorização da rejeição.....	55
1.4. Mecanismos imunitários ligados à tolerância.....	59
1.4.1. Aspectos gerais de tolerância.....	59
1.4.2. Tolerância central.....	61
1.4.3. Tolerância periférica.....	64
1.4.4. Estratégias para a indução de tolerância.....	67
1.5. Terapêutica imunomoduladora.....	76
1.5.1. Conceitos gerais.....	76
1.5.1.1. Corticoterapia	78

1.5.1.2. Outras terapêuticas imunomodeladoras.....	79
1.5.1.3. Protocolos de indução e manutenção de imunossupressão.	87
1.5.1.4 Tratamento de rejeição aguda e crónica.....	91
1.5.1.5. Protocolos de dessensibilização	94
II. CONCLUSÃO.....	96
III. BIBLIOGRAFIA.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS

AB0	Determinantes antigénicos do grupo sanguíneo
Ac	Anticorpo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Ag	Antigénio
AICD	“Activation induced cell death”
APC	“Antigen presenting cell”
BMT	“Bone marrow transplantation”
CD	“Cluster of differentiation”
CTL	Citolítico
CTLA-4	“Cytolytic T-lymphocyte associated molecule-4”
DAF	“Decay accelerating factor”
FasL	Ligando de Fas
FKBP12	Proteína de ligação 12 - FK506
HLA	“Human Leukocyte Antigen”
I.S.	Imunossupressor
ICAM	“Intracellular adhesion molecule”
IFN	Interferão
Ig	Imunoglobulina
IgIV	Imunoglobulina intravenosa
IL	Interleucina
KIR	“Killer cell immunoglobulin receptor”
MHC	“Major histocompatibility complex”
MICA	“Major-histocompatibility-complex class I-related chain A”
MICB	“Major-histocompatibility-complex class I-related chain B”
MMF	Micofenolato mofetil
MOC	Microscópio óptico composto
NF-κB	Factor nuclear κB
NK	“Natural killer”

OKT3	Muromonab-CD3
PECAM	“Platelet endothelial cell adhesion molecule”
PPR	“pattern-recognition receptors”
RANTES	“Regulated upon activated normal T cell”
RHC	Rejeição humoral crónica
RLM	Reacção Linfocitária Mista
RR	Resposta relativa
Tacrolimus	FK506
TCR	“ T Cell receptor
TGF	“Transforming Growth Factor”
TLR	“toll like receptors
TNF	“Tumor Necroses Factor”
TNFR	T reguladoras
Treg	“TNF receptor”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Complexo HLA no braço curto do cromossoma 6.....	15
Figura 2. Processamento antigénico	18
Figura 3. A - Causas de perda de transplante. B – Causas de morte entre o 1º e o 5º ano após transplante.....	21
Figura 4. Activação das células T.....	28
Figura 5. Tubulite.....	30
Figura 6. Diagrama ilustrador dos eventos que ocorrem na tubulite.....	33
Figura 7. Activação de linfócitos B.....	36
Figura 8. Movimentos celulares entre o órgão transplantado e os órgãos linfóides secundários.....	38
Figura 9. Diagrama ilustrador de eventos presentes na rejeição mediada por células e por Acs.....	42
Figura 10. Atrofia tubular presente na rejeição crónica.....	48
Figura 11. Aparência ao M.O.C. característica da nefropatia do transplante.....	50
Figura 12. Efeito de incompatibilidades HLA na sobrevivência do transplante.....	58
Figura 13. Mecanismo Central de Indução de Tolerância.....	62
Figura 14. Mecanismos periféricos de indução de tolerância.....	64
Figura 15. Representação esquemática de técnica de indução de quimerismo misto persistente.....	73
Figura 16. Cinética do desenvolvimento de respostas imunitárias.....	75
Figura 17. Sinais de activação linfocitária.....	77
Figura 18. Locais de acção dos diferentes I.S.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estratégias de indução de tolerância testadas na clínica.....	71
Tabela 2. Fármacos I.S. usados na fase de manutenção da imunossupressão.....	87
Tabela 3. Possíveis combinações de fármacos com protocolos imunossupressores.....	89

I. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos epidemiológicos e clínicos da transplantação renal

1.1.1. Relevância e contextualização clínica

O primeiro transplante realizado com sucesso em humanos ocorreu em 1954, em Boston, quando, após vários anos de tentativas frustradas em humanos e alguns sucessos em animais, (Schatzki, 2003) um rim foi transplantado sem rejeição entre dois gémeos idênticos. O transplante, muitas vezes designado como o “milagre médico do século XX” (Morris *et al*, 2004), através do qual se pretende substituir um órgão ou parte por outro com o intuito de restabelecer a sua função, veio solucionar vários problemas médicos, aumentando mesmo a esperança de vida dos doentes que se encontram na fase final da sua doença. No caso do rim, o transplante é uma solução terapêutica para a Doença Renal em Estadio Final (o processo fisiopatológico final da doença renal crónica pelo qual há uma perda irrecuperável de função renal, tendo esta de ser assegurada por um mecanismo de substituição, a diálise ou o transplante renal). O transplante tem várias vantagens relativamente à diálise, a começar pelo facto de condicionar uma melhor qualidade de vida, sem as restrições associadas àquela (Magee *et al*, 2004). Por outro lado, quando comparada a mortalidade dos doentes sujeitos a transplante renal com a dos dialisados, ao fim de 3 a 4 anos, concluiu-se que o transplante reduziu o risco de morte em 68% (Wolfe *et al*, 1999). Este procedimento apresenta um benefício global, mesmo para os mais idosos e obesos.

Em Portugal no ano de 2006, de acordo com os dados da Direcção Geral de Saúde, foram efectuados 381 transplantes no Serviço Nacional de Saúde.

O primeiro transplante renal com sucesso, realizado entre gémeos idênticos, foi um estímulo para efectuar outras experiências no mesmo foro. Experimentaram-se então vários transplantes de órgãos de cadáveres, sendo que alguns rins funcionaram mesmo durante alguns dias em virtude da urémia dos recipientes causar imunossupressão temporária. Mais tarde, procedeu-se à irradiação total do corpo como tentativa de imunossupressão causando também, no entanto, aplasia medular profunda, expondo assim os recipientes a infecções fatais.

Foi apenas com a descoberta do primeiro imunossupressor, a 6-mercaptopurina, nos anos 60 do século XX, que foi possível alcançar a imunossupressão necessária à sobrevivência do transplante, tendo evoluído desde então. Associados à imunossupressão existem vários efeitos secundários, que decorrem do facto da inibição dos mecanismos imunitários ser inespecífica, expondo o organismo a infecções e a tumores que de outra maneira seriam mais facilmente detectados e eliminados. O controlo específico dos mecanismos de imunossupressão constitui um dos maiores desafios da transplantação.

Por outro lado, o facto de, no caso dos gémeos de Boston, o sucesso do procedimento não ter dependido da imunossupressão reforçou a questão da imunohistocompatibilidade, conceito surgido na década de 30 do século passado, a partir do trabalho de *Peter Gorer*. Pelo facto de serem gémeos idênticos, o seu sistema imunitário era também idêntico, dispondo do mesmo mecanismo de identificação celular. Este conceito fez desenvolver mecanismos de identificação de semelhanças entre o sistema imunitário de potenciais dador e recipiente de órgãos. Um transplante é idealmente efectuado entre dois indivíduos o mais semelhantes possível em termos de determinados aspectos genéticos.

Uma vez que o sucesso da transplantação renal sempre esteve mais dependente da acção sobre o sistema imunitário do que da técnica cirúrgica (rapidamente desenvolvida logo nos primeiros anos de experiências, nomeadamente quando *Alexis Carrel* descreveu várias técnicas

de anastomose vascular, que ainda hoje são usadas (Magee *et al*, 2003)), esta técnica constituiu um forte estímulo para o aumento dos conhecimentos em imunologia, tendo mesmo levado à definição do Complexo Major de Histocompatibilidade (CMH ou MHC).

Para além da imunossupressão e da imunohistocompatibilidade, existe uma última barreira ao transplante, não menos significativa: a disponibilidade de órgãos (proveniente de dadores vivos ou cadáveres). Esta está intimamente ligada a mecanismos legais e culturais de cada sociedade, que não serão discutidos neste texto. O tempo de espera por um rim constitui um problema para o doente.

O domínio dos processos que levam à rejeição ou à tolerância de um órgão e uma potencial intervenção nestes, permite não só o aumento de sobrevivência de transplantes, tal como realizá-los entre indivíduos pouco idênticos imunologicamente, aumentando assim a disponibilidade de órgãos.

Esta monografia tem como objectivo a revisão dos mecanismos moleculares e celulares subjacentes aos processos de rejeição e tolerância presentes no transplante renal, sem deixar de abordar a imunossupressão e seus mecanismos, necessários a este procedimento.

1.1.2. Prognóstico / evolução pós-transplantação

O objectivo da transplantação é a aceitação a longo prazo do órgão transplantado, com um mínimo ou sem imunossupressão (Cornell *et al*, 2008).

Existem diferentes tipos de transplantes, de acordo com a proveniência do órgão a transplantar. Assim, se o dador é o mesmo que o receptor, estamos perante um *autotransplante*. Se o transplante é entre indivíduos da mesma espécie e geneticamente iguais, como o caso dos gémeos homozigóticos, é designado *isotransplante*. No entanto, se os indivíduos forem

geneticamente diferentes, trata-se de um *alotransplante*. Falamos de *xenotransplante* se o transplante ocorrer entre organismos de espécies diferentes.

A aceitação dos auto e isotransplantes não levanta problemas imunológicos, visto que estão em causa células com o mesmo MHC.

Num alotransplante, são introduzidas células de um organismo diferente induzindo, assim, uma resposta imunitária contra essas células.

A reacção imunológica despoletada contra o órgão transplantado designa-se de rejeição imunológica. Reflecte a principal função do sistema imunitário: o reconhecimento do próprio organismo (“*self*”) e do que não pertence ao próprio organismo (“*non-self*”). O seu objectivo é promover a destruição do “*non-self*”. Este constitui uma potencial ameaça à integridade do organismo humano. Nele se enquadram as células de outros organismos, humanos ou não (como os microrganismos causadores de infecção), e as células do próprio cujo ADN foi sujeito a mutações, não sendo reconhecidas como do próprio organismo.

A identificação do “*self*” e do “*non-self*” baseia-se no reconhecimento celular. Este depende de vários elementos moleculares e celulares integrantes do sistema imunitário. Os marcadores moleculares expressos à superfície de todas as células funcionam como antigénios (Ag). Os Ags expostos podem resultar do metabolismo de proteínas da própria célula, reflectindo a via endógena (via citosólica) de expressão antigénica (do “*self*”). Por outro lado, os Ags podem também ser o produto do processamento de antigénios “*non-self*”, reflectindo a via exógena (via endocítica) de apresentação antigénica.

Todos os Ags expressos à superfície das células estão ligados a moléculas do MHC. O MHC é na realidade um complexo de vários genes presente no cromossoma 6, cuja expressão em termos de receptor glicoproteico ocorre em todas as células nucleadas do organismo. Para cada um destes genes existem dois alelos, sendo herdados por via materna e paterna.

Este complexo de genes alélicos é herdado em bloco – consistindo no haplotipo - e a sua organização específica nos humanos (presente na figura 1) é designada por HLA (*Human Leucocyte Antigen*). Em cada organismo existe um haplotipo paterno e outro materno, reflectindo assim a hereditariedade autossómica. Deste modo as moléculas por eles determinadas apresentam um elevado polimorfismo.

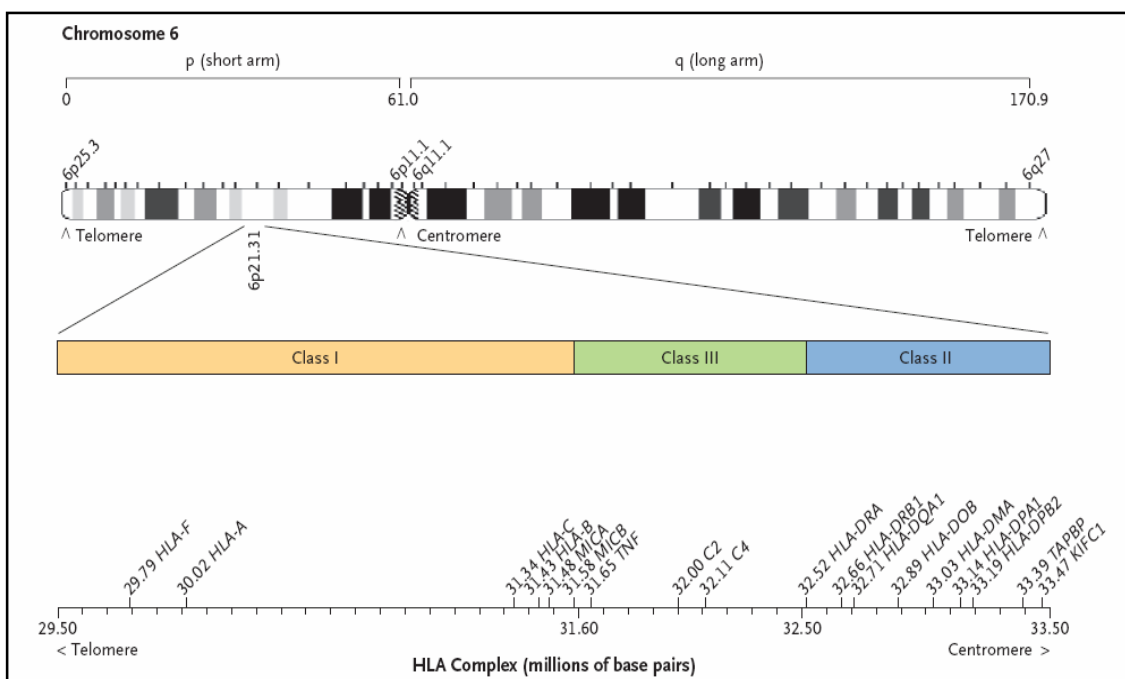


Figura 1. Complexo HLA no braço curto do cromossoma 6. A imagem evidencia os 3 grupos de genes MHC (modificado a partir de Flegel, 2007).

Os genes do MHC podem ser subdivididos em 3 grandes grupos distintos quanto à função e estrutura das proteínas que codificam: MHC das classes I, II e III.

O MHC I codifica glicoproteínas expressas na maioria das células nucleadas (McCluskey *et al*, 1999). A sua função é a apresentação de Ag endógenos a linfócitos T CD8+. Os Ags endógenos são proteínas resultantes da expressão de genes da própria célula.

O MHC II codifica glicoproteínas que são expressas de forma mais restrita, principalmente em Células Apresentadoras de Antígenos (APCs), tais como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. Estas apresentam péptidos antigénicos exógenos, resultantes da destruição de proteínas que foram endocitadas pelas APCs, a células T CD4+.

O MHC III codifica várias proteínas com funções específicas no sistema imunitário nomeadamente os componentes C4, C2 e BF do complemento e a citocina denominada Factor de Necrose Tumoral (TNF). O nível de expressão dos diferentes MHCs é influenciado por diferentes citocinas tais como a IL-4, o IFN- γ e o TNF- α , reflectindo diferentes “ambientes imunológicos”. Estas podem mesmo promover a expressão de MHC II em células que normalmente não expressam estas proteínas, adoptando assim um papel de APCs não profissionais. É o caso das células endoteliais.

O MHC I tem vários loci génicos; os loci A, B e C codificam as chamadas moléculas MHC I clássicas, uma vez que apresentam Ags a linfócitos T CD8+. Outros loci codificam moléculas MHC I não clássicas. Estas têm como função a apresentação antigénica a células *Natural Killer* (NK). Se o Ag em causa for “*self*”, será apresentado no contexto de moléculas do MHC classe I, e irá interagir com um receptor específico das células NK: o “*killer-inhibitory receptor*” (KIR), activando este. Como os KIR têm funções inibitórias da activação das células NK, desta ligação entre MHC classe I/Ag e KIR resulta a inibição da célula NK que assim não irá lisar a célula que lhe apresentou o Ag. Se, por outro lado, uma célula apresentar um Ag “*non-self*”, através de moléculas do MHC classe II, a interacção com os KIR não irá ter lugar, pois as moléculas do MHC classe II não são reconhecidas pelos KIR e ocorre, assim, destruição da célula que apresenta o Ag.

O grau de semelhança entre as moléculas do MHC que apresentam os Ags, irá determinar o grau de histocompatibilidade entre tecidos de organismos diferentes. No caso do transplante,

quanto maiores forem as diferenças imunohistoquímicas entre dois organismos, maior será a reacção imunológica contra o transplante.

Em termos gerais, os elementos celulares que participam no reconhecimento e destruição de células estranhas ao organismo são as APCs e os linfócitos T e B.

Na presença de células com expressão imunohistoquimicamente diferente, ou seja expressando moléculas “*non-self*”, as APCs do hospedeiro são responsáveis pela sua identificação, endocitose, processamento dos seus Ags e sua apresentação a linfócitos T com expressão simultânea de sinais co-estimulatórios. Juntos, irão estimular o restante sistema imunitário a desenvolver a resposta imunitária adequada.

O processamento de Ags (figura 2) é o processo celular através do qual estes são endocitados, degradados em péptidos e associados a moléculas do MHC classe I ou classe II. No final, este conjunto é exposto na superfície das APCs. Quando a apresentação se efectua através de moléculas do MHC classe II, aquela corresponde à via exógena de apresentação antigénica, ou seja, exposição de Ags exógenos.

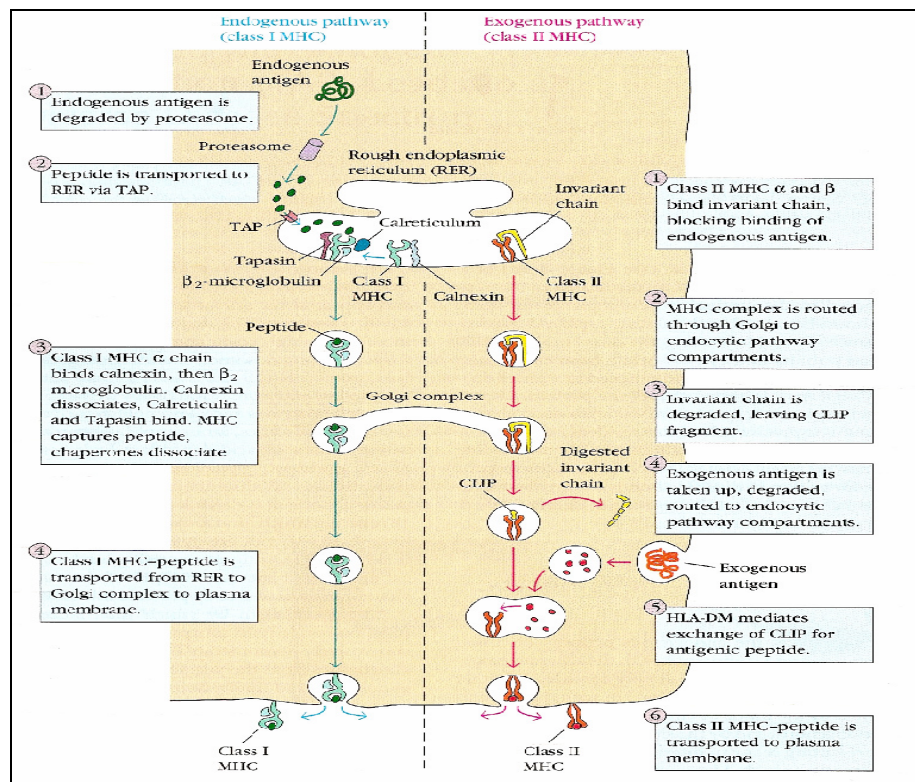


Figura 2. Processamento antigénico (adaptado de Goldsby *et al*, 2002)

Quando um órgão é transplantado, o organismo receptor é exposto a cerca de 6 a 12 moléculas do MHC (HLA) “non “self” distintos (McCluskey *et al*, 1999), codificados por diferentes alelos do complexo MHC. Estas diferenças serão assim reconhecidas, estimulando uma forte resposta imunitária que leva à rejeição do órgão transplantado.

Assim, é essencial determinar as diferenças entre o HLA do receptor e potenciais dadores, a fim de escolher o dador com mais semelhanças. Todos os potenciais dadores e receptores são sujeitos a diferentes testes que visam determinar histocompatibilidades, em relação a vários grupos de Ags.

Uma rejeição, após a transplantação renal, pode decorrer de forma hiperaguda, aguda ou crónica. Estas representam diferentes processos de rejeição e condicionam diferentes entidades clínicas. Contudo, todas estas formas contribuem para o insucesso da transplantação renal.

A rejeição aguda do rim transplantado é geralmente definida como uma deterioração aguda da função renal, que se manifesta clinicamente pela subida abrupta da creatininemia, bem como pela retenção de fluidos, com oligúria e hipertensão consequentes. A presença de febre, hipersensibilidade e edema do transplante pode ocorrer, mas são pouco comuns com os fármacos imunossuppressores modernos. No entanto, a maioria dos casos são completamente assintomáticos. Os casos que se apresentam com mais sintomas geralmente estão relacionados com a interrupção da terapêutica imunossupressora (Vella *et al*, 2008, [5]).

Esta situação de rejeição aguda deve ser reconhecida imediatamente. É assim essencial uma monitorização frequente da creatininemia. Um outro método consiste na realização de biopsias em doentes, mesmo que não apresentem uma elevação de creatinina no plasma, o que permite a detecção de uma situação de *rejeição subclínica*. Esta define-se como a existência de alterações histológicas características da rejeição no órgão transplantado, com valores normais de creatininemia. O seu significado é, contudo, pouco claro. Na realidade, estas alterações são comuns nos primeiros 3 meses pós - transplantação. Ocorrem em cerca de 30% de doentes com uma função renal estável a receber um regime baseado em ciclosporina. A sua história natural é incerta. Não se sabe se o tratamento desta traz benefícios. (Vella, *et al*, 2008, [5]).

A rejeição crónica do rim transplantado manifesta-se clinicamente através da deterioração gradual da função do rim transplantado, nomeadamente pela subida progressiva e lenta da creatininemia, proteinúria de intensidade crescente (por vezes atingindo valores que se enquadram no espectro do síndrome nefrótico) e hipertensão cada vez mais grave (Vella, *et al*, 2008, [3]).

Os principais factores de risco para a rejeição crónica são: história de rejeição aguda, elevado grau de incompatibilidades de Ags HLA, infecção e imunossupressão inadequada.

Pode, nalguns casos, integrar-se numa entidade clínico-patológica designada de nefropatia crónica do transplante renal, na qual é apenas parte da etiologia. Constitui uma das causas mais comuns de doença renal em estágio final e é mesmo a primeira causa de insuficiência do transplante renal após o primeiro ano de transplantação (Vella, *et al*, 2008, [3]).

Os dados relativos à rejeição do transplante variam consoante a origem do órgão, sendo que os transplantes com dadores vivos têm melhores taxas de sucesso. Por exemplo, dados relativos aos Estados Unidos da América revelam que no primeiro ano após o transplante, se o dador for cadáver a sobrevivência do doente é de cerca de 95% e a do transplante é de 88%. Se o dador for vivo, a sobrevivência do doente é de 98% e do transplante é de 94% (*Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States, 2002* citado em Magee *et al*, 2004).

O padrão de rejeição tem-se alterado nos últimos anos. No início, havia uma predominância clara da rejeição aguda. Com o tempo, a incidência desta diminuiu, conduzindo à predominância da rejeição crónica (ainda que a taxa desta também tenha vindo a diminuir). A diminuição da rejeição aguda reflecte a melhoria dos regimes de imunossupressão (mais eficazes), dos testes de histocompatibilidade, da profilaxia antimicrobiana e dos restantes cuidados médicos (Magee *et al*, 2004). Por seu lado, o aumento da casuística da rejeição crónica reflecte não só a diminuição da rejeição aguda, como também os efeitos secundários da terapêutica imunossupressora

Além da rejeição, existem outras condições que contribuem para o insucesso do transplante renal.

Os factores de risco que ameaçam a sobrevivência do transplante (figura 3) a curto prazo, um período de elevado risco, são o atraso no funcionamento do órgão transplantado, o tipo de dador, as doenças do dador, factores hospitalares e outros (Vella, 2008, [1]).

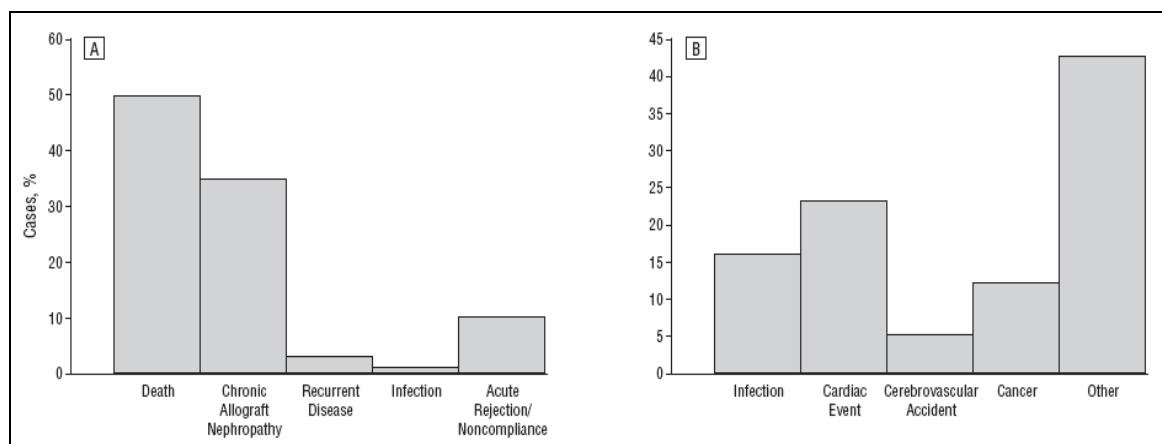


Figura 3. A - Causas de perda de transplante. B – Causas de morte entre o 1º e o 5º ano após o transplante. (adaptado de Magee *et al*, 2004).

O *atraso no funcionamento do transplante* define-se como oligúria ou necessidade de diálise durante a primeira semana após a cirurgia. Menos de 5% dos rins transplantados com funcionamento atrasado nunca irão ter uma função normal (Vella, 2008, [1]). As principais causas são: a necrose tubular aguda pós-isquémica, a rejeição aguda e hiperaguda mediada por anticorpos, a obstrução urinária devido a necrose uretérica e a trombose ou êmbolos de ateroma na artéria e veia renal (Koch *et al* 2008, [3]).

A longo prazo, os principais factores de risco são o aumento da creatinina sérica, a proteinúria e pressão arterial. Um marcador de risco aumentado de mau prognóstico a longo prazo é a função renal diminuída no fim do primeiro ano após o transplante.

Nos meses seguintes a um transplante com sucesso e após a resposta intensa do sistema imunitário ocorre uma nova fase: a *adaptação hospedeiro-transplante*. Esta, caracteriza-se por uma diminuição da reactividade do sistema imunitário ao órgão transplantado e é consequência de alterações celulares. De facto, verifica-se uma perda de células dendríticas (que funcionam

como APCs) ocorrendo uma diminuição de apresentação antigénica. Assim, o sistema imunitário passa a ser menos estimulado e as células T efectoras entram num estado de anergia parcial, o que se designa por “tolerância adaptativa” ou “tolerância *in vivo*”.

A imunossupressão continua a ser uma questão essencial na transplantação. O seu uso profilático pode ser dividido em duas fases: indução e manutenção (Halloran *et al*, 2004).

A *fase de indução* decorre nos primeiros dias após a intervenção. É uma fase de intensa imunossupressão, pois é nesta fase que pode ocorrer o processo de rejeição mais intenso.

Na *fase de manutenção* pretende-se estabilizar a adaptação ao órgão transplantado, limitando a activação do sistema imunitário induzida pela apresentação antigénica.

Os fármacos imunossupressores são também usados na terapêutica da rejeição estabelecida, em regime próprio. São usados em altas doses.

Relativamente à mortalidade dos doentes transplantados, a primeira causa de morte entre estes são as doenças cardiovasculares. Seguem-se as infecções e as neoplasias malignas (Magee *et al*, 2004).

É de notar que muitos factores de risco para doenças cardiovasculares surgem antes da insuficiência renal (podendo inclusivamente estar na sua origem).

No que diz respeito ao importante aspecto das infecções pós-transplante, existem três padrões segundo os quais as *infecções* podem ocorrer. Correspondem a três períodos distintos: 0 a 1 mês, 1 a 6 meses e mais de 6 meses (Magee *et al*, 2004). No primeiro mês, as infecções que podem ocorrer são as típicas de qualquer período após uma intervenção cirúrgica. Nos seis meses seguintes, as infecções reflectem a supressão farmacológica do sistema imunitário. Surgem assim as infecções oportunistas: Citomegalovírus, vírus *Epstein Bahr*, *Listeria monocytogenes*, *Pneumocystis carinii*, *Nocardia species*. Durante este período são adoptadas medidas profiláticas: fármacos antivíricos e Trimetropim-Sulfametoxazole. Seis meses depois do transplante, com a

redução da imunossupressão, o risco de infecções diminui. Neste período, o risco é muito semelhante ao existente na população em geral. Os casos com mau funcionamento renal e com prolongada e intensa imunossupressão continuam a ter elevado risco de infecções oportunistas.

Um outro aspecto importante a considerar é o de neoplasias associadas aos transplantes. De facto, a incidência da maioria dos cancros nos doentes transplantados é maior do que em doentes dialisados e na generalidade da população. A prevalência é maior no caso dos cancros associados a transplantes, nomeadamente linfomas e cancros da pele. Várias razões são apontadas para este facto. Por um lado, a imunossupressão inibe os mecanismos de vigilância imunológica que também são exercidos sobre as células do “*self*”, mas que exibem marcadores diferentes do “*self*”, fruto de mutações oncogénicas. A imunossupressão permite ainda a proliferação de vírus oncogénicos. Por outro lado, algumas características ligadas ao contexto da doença renal (abuso de analgésicos, hepatite B, hepatite C...) também podem potenciar o desenvolvimento de neoplasias. Contudo, o factor de risco mais importante para o desenvolvimento de neoplasias nos doentes transplantados é o efeito cumulativo da imunossupressão e não um fármaco em si.

A osteoporose tem-se revelado um problema causador de grande morbidade no doente transplantado. Embora o transplante renal diminua os factores de risco associados a este tipo de situação (hiperparatiroidismo, deficiência de vitamina D, adinamia óssea, amiloidose e intoxicação por alumínio associados à diálise).

Por oposição à rejeição, existem casos de estados de tolerância. Por esta entende-se a ausência de resposta imunológica a um particular grupo de antigénios. Quanto aos mecanismos subjacentes, estes podem ser vários. Embora também seja um dos mecanismos subjacentes à rejeição hiperguda, a exposição prévia, repetida e precoce a Ags “*non-self*” pode, em alguns casos, induzir tolerância.

1.2. Mecanismos imunitários ligados à rejeição de transplantes renais

O processo de rejeição é constituído pela fase de sensibilização e fase efectora.

Durante a sensibilização, ocorre o reconhecimento do tecido transplantado como “*non-self*” através dos mecanismos de apresentação celular supracitados que conduzem à proliferação de células T.

Na fase efectora, ocorre a infiltração – por macrófagos e células T – e consequente destruição do tecido, recorrendo principalmente a mecanismos celulares e humorais.

O processo de rejeição pode também ser classificado quanto ao momento e intensidade com que ocorre em hiperagudo, agudo ou crónico. Subjacentes a estes momentos estão diferentes mecanismos imunológicos.

A rejeição hiperaguda ocorre nas primeiras 24 h após o transplante. Para que ocorra é necessária a existência de uma sensibilização prévia a pelo menos alguns dos Ags transplantados, ou seja, a existência de Acs específicos prontos a reagir com os Ags presentes no órgão transplantado. Este facto é consequência de um contacto anterior com MHCs ou outros grupos de Ags (como os antigénios sanguíneos expressos em eritrócitos - AB0), o que pode acontecer por frequentes transfusões sanguíneas anteriores, gravidezes múltiplas (contacto com aloantigénios paternos) ou transplantes anteriores (Jordan *et al*, 2006). A rejeição, neste contexto, é essencialmente mediada pelo sistema do complemento e caracteriza-se pela infiltração do tecido por neutrófilos e pela reacção inflamatória existente que provoca a coagulação sanguínea, impedindo a vascularização do tecido. Este tipo de rejeição é típico de xenotransplantes.

Os episódios mais precoces da rejeição aguda têm início nos primeiros 60 dias (Vella, *et al*, 2008, [5]).

A rejeição crônica ocorre meses a anos depois do transplante, é mediada por células e Acs e constitui hoje um dos grandes desafios à transplantação, pois se os testes de histocompatibilidade e a imunossupressão realizados diminuíram significativamente as rejeições hiperagudas e agudas, o mesmo não aconteceu com as crônicas. Entre 1992 e 1998, nos E.U.A., ocorreu uma diminuição em cerca de 20% na incidência de rejeições nos primeiros 6 meses. (Gertson *et al*,2000).

Cornell *et al* (2008) utiliza uma outra classificação. Nesta, diferencia a rejeição em aguda e crônica, distinguindo a rejeição aguda mediada por células T da rejeição aguda mediada por Acs (humoral). Esta será a classificação utilizada no restante texto, uma vez que se aproxima mais dos mecanismos imunológicos que lhe estão subjacentes. De qualquer forma, deve-se salientar que os mecanismos podem ocorrer de forma concomitante.

1.2.1. Rejeição aguda

Define-se como a deterioração aguda da função renal, estando associada a alterações patológicas específicas no órgão transplantado (Vella *et al*, 2008, [5]).

A incidência da rejeição aguda no primeiro ano após o transplante em doentes não sensibilizados é de 5 a 10% (Colvin, Nickleit, 2006 citado em Cornell *et al*, 2008). A maioria os episódios ocorre nos primeiros 6 meses (Vella *et al*, 2008, [5]).

A sua incidência depende da terapêutica imunossupressora. O uso de imunossupressão mais intensa tem diminuído a taxa de rejeição aguda. Nos anos 80 a sua

incidência era de 50 a 60%. Na segunda metade da década de 90 era de 30% para doadores cadáveres e 27% para doadores vivos (Vella *et al*, 2008, [5]).

1.2.1.1. Rejeição aguda mediada por células

Com a introdução de células “*non-self*” no organismo inicia-se a cascata de acontecimentos descritos na secção 1.1.2. Assim, após o processamento e exposição celular dos Ags “*non-self*” por células com capacidade de apresentação antigénica, estes Ags irão ser apresentados a linfócitos T. O conjunto MHC II / Ag exposto liga-se ao receptor assim especificamente expresso em linfócitos T (receptor TCR-CD3).

Esta interacção é, na verdade, um processo de co-reconhecimento. O TCR não só reconhece o Ag como também porções polimórficas da estrutura do MHC (HLA), que envolvem o Ag.

As células T são altamente específicas e geneticamente restritas ao MHC (HLA) (McCluskey *et al*, 1999), designando-se esta característica por *restrição pelo MHC*. Isto significa que os linfócitos T só reconhecem moléculas proteicas que lhes sejam apresentadas por APCs no contexto de moléculas do MHC próprio. É esta restrição que faz com que a transfusão de linfócitos, após expansão clonal, para outro organismo (com MHC (HLA) diferente) não confira imunidade contra o agente invasor em causa.

No entanto, apesar da restrição pelo MHC, alguns linfócitos podem também ser capazes de reconhecer moléculas do MHC (HLA) estranhas. Esta característica está presente em cerca de 1/10 a 1/1.000 células resultantes da expansão clonal (McCluskey *et al*, 1999).

O reconhecimento de moléculas do MHC (HLA) alogénicas pode ser directo, dependendo da estrutura do MHC (HLA) e do Ag. É indirecto se a molécula de MHC for processada e apresentada por APCs do hospedeiro, como se de um outro Ag se tratasse.

Simultaneamente com o reconhecimento antigénico ocorrem sinais co-estimulatórios entre a APC e o linfócito T. Resultam da interacção entre outras estruturas moleculares presentes nas membranas destas células, sendo que a mais importante para esta função é a que ocorre entre CD28 na célula T e B7 (CD80/CD86) na APC. Com a ligação APC - linfócito ocorre a activação deste último. O seu objectivo é promover a proliferação específica daquele linfócito e a secreção de interleucinas (IL) activadoras de vários elementos do sistema imunitário (linfócitos T e B), como evidencia a figura 4.

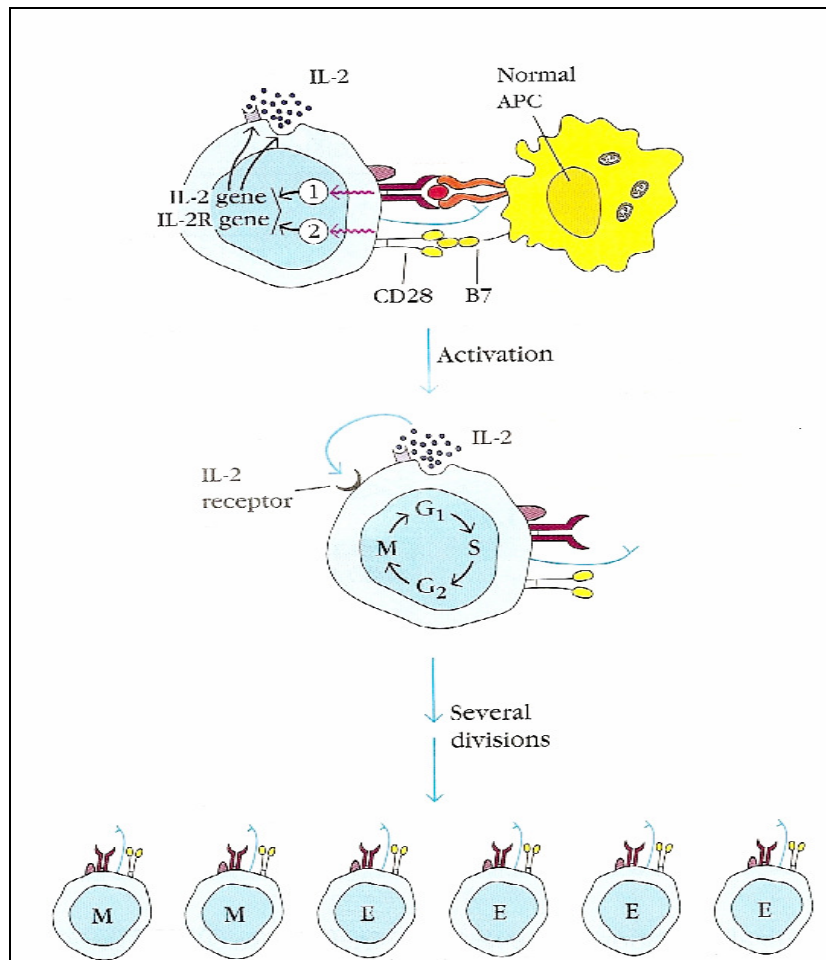


Figura 4. Activação das células T (adaptado de Goldsby *et al*, 2002)

A proliferação de células T com a mesma especificidade antigénica que ocorre após contacto com um Ag expresso no contexto de moléculas do MHC, chama-se *expansão clonal*.

A IL-2 é a principal citocina interveniente neste processo. Na ausência de sinal co-estimulatório entre CD28 e CD80/CD86, a produção de IL-2 é mínima, o que leva à anergia clonal dos linfócitos T envolvidos na interacção.

Se a proliferação ocorrer, irão gerar-se células T CD4⁺ efectoras e células T de memória.

As células T CD4⁺ efectoras têm funções específicas como a secreção de citocinas e indução da diferenciação de células T CD8⁺ citotóxicas (capazes de eliminar células que

apresentam o Ag que estimulou a sua expansão clonal). Também são responsáveis pela activação e modulação da produção de Igs em células B (responsáveis pelo componente humoral da resposta imunitária).

As células T de memória, ao contrário das anteriores, têm um tempo de vida longo, tornando-se quiescentes, mas prontas a responder a um novo estímulo pelo mesmo Ag de forma rápida e específica. Reflectem, assim, a capacidade de aprendizagem do sistema imunitário.

Os linfócitos CD8+ com capacidade citolítica (CTL) são capazes de eliminar as células marcadas com o Ag que estimulou a sua expansão clonal. Libertam perforinas e granzimas A e B, conduzindo à lise osmótica da célula-alvo, mas também activam outros mecanismos de apoptose nestas mesmas células, através de interacções Fas/FasL.

Quer as granzimas, quer o mediador FasL induzem um processo de apoptose mediado por caspases na célula-alvo. Estudos recentes em ratinhos mostraram que qualquer uma destas vias é dispensável, uma vez que, após o seu bloqueio, o processo de rejeição ocorre na mesma (Cornell *et al*, 2008).

Os linfócitos T e outras células podem também libertar citocinas as quais podem ter acção directa no parênquima celular ou acção indirecta através de efeitos no endotélio vascular.

Por exemplo, as citocinas TNF α e TNF β têm acção citotóxica local nas células que expressam os seus receptores (TNFR). Os TNFR1 são expressos nas células endoteliais e os TNFR2 nas células tubulares. Uma vez activados estes receptores, ocorre apoptose através da via das caspases. No caso do IFN- γ , existem estudos contraditórios que revelam que esta citocina pode mesmo ter um efeito protector, atrasando o mecanismo de rejeição (Cornell *et al*, 2008). De forma importante, também as citocinas IL-10 e IL-12 são capazes de atrasar a rejeição aguda. Finalmente, as citocinas IL-2, IL-4, IL-5 e IL-9 parecem ter pouco ou nenhum efeito sobre a rejeição aguda ou crónica.

A actividade celular presente na rejeição irá traduzir-se em alterações histológicas, detectáveis em biópsia renal. De facto, a realização de uma biópsia renal é imperativa perante um doente transplantado com clínica sugestiva de rejeição, pois aquela deverá confirmar ou não o processo suspeitado.

As principais alterações patológicas que poderão ser detectadas numa biópsia renal são: tubulite, endarterite e glomerulite. Estas reflectem a invasão e acumulação de células inflamatórias nos tecidos transplantados, nomeadamente células mononucleares e linfócitos.

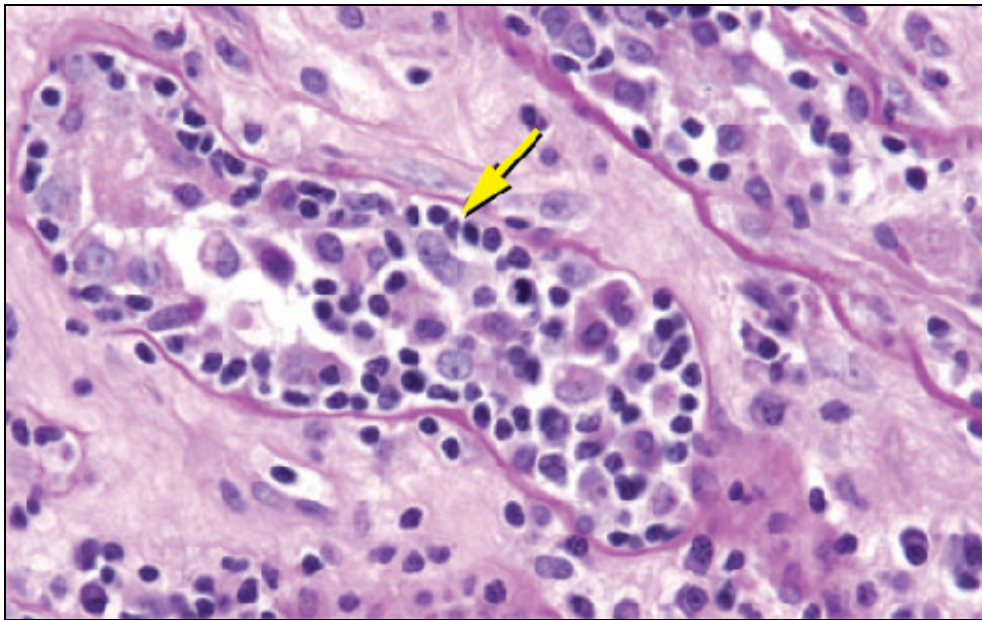


Figura 5. Tubulite. A seta indica o infiltrado de células mononucleares (adaptado de Cornell *et al*, 2008)

A existência de infiltrados de células mononucleares sem ocorrer uma tubulite é comum em rins transplantados com função normal. Não é critério para diagnóstico de rejeição aguda (Vella *et al*, 2008, [5]).

A avaliação imunohistológica revela a presença de células mononucleares com elevada expressão de MHC II e receptores para IL-2. A existência de neutrófilos, se ocorrer, é sugestiva da presença de rejeição humoral aguda ou uma infecção (Vella *et al*, 2008, [5]).

No rim transplantado e que possa estar a sofrer um processo de rejeição, podem estar afectados o interstício, os túbulos e, por vezes, as artérias.

Lesões intersticiais

Células mononucleares linfocitárias CD4+ e CD8+ invadem o espaço intersticial em redor dos túbulos. Contêm grânulos citotóxicos com perforinas e granzimas A e B e expressam moléculas indutoras de apoptose nas células alvo (FasL). Estudos genéticos demonstraram um aumento da expressão genética destas substâncias em linfócitos T efectores, ou seja CD8+ e células CD4+ do tipo Th1. De facto, o padrão de linfócitos T predominante no processo de rejeição é o Th1, isto é, células T CD4+ que sintetizam grandes quantidades de IFN- γ e IL-2.

Para além destas citocinas, outras estão presentes de forma selectiva no processo de rejeição aguda nomeadamente o TNF β , a *CCL5/RANTES* (*regulated upon activated normal T cell expressed and secreted*) e a *CCL3/MIP-1 α* (proteína inflamatória de macrófago). É de salientar que citocinas como o IFN- γ aumentem a produção de outras citocinas tais como o *TGF- β* (*Transforming Growth Factor- β*), cuja secreção está relacionada com processos de fibrose que decorrem no decurso da rejeição.

De forma geral, a expressão de determinados genes e seus produtos proteicos pode permitir o diagnóstico diferencial entre a rejeição clínica e subclínica. Incluem-se nesta situação a expressão do factor de transcrição T-bet e das moléculas Fas-L e CD152 (CTL4A) (Cornell *et al*, 2008).

É importante salientar que a migração celular de leucócitos para o tecido transplantado é promovida pela presença de quimiocinas. Estas são produzidas por vários tipos de células, nomeadamente leucócitos, e actuam através da ligação a receptores que são expressos por múltiplas células.

Assim, estudos em ratinhos transplantados mostraram que o bloqueio dos receptores de quimiocinas CCR1, CCR5 e CXCR3, bem como o bloqueio das quimiocinas CCL17 e CCL19/CCL21 provocaram um atraso no processo de rejeição. Por outro lado, defeitos de expressão do receptor de quimiocinas CCR7 e da quimiocina CXCL10 no dador também estão associados a uma diminuição da rejeição aguda. Contudo, nenhum destes bloqueios ou deficiências de expressão afectou a rejeição crónica do rim transplantado (Cornell *et al*, 2008).

Tubulite

A tubulite é uma característica típica da rejeição celular aguda (figura 5), contribuindo para o aumento da creatininémia (Cornell *et al*, 2008). É inteiramente um processo celular que resulta da invasão do epitélio tubular por macrófagos e células T. Se o processo for muito intenso, pode levar à ruptura da membrana basal com extravasamento de proteínas para o interstício, levando a uma lesão renal progressiva.

Inicialmente verifica-se uma acumulação preferencial de células T dentro dos túbulos renais e menos no interstício. Estas células T são CD8+, contêm grânulos citotóxicos, e acedem às células tubulares através das junções inter-celulares entre estas. Como indicador da lesão local induzida por mediadores dos grânulos dos linfócitos CD8+, pode ocorrer aumento da excreção urinária de granzimas e perforinas.

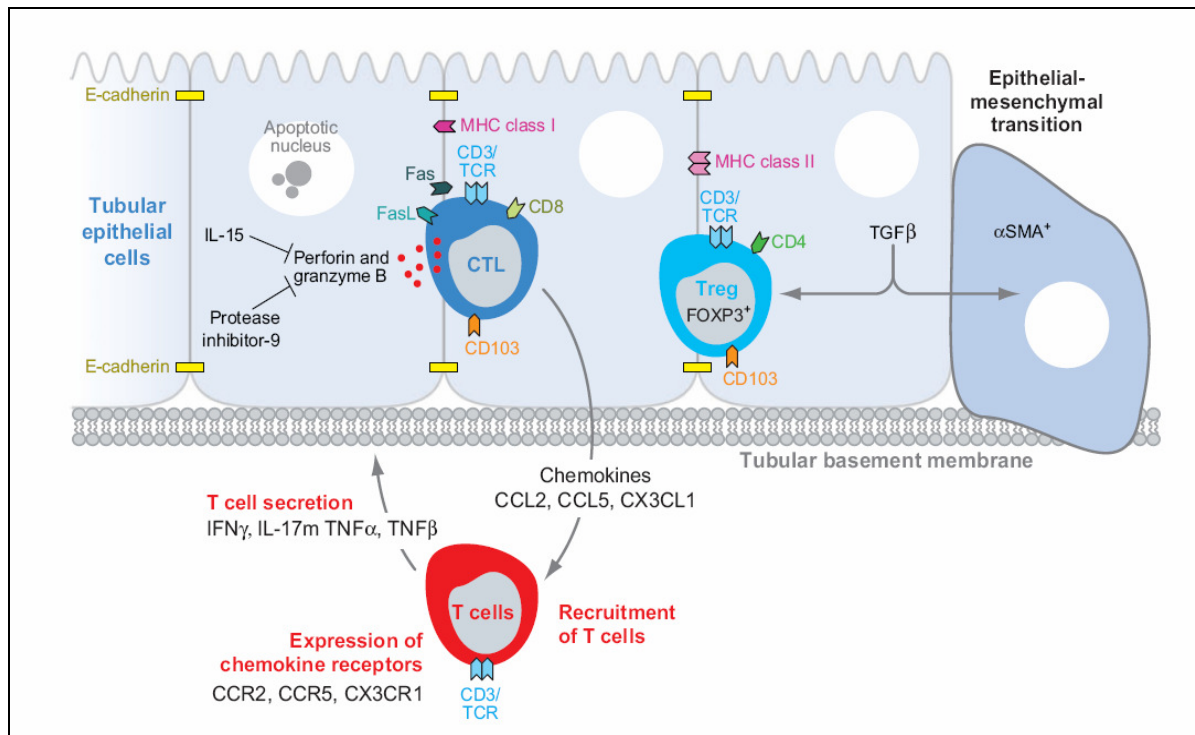


Figura 6. Diagrama ilustrador dos eventos que ocorrem na tubulite (adaptado de Cornell *et al*, 2008). A imagem evidencia os acontecimentos desde o recrutamento de leucócitos até a segregação de mediadores de apoptose. Apresenta ainda a resposta das células tubulares a esta invasão (síntese de inibidor de protease 9, TNFβ, IL-15 e as alterações do epitélio).

Os linfócitos CD8⁺ segregam citocinas pró-inflamatórias (IL-17, TNFα...) que actuam sobre as células tubulares. Este facto é evidenciado pela presença de receptores específicos nestas células (como é o caso do TNFR1). Esta interacção irá estimular as células tubulares a segregar quimiocinas (CCL2, CCL5 e CXCL1). Estas são então as responsáveis pela quimiotaxia de mais linfócitos T para os túbulos renais. Este facto também é evidenciado pela expressão molecular, nomeadamente a expressão de receptores de quimiocinas na superfície das células invasoras. Os linfócitos T irão acumular-se na matriz da membrana basal, com especial preferência pelos túbulos corticais proximais e distais.

Os linfócitos expressam factores de proliferação e a integrina $\alpha E\beta 7$ (CD103), que interage com a E-caderina, expressa pelo epitélio, o que permite uma adesão e migração trans-endotelial linfocitária para os túbulos. De facto, há um aumento da expressão de CD103 (mRNA e proteína) e observa-se mesmo um aumento da excreção urinária de mRNA para CD103. Por outro lado, as células tubulares também expressam moléculas de adesão celular como a ICAM-1, que contribui igualmente para a migração intra-tubular de linfócitos T que expressam o ligando para esta molécula. Finalmente, as células tubulares também expressam CD80 e CD86, que podem contribuir, por serem moléculas co-acessórias, para a co-estimulação de células T.

As células tubulares respondem à agressão organizada pelas células T através da produção de inibidor da protease 9, que inibe a acção da granzima B. Após exposição mantida à inflamação local e a factores como o TGF- β , o epitélio pode sofrer uma transformação mesenquimatosa, com reorganização.

Finalmente, nos túbulos renais também se observam células CD4+ Treg (T reguladoras), que expressam FOXP3⁺. Não se saiba ao certo qual a sua função neste contexto (Cornell *et al*, 2008), embora possam ter um papel na tentativa de controlo do inflamação subjacente. A sua activação poderá ser indirectamente suspeitada através da excreção urinária aumentada de FOXP3⁺.

Endarterite

A endarterite é detectada em cerca de 25 a 40% de biopsias renais realizadas em casos de rejeição aguda (Cornell *et al*, 2008), sendo raramente detectadas em órgãos que não sofreram rejeição. Manifesta-se de forma focalizada em artérias de diferentes calibres.

A expressão de quimiocinas (CCL4, CCL5, CXCL8) por parte de células endoteliais promove um gradiente de quimiotaxia de células T e macrófagos. A adesão destas células ao

endotélio deve-se ao aumento da expressão de moléculas de adesão celular (ICAM-1 e PECAM) por parte das células endoteliais, as quais acabam por sofrer apoptose. Que pode ocorrer mesmo independentemente da intervenção de células B ou Ac.

Geralmente, neste contexto, a glomerulite é pouco intensa. Nos casos mais severos, ocorre edema com lise mesangial.

1.2.1.2. Rejeição aguda humoral

A rejeição humoral aguda baseia-se na acção de Igs sobre as células “*non-self*”, sendo assim mediada por células B.

As células ou linfócitos B são, como já foi referido, activadas pelas células T (figura 7). Apesar de funcionarem como APCs, o processamento de Ags não é suficiente para a activação da resposta humoral. Esta depende da produção de citocinas (IL-2) e de outros factores solúveis, bem como da interacção entre receptores de membrana como MHC II – TCR, CD40 – CD40L, CD80/CD86-CD28, presentes na célula B – célula T, respectivamente. Ambas as células mudam de forma, optimizando o contacto entre elas.

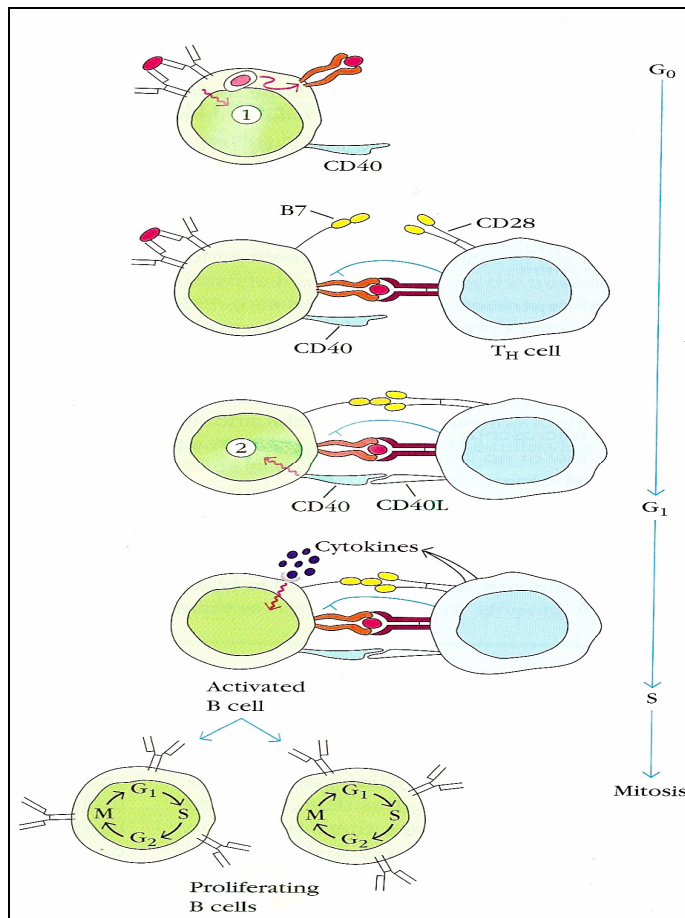


Figura 7. Ativação de linfócitos B (adaptado de Goldsby *et al*, 2002).

Todo este processo dura várias horas (Tinckam *et al*, 2006). Destina-se a estimular a proliferação celular (expansão clonal) originando células B de memória e células B efectoras.

Para que a interacção entre as células ocorra é necessário promover a proximidade física entre células T e B. Esta é possível nos órgãos linfóides secundários, como os gânglios linfáticos e o baço. Nestes, o tecido linfóide além de estar encapsulado, encontra-se organizado em zonas de células T, zonas de células B e folículos linfóides (contêm centros de germinação que são focos de proliferação de células B).

Nos órgãos linfóides, o contacto entre células é mediado pela expressão de marcadores moleculares e respectivos receptores nestas células.

Quando ocorre a migração das APCs (geralmente uma célula dendrítica) para um gânglio linfático (ou baço) verificam-se uma série de alterações em ambos os linfócitos T e B.

Após a apresentação antigénica, ocorrem várias alterações fenotípicas nas células T, nomeadamente algumas que aumentam a capacidade destas células em efectuar o fenómeno de diapedese (processo pelo qual ocorre a passagem de células através da parede venosa para um tecido). Entre estas alterações fenotípicas, inclui-se um aumento na expressão do receptor de membrana CXCR5. Este é o receptor para a quimiocina CXCL13, presente nos folículos primários, onde se encontram as células B.

As células B, por sua vez, após a activação, expressam o receptor CCR7 que interage com as quimiocinas CCL19 e CCL21, presentes na zona das células T.

Assim, as compatibilidades entre receptores e seus ligandos aumentam a possibilidade de interacção entre células T e células B

Um dos resultados desta interacção consiste na mudança de isotipo. Isto significa que as células B que sofrem esse processo vão recombinar segmentos do seu DNA de forma a poderem passar a expressar um isotipo de Ig diferente, embora com a mesma especificidade antigénica. Assim, uma célula B pode abandonar a produção constitucional de IgM, passando a sintetizar outra classe de Igs. No entanto, as primeiras células B a ficarem activadas pela interacção com as células T (ainda na zona de células T) produzem apenas IgM com média ou baixa afinidade para o Ag. A restante população de células B desenvolve-se nos centros germinativos dos folículos linfóides secundários, após muitas divisões celulares, processo que é necessário não só para a mudança de isotipo mas também um aumento de afinidade das Igs produzidas em relação aos respectivos antigénios. A este fenómeno chama-se maturação de afinidades. Nele ocorrem frequentes mutações genéticas que se reflectem na afinidade da Ig. As células B que sofreram os processos de mudança de isotipo e maturação de afinidades são então sujeitas a um processo de

selecção negativa. Neste processo, as células cujos receptores (Igs expressas na membrana celular) apresentem uma afinidade insuficiente para o Ag serão eliminados por apoptose.

Para além de células efectoras, as células B também se diferenciam em células de memória, nos folículos linfóides secundários. Estas células de memória podem sobreviver durante muitos anos, podendo ser activadas posteriormente, caso haja um novo contacto com os mesmos Ags. Entretanto, as células B de memória recirculam entre compartimentos linfóides, não tendo capacidade para se fixar em tecidos periféricos (figura 8).

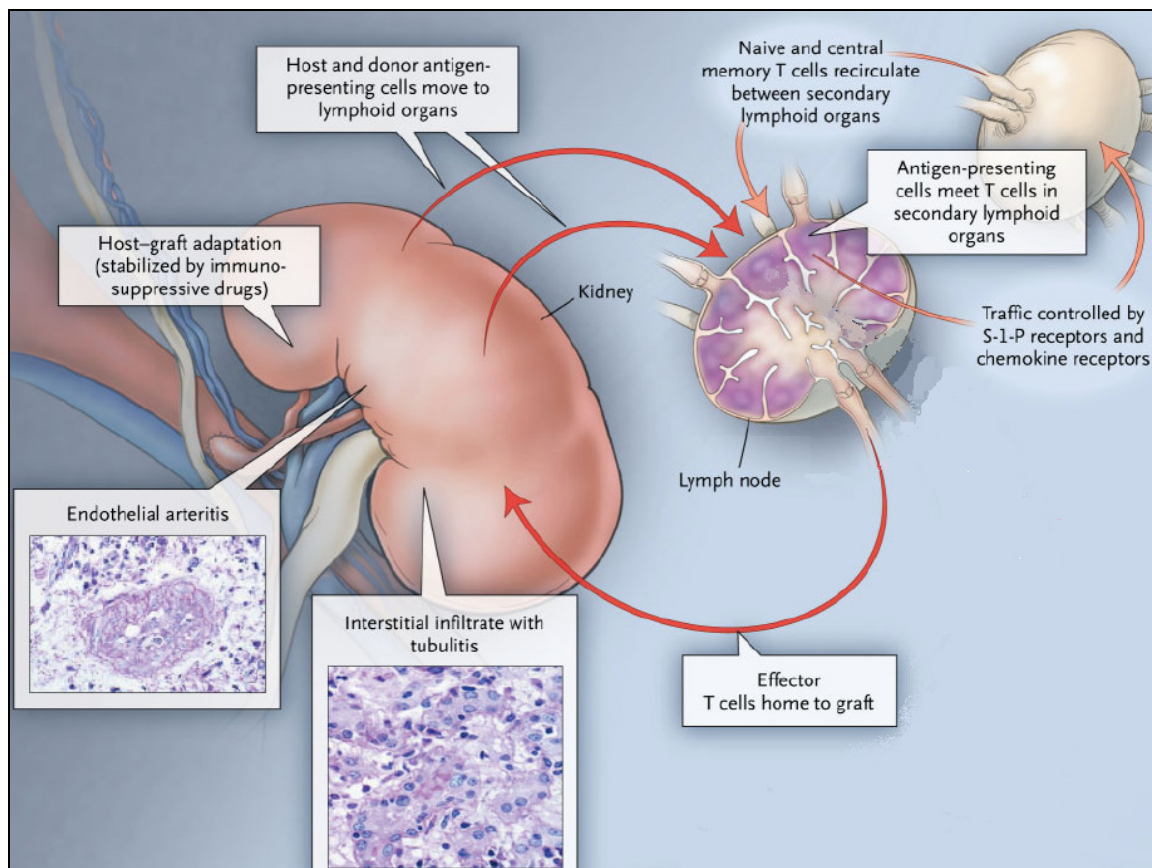


Figura 8. Movimentos celulares entre o órgão transplantado e os órgãos linfóides secundários (modificado a partir de Halloran, 2004).

Por outro lado, as células B efectoras, uma vez activadas, rapidamente sofrem uma diferenciação para plasmócitos, células com capacidade de produção muito elevada de anticorpos.

As Igs (anticorpos) têm a capacidade de se ligarem aos Acs indutores da resposta imunitária em causa. Quando estes antigénios são expressos na membrana celular de células-alvo, ocorre o fenómeno de opsonização destas células, que resulta da ligação de múltiplas moléculas de Igs aos antigénios membranares. Desta forma, estas células-alvo ficam “marcadas”, o que facilita a sua eliminação por mecanismos como os de a) fagocitose por macrófagos e neutrófilos, b) da citotoxicidade celular mediada por células NK (fenómeno denominado de citotoxicidade celular dependente de anticorpos) e c) da lise mediada pelo sistema do complemento (o qual tem a capacidade de perfurar membranas celulares, mediando assim a lise celular). Em relação a este último mecanismo, dever-se-á salientar que a rejeição humoral aguda irá ser classificada como dependente ou independente do sistema complemento consoante a capacidade das Igs em causa para activar o complemento pela via clássica. Esta capacidade diminui na seguinte ordem: IgG3>IgG1>IgG2>IgG4.

A lesão mediada pelo complemento é o mecanismo predominante da rejeição humoral aguda. A acção de Acs na ausência de do complemento ocorre principalmente em processos de rejeição crónica (Tinckam *et al*, 2006).

É importante realçar que a rejeição humoral aguda representa uma entidade clínica distinta da rejeição celular aguda. Geralmente a sua presença está associada a um pior prognóstico (Colvin, 2007). Podem, no entanto, ocorrer simultaneamente. A distinção com base em critérios clínicos é difícil. É essencial recorrer à biopsia para o seu diagnóstico.

Cerca de 25% dos casos de rejeição aguda são devidos, pelo menos em parte, à rejeição humoral aguda (Cornell *et al*, 2008). É também importante salientar que esta forma de rejeição é

o mecanismo presente nas rejeições hiperagudas. No entanto, a rejeição mediada por Acs também pode ocorrer durante as primeiras semanas ou até anos após o transplante, sendo geralmente despoletada pela diminuição da imunossupressão (iatrogénica, má-absorção, má compliance).

A pré-sensibilização é o maior factor de risco para a rejeição humoral aguda (Colvin, 2007). Verifica-se nos organismos em que ocorreu contacto prévio com os Ags contra os quais foram produzidos Acs. No momento do transplante, as células B de memória ficam activadas e diferenciam-se em plasmócitos produtores de Acs específicos contra os Ags em causa. É uma reacção rápida e específica.

A pré-sensibilização constitui uma barreira importante para o transplante. Em 2003, nos EUA, 32% dos indivíduos em lista de espera foram considerados sensibilizados a Ags HLA, 13,7% dos quais tinham níveis significativos de Acs contra um painel de antigénios renais em mais de 80% dos casos (Jordan *et al*, 2006).

Existem vários mecanismos de pré-sensibilização tais como múltiplas gravidezes ou transfusões prévias. No caso dos xenotransplantes, apesar de não ter ocorrido nenhum contacto prévio com os antigénios em questão, os Acs contra os determinantes hidratos de carbono ocorrem naturalmente, de forma análoga ao que acontece nas incompatibilidades AB0.

Outro factor de risco para a RHA é a baixa aderência ao tratamento imunossupressor.

No caso de existirem semelhanças entre os complexos MHC pode ainda assim ocorrer rejeição, pois neste caso podem manifestar-se as diferenças quanto a outros grupos de antigénios. Esta é a razão pela qual todos os alotransplantes, mesmo entre indivíduos com elevado grau de histocompatibilidade, necessitam de algum grau de imunossupressão.

A maior parte dos Acs são reactivos contra as moléculas do HLA. No entanto podem ser reactivos aos Ags AB0, ou ainda a Ags endoteliais. Recentemente também foram implicados auto-anticorpos, nomeadamente IgGs anti - receptores de Angiotensina II (Draun *et al*, 2005). A

estes Ags não HLA, que também podem despoletar rejeições humorais, é dado o nome de antígenos *minor*. O seu papel é independente do HLA (Flegel, 2007).

É preciso realçar que, embora nos casos não reactivos a Ags AB0 o processo de rejeição se caracterize por ser menos vigoroso pode, contudo, ser destrutivo para o órgão transplantado.

Num estudo levado a cabo por Zou *et al* (2007), a presença de Acs contra Ags MICA (*major-histocompatibility-complex class I-related chain A*) foi relacionada com a insuficiência do transplante a longo prazo. Estes Ags são estruturalmente semelhantes ao MHC I e geneticamente pertencem ao complexo genético MHC I.

A expressão de MICA na superfície de células endoteliais e epiteliais, fibroblastos e monócitos é induzida por situações de *stress*. Trata-se de um ligando do receptor NKG2D das células NK e linfócitos T CD8+.

O polimorfismo génico evidenciado, mais marcado do que em relação aos Ags MICB (*major-histocompatibility-complex class I-related chain B*), é provavelmente o responsável pela sua reactividade (Flegel, 2007).

Estruturalmente, a rejeição humoral aguda manifesta-se pela invasão de capilares peritubulares e glomerulares por neutrófilos e monócitos. O endotélio vascular perde as suas fenestrações, ocorre o descolamento da membrana basal e lise e apoptose de células.

Nos casos mais severos, podem ocorrer microtrombos, enfarte, necrose de parede arterial e hemorragias. Pode ainda ocorrer necrose cortical franca (Cornell *et al*, 2007). Contudo, processos de tubulite e endarterite ocorrem raramente e de forma pouco intensa. A sua presença indica um processo celular de rejeição concomitante.

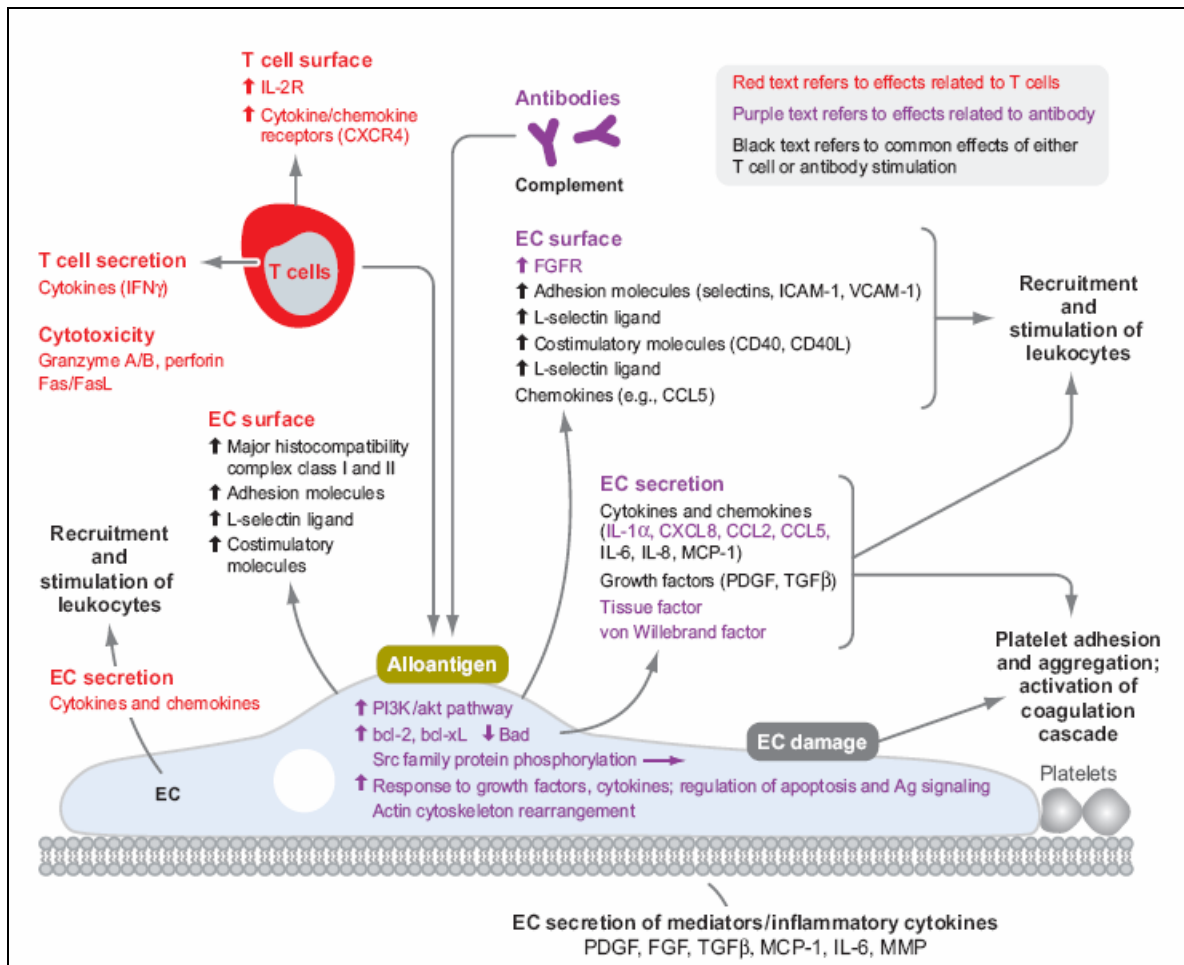


Figura 9. Diagrama ilustrador de eventos presentes na rejeição mediada por células e por Acs (adaptado de Cornell *et al*, 2007).

As células CD4+ reguladoras Treg (FOXP3+) raramente estão presentes neste contexto, ao contrário do que acontece na rejeição mediada por células. Este facto pode explicar o pior prognóstico associado à rejeição humoral aguda (Colvin, 2007).

Nenhuma alteração histológica é patognomónica ou específico deste processo e os Acs responsáveis podem não ser detectados no sangue periférico, depositando-se no órgão.

Assim, para o diagnóstico é necessário demonstrar, de forma directa ou indirecta, no tecido colhido através da biópsia, a presença dos Acs responsáveis pela rejeição humoral aguda.

Métodos de detecção de reacção humoral aguda

A *microscopia por imunofluorescência* pode ser utilizada, mas não detecta com segurança Igs depositadas nos vasos.

Um método indirecto consiste na *detecção do componente C4d do complemento* através da sua coloração (método desenvolvido por *Feucht*). O C4d é um fragmento inactivo de C4b, que integra a via clássica do complemento. Não possui função específica, mas mantém-se ligado aos tecidos durante vários dias. Estabelece ligações covalentes com o endotélio (tem especial preferência pelos capilares peritubulares, adoptando um padrão em anel) e o colagénio da membrana basal. É removido dos tecidos após a actividade dos Acs ter cessado. No entanto, a sua presença não garante que a via final comum e a consequente agressão pelo MAC ocorra. A activação pode ser interrompida ao nível de C4 da cascata do complemento (*Tinckam et al*, 2006).

Em rins normais, o componente C4d também é detectado, nomeadamente no mesângio glomerular e no pólo vascular. Indica a existência de um “*turnover* constitucional de complexos imunes” (*Koch et al*, 2008, [1]). Quando o recurso ao sistema do complemento aumenta, como ocorre nas doenças do depósito de complexos imunes, então o depósito destes complexos ocorrerá também nos capilares glomerulares.

O depósito de C4d em capilares peritubulares apenas foi descrito em transplantes renais, sugerindo a actividade de Acs anti-dador. A razão desta especificidade ainda não está totalmente esclarecida. Apesar de existirem Acs HLA quer nos capilares peri tubulares, quer no glomérulo, a protecção anti-complemento no glomérulo é mais intensa. Esta ocorre através da presença de 4 inibidores de actividade do complemento na superfície celular: o *decay accelerating factor (DAF)-CD55*, o *membrane co-factor protein (CD46)*, o *CR1 (CD35)* (receptor do complemento), a *protectina (CD59)* (*Koch et al*, 2008, [1]).

Vários estudos demonstram uma elevada correlação entre a deposição de C4d e a presença de neutrófilos, necrose fibrinóide e Acs anti-dador circulantes. Em 88-95% dos casos detectados, Acs anti HLA I e II do dador estão presentes (Cornell *et al*, 2008).

Apesar da associação entre a deposição de C4d e Igs circulantes, aquela pode ocorrer na ausência destas (ou pelo menos na ausência da detecção de Igs). As Igs circulantes podem ocorrer em níveis inferiores aos necessários para a sua detecção, o que se deve provavelmente à sua absorção pelo transplante. Novos testes, mais sensíveis, poderão resolver este problema (Cornell *et al*, 2008).

O contrário também pode ocorrer (presença de Acs anti-dador circulantes na ausência de C4d). Poderá resultar da existência de Igs não activadores do sistema complemento (Koch *et al*, 2008, [1]).

A ocorrência de C4d também se pode verificar na ausência de clínica, o que acontece até cerca de 25% das biopsias (Tinckam *et al*, 2006).

A detecção de depósitos de C4d, como indicativo da presença de actividade humoral, está associado a um pior prognóstico (Tinckam *et al*, 2006). Quando comparada a sobrevivência do transplante no primeiro ano, verifica-se que entre os doentes com C4d detectado em biópsia é de 70% e entre os doentes sem C4d é >90% (Tinckam *et al*, 2006).

O complemento tem outras funções para além da promoção da lise celular, através da constituição do complexo de ataque à membrana (C5b-9). Através dos componentes C3a e C5a promove a quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos (expressam receptores para estes elementos), a activação de células endoteliais, a proliferação de moléculas de adesão endotelial (selectina E, ICAM, “vascular cell adhesion molecule-1”) e a produção de citocinas e quimiocinas. O

componente C3a estimula também a libertação de PGE2 dos macrófagos. E o componente C5a edema ao libertar histamina por mastócitos.

O MAC também estimula a proliferação de células endoteliais através da libertação de factores de crescimento (PDGF, β -FGF) e quimiocinas (CCL2, CCL5 e CXCL8).

Os componentes C5a e C5b-C9 podem estimular a síntese de factor tecidual (contribuindo para trombose microvascular).

Experiências com animais demonstraram que é possível induzir protecção contra a rejeição mediada por Acs através inibição do sistema complemento” (Cornell *et al*, 2007), o que salienta o papel crucial mediado por este sistema neste contexto.

As vias de acção humoral independentes do complemento actuam através das células NK e dos macrófagos. São a razão pela qual não é detectado o componente C4d em alguns casos.

Igs, sem a participação de leucócitos ou complemento, actuam sobre as células endoteliais, activando estas e levando à produção de quimiocinas e de moléculas de adesão, responsáveis pela quimiotaxia das células NK e macrófagos.

Após a união com Ags invasores, as Igs podem ligar-se, através da sua porção Fc, ao receptor Fc existente nas células NK e macrófagos. Assim marcam as células invasoras. Como já foi referido anteriormente, este processo é designado por citotoxicidade mediada por Acs (ADCC).

A presença de trombose microvascular é uma característica patológica presente na rejeição aguda e hiperaguda. Deve-se à libertação de factor de *von Willebrand* pelo endotélio, ocorrendo a agregação plaquetária. A coagulação é iniciada através da acção de componentes do sistema do complemento.

1.2.2. Rejeição crónica

A suspeita clínica de rejeição crónica decorre da deterioração gradual da função do rim transplantado, manifestando-se pela subida progressiva e lenta da creatininémia, proteinúria de intensidade crescente (por vezes atingindo valores que se enquadram no espectro do síndrome nefrótico) e hipertensão cada vez mais grave.

A rejeição crónica pode ocorrer por mecanismos humorais e/ou celulares.

Mecanismos celulares de rejeição crónica

Os mecanismos celulares baseiam-se em respostas de hipersensibilidade tardia (tipo IV) mediadas por macrófagos e células T CD4+ (tipo Th1) e nos quais ocorre uma reacção inflamatória localizada estimulada pelas citocinas produzidas. De facto, experiências em ratinhos demonstraram a importância do IFN- γ como mediador imunopatológico sintetizado pelas células Th1 neste contexto (Cornell *et al*, 2008).

Mecanismos humorais de rejeição crónica

Relativamente à rejeição humoral crónica, tal como a aguda pode ser dependente ou não do sistema do complemento. Os mecanismos não dependentes são inclusivamente, como foi referido, mais comuns na rejeição crónica do que na aguda.

Alguns estudos em primatas não humanos permitiram sequenciar os processos fisiopatológicos subjacentes à rejeição crónica. Em primeiro lugar ocorre a produção de Acs, seguindo-se o depósito de C4d no órgão transplantado, ainda sem alterações histológicas. Estas só ocorrem numa terceira fase. Por último ocorre a disfunção do órgão transplantado, a insuficiência renal (Cornell *et al*, 2008).

A rejeição crónica atinge o glomérulo, túbulos, vasos e o interstício originando várias alterações patológicas: glomerulopatia de transplante, capilaropatia peritubular, arteriopatia de transplante, fibrose intersticial e atrofia tubular.

A *glomerulopatia de transplante* manifesta-se pela duplicação ou multilaminação da membrana basal, com perda de podócitos e apagamento de fenestrações.

Ocorre na sequência de vários insultos: doença glomerular por complexos imunes de novo ou recorrente, microangiopatia trombótica e lesão crónica mediada por Acs. Estes são responsáveis pela maioria dos casos, nomeadamente Acs anti-MHC classe II. Trinta a 50% dos casos acompanham-se de deposição de C4d nos capilares peritubulares. De facto, depósitos de C4d juntamente com Acs circulantes anti-HLA do dador são diagnóstico de rejeição humoral crónica (RHC).

Tem como principais factores de risco a existência de rejeição humoral aguda prévia.

Na *capilaropatia peritubular* ocorre também um processo de multilaminação. Resulta da reacção do endotélio a lesões repetidas por Acs pois cada vez que é agredido e necessita de se reparar, formando uma nova camada de membrana basal. A multilaminação reflecte a flutuação dos níveis de Acs durante o período de rejeição crónica do transplante. Ocorre também uma acumulação de células mononucleares, predizendo estes factores a insuficiência posterior do órgão transplantado.

A *arteriopatia do transplante* caracteriza-se pela formação de uma neoíntima espessada, sem duplicação da lâmina elástica, com a presença de células mononucleares, quer os C4d sejam detectáveis ou não.

A *fibrose intersticial e atrofia tubular* constituem alterações histológicas características da rejeição crónica, mas não específicas. Na verdade, estas alterações são ainda objecto de discussão, uma vez que se podem dever à presença de Acs específicos do dador e C4d, podem estar na dependência de mecanismos de rejeição mediada por células T ou ainda ser devidos à toxicidade dos fármacos inibidores da calcineurina (ver subcapítulo sobre imunossuppressores) (Cornell *et al*, 2008).

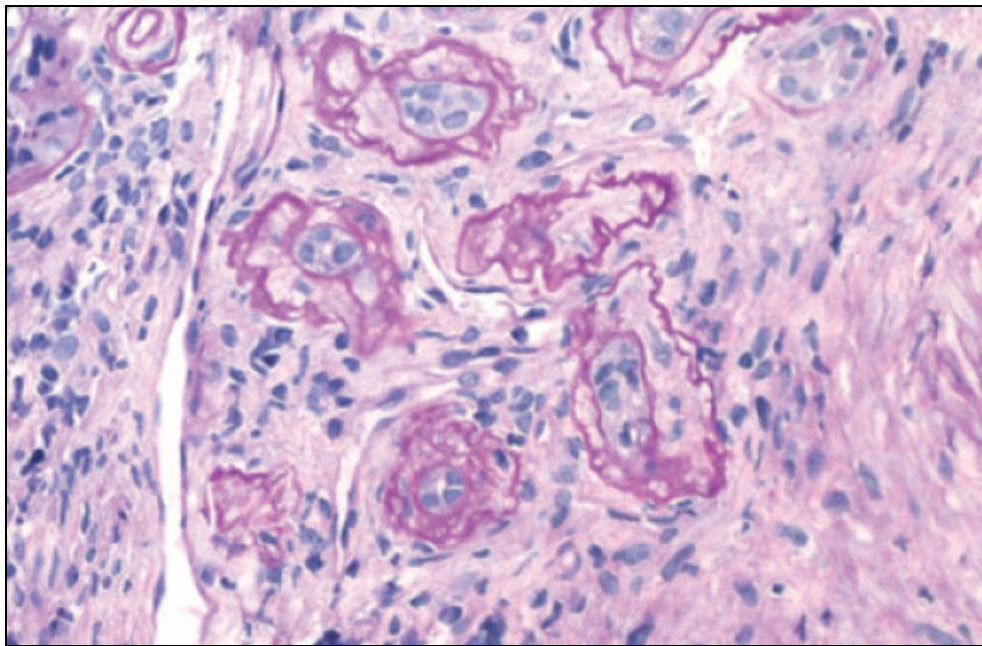


Figura 10. Atrofia tubular presente na rejeição crónica (adaptado de Cornell *et al*, 2008)

A transformação mesenquimatosa do epitélio de células tubulares resulta da migração de miofibroblastos activados em direcção ao interstício. O TGF β poderá ter um papel importante nesta alteração. A transformação ocorre através da perda de adesões inter-celulares, perda de E-

caderina, aquisição de actina, ruptura da membrana basal, migração celular e produção de moléculas pró-fibróticas.

Na rejeição crónica observa-se também a presença de neogénese linfática, que está associada a mau prognóstico. (Kerjaschki *et al*, 2004).

Também na rejeição crónica a presença de C4d no tecido biopsado, além de estar associado à rejeição crónica e à glomerulopatia do transplante, também é capaz de o predizer (Tinckam *et al*, 2006).

Por vezes, as alterações histopatológicas encontradas em transplantes renais com disfunção renal de início tardio são inespecíficas, consistindo nomeadamente em “fibrose intersticial e atrofia tubular sem evidência de uma etiologia específica (Vella *et al*, 2008, [3]).

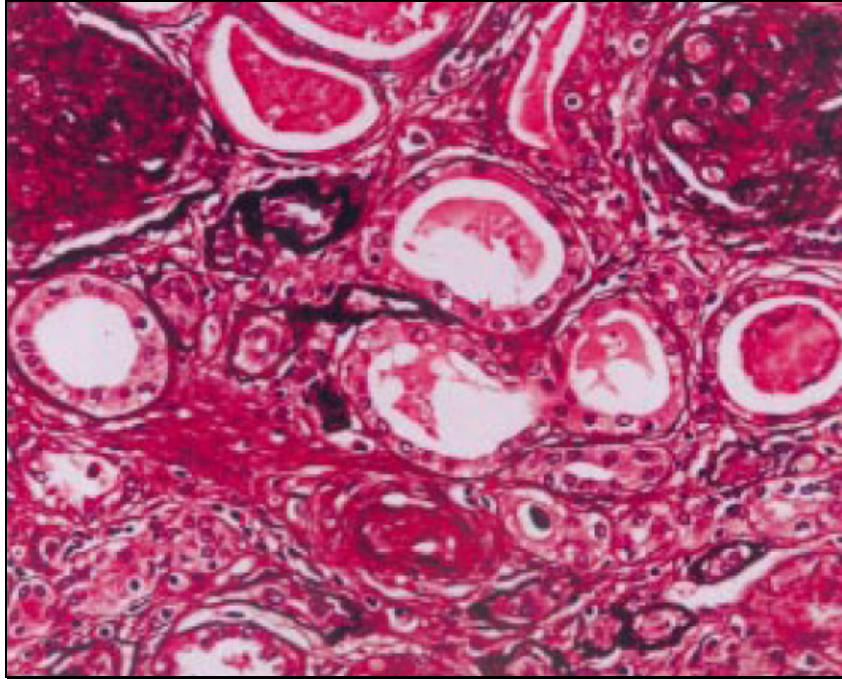


Figura 11. Aparência ao M.O.C. característica da nefropatia do transplante, evidenciando a obliteração vascular, alterações glomerulares membranoproliferativas e atrofia tubular (Andrews, 2002)

Nestes casos não é possível determinar uma etiologia. Os achados podem resultar de um processo de rejeição imune crónica, da toxicidade de um fármaco inibidor da calcineurina (ciclosporina) ou de processos patológicos não imunes causadores de *stress* fisiológico (hipertensão arterial, diabetes, atraso no funcionamento do transplante, dislipidémia, hiperfiltração glomerular...). Os contributos destes processos não se excluem mutuamente.

A revisão da classificação do sistema de Banff realizada em 2007 classificou estas alterações, designando-as como nefropatia crónica do transplante. Trata-se de uma entidade clínico patológica que nos Estados Unidos da América é responsável por 20% dos transplantes realizados (Vella *et al*, 2008, [3]).

Pela inespecificidade das características, a sua verdadeira etiologia geralmente não é conhecida. Devido à inexistência de critérios de diagnósticos aceites universalmente para esta entidade, não se conhece a sua verdadeira incidência.

Num estudo efectuado com doentes transplantados, Nankivell *et al* (2003) concluiu que o risco de nefropatia crónica do transplante estava relacionado com a isquémia ou rejeição subclínica aguda. Para além disso, estes mesmos autores detectaram que 37% das biopsias realizadas em doentes transplantados apresentavam alterações histológicas compatíveis com os critérios para nefropatia crónica do transplante renal, segundo o sistema Banff.

Colvin (2003) refere que vários estudos apontam para o facto de “uma fracção substancial da lesão crónica do órgão transplantado é mediada pelo sistema imunitário”.

1.2.3. Critérios histológicos de rejeição

Com o objectivo de uniformizar e monitorizar a progressão das alterações histológicas, assim como a sua resposta aos diferentes planos terapêuticos foram criados critérios histológicos de rejeição.

O sistema de Banff foi inicialmente criado em 1993 e posteriormente revisto em 2007 (Koch *et al*, 2008, [2]). O seu objectivo foi o de sistematizar os tipos de reacções histológicas observadas. Inclui as seguintes categorias:

- 1. Biópsia histologicamente normal

- 2. Rejeição mediada por Acs – rejeição documentada com Acs anti – dador (ou suspeita se Acs não identificados).

Diagnóstico: presença de 3 dos seguintes critérios:

- disfunção do órgão transplantado
- evidência histológica de lesão de tecidos
- presença de C4d
- demonstração de Acs específicos anti-dador

Na rejeição aguda distinguem-se os seguintes tipos:

Tipo I – inflamação mínima com histologia semelhante a necrose tubular

Aguda (C4d positivo)

Tipo II – glomerulite capilar, com marginação e/ou trombose (C4d positivo)

Tipo III – inflamação arterial transmural/alterações fibrinóides

A rejeição crónica activa envolve a duplicação/multilaminação da membrana basal de capilares peritubulares e/ou fibrose intersticial/atrofia tubular e/ou espessamento fibroso da íntima das artérias (C4d positivo).

- 3. Alterações *borderline* – suspeitas de rejeição mediada por células T; inclui focos de tubulite (t1, t2, ou t3, com i0 ou il) sem arterite da íntima presente....
- 4. Rejeição mediada por células T

Na rejeição celular aguda distinguem-se os seguintes tipos:

Tipo IA – inflamação intersticial significativa (> 25% do parênquima afectado) e focos de tubulite moderada

Tipo IB – inflamação intersticial significativa (> 25% do parênquima afectado) e tubulite severa

Tipo IIA – arterite pouco intensa a moderada

Tipo IIB – arterite severa associada a perda > 25% de área luminal

Tipo III – arterite transluminal, e/ou alterações fibrinóides arteriais, e necrose de células do músculo liso da média, ocorrendo em associação com inflamação linfocítica dos vasos

A rejeição crónica activa é caracterizada por arteriopatía crónica, que envolve fibrose da íntima da artéria com infiltração de monócitos e formação de uma neo-íntima.

- 5. Fibrose intersticial e atrofia tubular (sem evidência de uma etiologia específica).

Costumava designar-se por nefropatia crónica do transplante.

Grau I – fibrose intersticial pouco intensa e atrofia tubular (<25% de área cortical)

Grau II – fibrose intersticial moderada e atrofia tubular (25 a 50% de área cortical)

Grau III – fibrose intersticial severa e atrofia tubular (>50% de área cortical)

- 6. Outros – alterações que resultam de rejeição aguda ou crónica

1.2.4 Imunidade Inata na transplantação

Segundo Cornell *et al* (2008), o papel do sistema imunitário inato na rejeição aguda e crónica tem vindo a ser valorizado com experiências recentes.

Para além do papel crucial detido por factores humorais como o sistema do complemento na rejeição aguda e factores celulares como as células NK (como já descrito em capítulos anteriores), outros factores ligados à imunidade inata poderão ter importância nos mecanismos de rejeição de transplantes renais.

Logo após o transplante, a lesão isquémica por reperfusão é mediada radicais livres de oxigénio, que activam o sistema imunitário inato, nomeadamente através de receptores de “perigo” denominados *toll-like receptors* (TLR). Os TLR são receptores expressos na superfície de várias células e que fazem parte da família dos receptores de reconhecimento de padrões (*pattern-recognition receptors*, PRR). Os PRR estão envolvidos no reconhecimento de moléculas de origem bacteriana, viral ou mesmo medicamentosa e na activação das células do sistema imunitário que as expressam, quando reconhecem essas substâncias no organismo. Embora pertençam ao sistema imunitário inato, a sua capacidade de reconhecimento e distinção entre o “self” e “non-self” é razoavelmente elevada (embora a um nível francamente inferior ao dos receptores dos linfócitos T e B). Os PRR mantiveram-se estáveis ao longo da evolução e foram sempre relacionados com o reconhecimento de microrganismos invasores. A produção de TNF- α e IL-1 estimulada pelos TLR, induz a síntese de CXCL8 em células tubulares. Este marcador interage com o receptor CXCR2 presente nos neutrófilos. São assim mediadores de lesão tecidual.

1.3. Testes de histocompatibilidade e monitorização de rejeição

Considerando o que foi atrás dito sobre os mecanismos de rejeição de transplantes renais, torna-se muito importante averiguarmos quais são os testes mais relevantes para avaliarmos a existência de histocompatibilidade e rejeição e suas fases.

Em termos imunitários gerais, os processos de rejeições mais intensos são causados por diferenças no grupo sanguíneo AB0 e no MHC.

Os Ags que definem o grupo sanguíneo são expressos nos eritrócitos, nas células epiteliais e endoteliais; como tal estarão presentes no transplante, mesmo na ausência de eritrócitos. Os Acs produzidos contra estes Ags promovem a lise destas células mediada pelo sistema do complemento.

Quanto ao MHC, existem vários testes que têm como objectivo global avaliar a compatibilidade entre o dador e o recipiente no que diz respeito à estrutura do HLA.

Os testes que se baseiam em métodos serológicos pesquisam a presença de Acs no soro do doente específicos para determinados Ags, nomeadamente moléculas determinadas pelo MHC. Neste grupo incluem-se: 1) reacção cruzada entre o soro do recipiente e as células do dador; 2) rastreio de Ig anti-HLA no soro do recipiente com células conhecidas, ou seja, cujo MHC é conhecido. Se estiverem presentes, “os Acs indicam que o sistema imunitário do recipiente foi sensibilizado a Ags do potencial dador” (Lebeck *et al*,1999).

Teste de microtoxicidade

Com o objectivo de conseguir detectar semelhanças entre o HLA do dador e do receptor realiza-se o teste de microtoxicidade, recorrendo a Acs conhecidos que são usados como

marcadores moleculares. Neste, a leucócitos dos potenciais dadores e receptores são adicionadas Ig específicas para vários alelos MHC classe I e II. Se os linfócitos expressam o alelo MHC para o qual um determinado Ac monoclonal é específico, sofrerão lise após a adição de factores do complemento. A citotoxicidade é avaliada pela adição de corantes que serão captados pelas células que sofrem lise. Como é realizado com linfócitos do dador e do recipiente, podemos comparar o MHC dos dois. Se não ocorrer compatibilidade total entre MHCs, o transplante pode ainda assim ser possível.

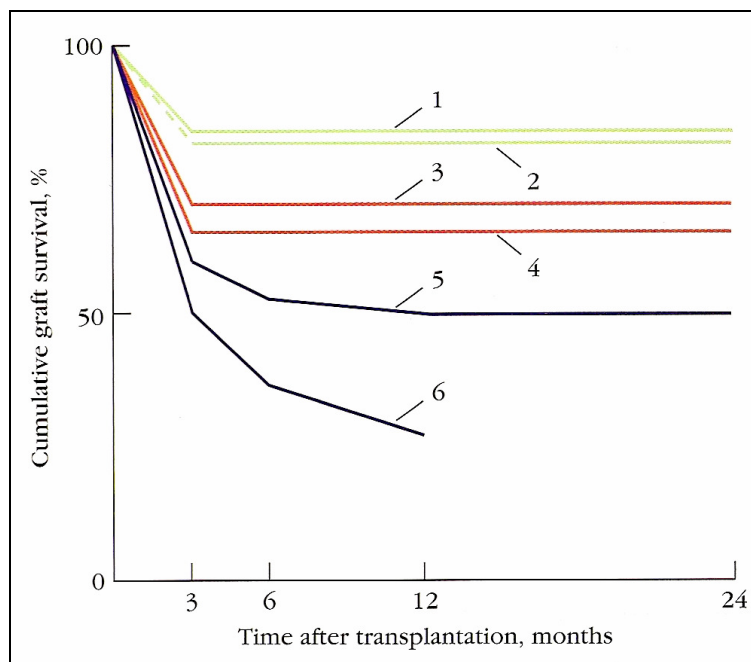
Reacção linfocitária mista

A reacção linfocitária mista (RLM) baseia-se na imunidade celular. Nesta, linfócitos do potencial dador são sujeitos a um tratamento com o objectivo de interromper o ciclo celular (irradiação ou tratamento com mitomicina C). São, então adicionadas células (linfócitos, APCs...) do potencial hospedeiro. Avalia-se a proliferação de células T, necessariamente do receptor, uma vez que as células do dador não conseguem proliferar, através da captação de timidina também adicionada. A proliferação em curso reflecte a reacção imunológica do dador contra o receptor. Será, assim, proporcional às diferenças imunohistoquímicas entre os tecidos. Geralmente o grau de proliferação é apresentado como uma resposta relativa (RR), ou seja, uma percentagem da resposta máxima possível. Geralmente uma $RR < 7\%$ indica existência de HLA idênticos, mas não é diagnóstico. Uma $RR 7-30\%$ não tem valor preditivo e uma $RR > 30\%$ indica ausência de identidade entre HLA (Lebeck *et al*, 1999).

Este método tem como desvantagem o tempo que leva até estar concluído (vários dias), o que torna impossível a sua prática nos casos em que o dador é cadáver, em que o tempo urge. O teste de microtoxicidade está concluído ao fim de algumas horas.

No que diz respeito à compatibilidade entre os MHCs, os Ags determinados pelo MHC II são mais preponderantes no processo de rejeição, uma vez que são estes que participam na via exógena de apresentação antigénica das APCs. Este facto reflecte-se nas taxas de sobrevivência de transplante.

A figura 12 juntamente com a tabela 1 demonstram como uma ou duas diferenças no Ags HLA classe II têm efeito semelhante na sobrevivência do transplante como 3 ou 4 diferenças ao nível do HLA I.



Número da curva	Número de incompatibilidades HLA	
	Classe I	Classe II
1	0	0
2	1 ou 2	0
3	3 ou 4	0
4	0	1 ou 2
5	1 ou 2	1 ou 2
6	4 ou 4	1 ou 2

Figura 12. Efeito de incompatibilidades HLA na sobrevivência do transplante (adaptado de Goldsby *et al*, 2002)

1.4. Mecanismos imunitários ligados à tolerância

1.4.1. Aspectos gerais de tolerância

Há mais de 50 anos Billingham, Brent e Medawar descreveram pela primeira vez casos de tolerância imune activamente adquirida em recém nascidos (Ashton-Chess *et al*, 2006).

Ao longo dos últimos tempos tem-se investigado intensamente mecanismos indutores de tolerância, em diferentes modelos. O objectivo é compreender processos subjacentes a este fenómeno e procurar activá-los em determinados contextos, como no da transplantação, de forma a evitar os efeitos secundários associados à supressão do sistema imunitário.

A tolerância imunológica no contexto da transplantação de órgãos, consiste na “sobrevivência específica a longo prazo de um transplante, apresentando função e características histológicas normais, num recipiente não imunossuprimido que retém a capacidade de rejeitar um transplante de outro dador e aceitar um segundo transplante do mesmo dador” (Ashton-Chess *et al*, 2006).

A tolerância operacional define-se como a sobrevivência a longo prazo de um transplante, apresentando uma função estável num doente em que não se procede à fase de manutenção da imunossupressão, sem aumento de risco de infecções (Ashton-Chess *et al*, 2006).

Os casos de transplantes que mantêm uma função estável a longo prazo com terapêutica imunossupressora mínima designam-se de “quase” tolerância (Ashton-Chess *et al*, 2006).

Importa ainda distinguir a tolerância de uma outra condição, a acomodação. Nesta, os hospedeiros apresentam Acs anti-dador circulantes e um órgão transplantado funcional e sem evidência de lesões. A origem deste estado pode residir no órgão em si ou no recipiente. O órgão pode apresentar células endoteliais que expressam factores que apresentam factores protectores

contra Acs e acção do complemento. Quanto ao hospedeiro, este pode apresentar alterações no título de Acs ou na funcionalidade da porção Fc.

Roussey-Kesler *et al* foram os primeiros a descrever, em 2006, 10 casos de tolerância operacional. Após a sua análise identificaram 3 factores clínicos que poderão ter favorecido esta condição. O primeiro é a interrupção do tratamento imunossupressor por longo períodos de tempo (até 4 anos), o que possibilita a conclusão da existência de tolerância. O segundo refere-se ao dador, pois verificaram a idade jovem de todos os dadores. A média de idades era de 25 anos, o que sugere o bom estado dos órgãos transplantados, sem lesões associadas à idade. Os rins de dadores mais idosos estão também mais sujeitos a lesões por reperfusão (isquémia) e a atraso do funcionamento. O terceiro factor diz respeito à produção de Acs. Todos os recipientes foram fracos reconhecedores (“*low-responders*”) a transfusões sanguíneas. Ou seja, após terem recebido transfusões sanguíneas prévias ao transplante (com sangue sem depleção de leucócitos) desenvolveram Igs em baixas quantidades.

Os casos descritos só ocorreram devido à má aderência dos doentes ao tratamento imunossupressor. Uma vez que os doentes transplantados seguem os protocolos de imunossupressão existentes, com fase de indução e manutenção, ficam por diagnosticar a maioria dos casos de tolerância existentes.

É importante não confundir um estado de tolerância com a inibição da rejeição aguda ou a presença de um processo de rejeição crónica. Assim, para o diagnóstico desta é essencial a análise citológica ao material colhido em biópsia.

A tolerância pode ocorrer espontaneamente, após a cessação da imunossupressão instituída, ou pode ser induzida.

No transplante renal entre irmãos, com incompatibilidades quanto a um haplotipo HLA, a sobrevivência do transplante é maior se o dador tem Ags HLA maternos não herdados pelo recipiente (Burlingham *et al*, 1998). Este facto reflecte o contacto prévio com Ags maternos durante a gravidez, com a passagem de células maternas para o feto, e põe em evidência mais um mecanismo de tolerância.

Ao longo do tempo e com o estudo de casos de ocorrência espontânea, foram desenvolvidos vários métodos indutores de tolerância, que se baseiam no conhecimento de processos de tolerância central e tolerância periférica.

O desenvolvimento de um estado de tolerância durável irá depender do recurso a vários mecanismos tolerogénicos. Resultará da combinação entre a redução da expansão clonal linfocitária após a activação e a regulação activa do sistema imunitário.

A aplicação destas técnicas baseia-se num processo de equilíbrio entre a duração da terapia, toxicidade da terapêutica e estado do órgão transplantado.

1.4.2. Tolerância central

A tolerância central refere-se à deleção intratímica de células T aloreactivas.

O timo é o órgão responsável pela maturação de células T progenitoras/imaturas produzidas na medula óssea. Os objectivos desta maturação são assegurar a aloreactividade dos linfócitos e evitar fenómenos de autoimunidade.

Quando chegam ao timo, as células T progenitoras ainda não expressam os marcadores de superfície essenciais à sua função (CD3, CD4 ou CD8). Pela ausência simultânea de CD4 e CD8

são designados por células T duplamente negativas. Já no timo, os timócitos (isto é, os precursores de células T presentes neste órgão), passam a expressar moléculas que constituem o seu fenótipo como células T (TCR e CD3), bem como as moléculas acessórias CD4 e CD8. No entanto, nesta fase, as células T CD3+, chamadas duplamente positivas, por expressarem em simultâneo CD4 e CD8, são ainda células imaturas.

É importante realçar que as células do estroma tímico, consistindo em células epiteliais, macrófagos, células dendríticas, desempenham um papel essencial na maturação das células T imaturas. Todas estas células expressam moléculas do MHC classes I e II.

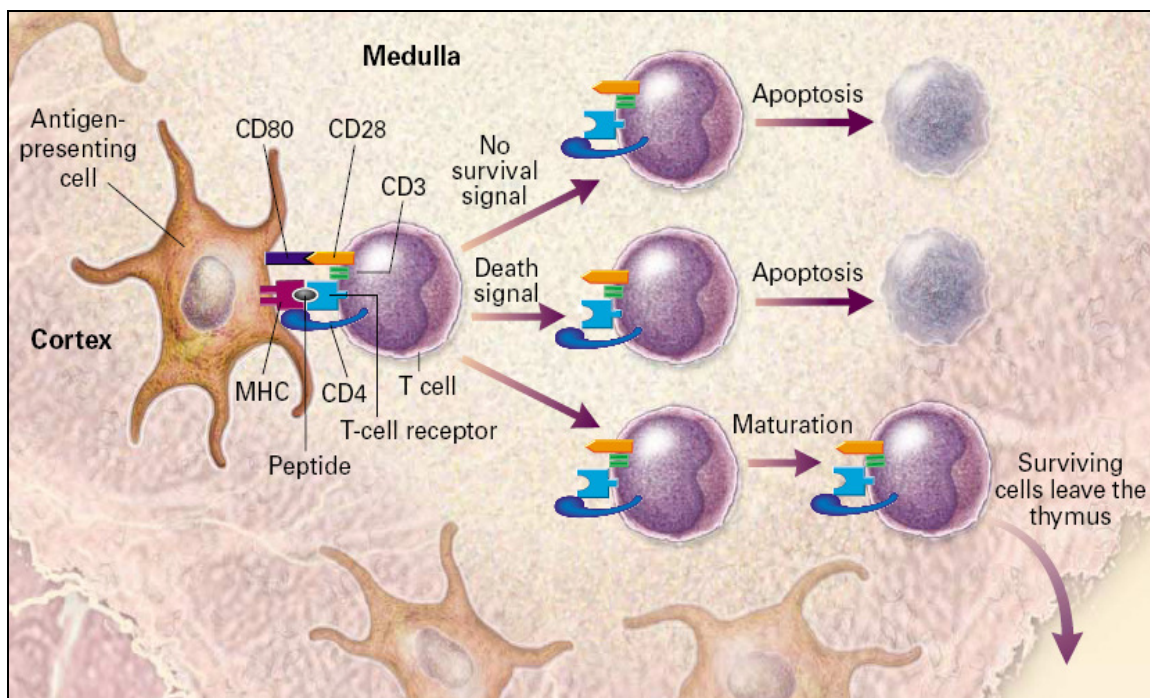


Figura 13. Mecanismo Central de Indução de Tolerância (adaptado de Kanradt, 2001)

Na região cortical do timo ocorre a interação dos MHC de células epiteliais com os TCR das células T. Desta interação resulta a restrição das células T ao MHC do próprio, o que significa que as células T só irão responder a Ags que lhe sejam apresentados por moléculas do

MHC. Esta interacção, para além disso, constitui simultaneamente um sinal de inibição da apoptose para a qual tendem as células T imaturas duplamente positivas. Assim, todos os timócitos que não interajam com o MHC das células do estroma irão sofrer apoptose. Este processo designa-se de selecção positiva. Apenas sobrevivem as células T que interagem com as células do estroma.

Após a selecção positiva, os linfócitos tornam-se singularmente positivos, isto é, deixam de expressar simultaneamente CD4 e CD8 e passam a expressar apenas uma destas moléculas. Ao mesmo tempo, estas células T deslocam-se para a medula tímica, onde serão então sujeitos a uma selecção negativa. Nesta, as células T CD4+ ou CD8+ que apresentam TCR com elevada afinidade irão interagir com o MHC de células dendríticas e de macrófagos, que lhes apresentam vários tipos de antigénios, nomeadamente auto-Ags, isto é, antigénios do próprio. As células T que interagirem com estas células apresentadoras de antigénio, ao reconhecerem o complexo MHC/Ag, entrarão em apoptose. Como grande parte dos antigénios apresentados no timo são auto-antigénios, as células T que os reconhecem acabam por ser deletadas, contribuindo este fenómeno para evitar fenómenos de autoimunidade.

A indução de alotolerância central requer a presença de aloantigénios na medula tímica, para que ocorra a deleção das células aloreactivas para determinados Ags.

Contudo, como nem todos os auto Ags são expressos no timo, processos de indução e manutenção de tolerância a autoantigénios terão de ocorrer também na periferia. Estes processos estão frequentemente envolvidos na tolerância a órgãos transplantados, embora, conceptualmente, também possa ocorrer a indução de tolerância central ao órgão transplantado, caso surjam Ags do dador no timo.

1.4.3. Tolerância periférica

Em termos globais, a tolerância periférica é mediada por vários processos que não se excluem mutuamente: depleção, anergia, ignorância e supressão. Os mecanismos de tolerância periférica podem afectar quer células T quer células B.

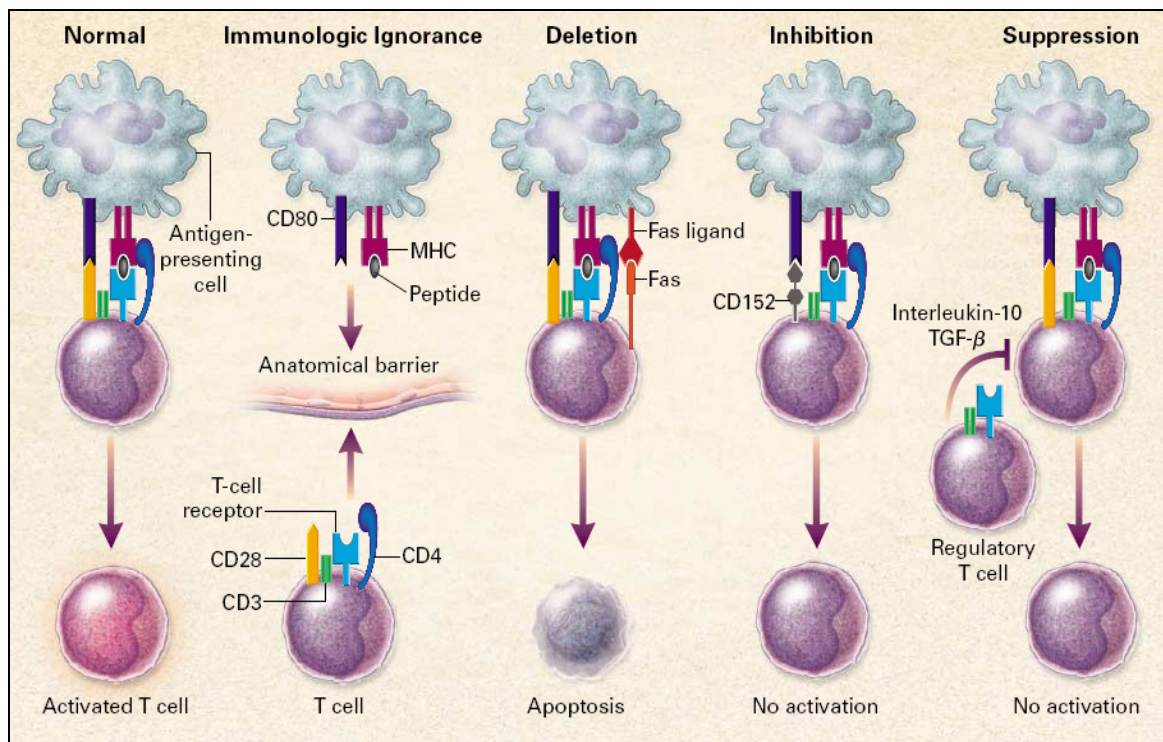


Figura 24. Mecanismos periféricos de indução de tolerância (adaptado de Kanradt, 2001)

Tolerância periférica em células T

Após a maturação no timo, as células T estão em situação para poderem ser activadas e diferenciar-se na periferia. A activação ocorre com a interacção entre o TCR nas células T e o

conjunto MHC/Ag em APCs. Se esta interacção for seguida de uma correcta interacção entre moléculas co-acessórias, a célula T fica activada e pode iniciar a produção de citocinas, bem como a proliferação e consequente diferenciação em vários tipos de células T efectoras e células T de memória.

Vários tipos de mecanismos periféricos podem controlar a activação de células T, conduzindo a situações de tolerância. Incluem-se nestes mecanismos a depleção periférica, a anergia, a ignorância e a supressão.

A *depleção periférica* consiste na remoção de células aloreactivas que pode ocorrer por vias activas ou passivas, sendo obtida através de diferentes mecanismos. O bloqueio de sinais co-estimulatórios/co-acessórios (como a interacção CD28/CD80-CD81) não só inibe a activação e proliferação de células T, como também promove a sua apoptose. A ausência de factores de crescimento e proliferação (como a IL-2) durante a activação é outro mecanismo de indução de apoptose em células T. A depleção também pode ocorrer por excesso de estimulação dos linfócitos, após uma grande quantidade de Ags do dador entrar no recipiente (com o transplante). A morte celular ocorre através da via apoptótica mediada pelo receptor Fas e o seu ligando (FasL). Assim, a apoptose em células T pode ocorrer de duas formas principais: a) por falta de mediadores cruciais para a célula T, como, por exemplo, a IL-2 (morte celular passiva); b) por activação excessiva da célula T (*activation induced cell death - AICD*) (Wood *et al*, 2001).

A *anergia* é um estado de ausência persistente de resposta de células T aos antigénios para os quais são específicos. Geralmente, as células T podem tornar-se anérgicas se, num primeiro contacto com uma APC, esta lhes apresentar o complexo MHC/Ag, mas não os sinais co-estimuladores. Uma vez iniciado o fenómeno de anergia, num segundo contacto com outra

APC que lhe apresente o mesmo MHC/Ag, bem como as moléculas co-acessórias, já não irá ocorrer produção de IL-2 por parte da célula T, o que impede a sua activação completa. As células T tornam-se, assim, refractárias a novas interacções com MHC/Ag em APC. Para esta ausência de resposta poderá também contribuir o facto de as células T anérgicas conseguirem produzir IL-10, que é uma citocina que tem a capacidade de suprimir a activação de células T.

A *ignorância imunológica* baseia-se nos casos em que apesar de existirem células T capazes de reagir contra determinados aloantígenos, tal não acontece, por impossibilidade de contacto adequado entre os linfócitos inactivados e os Ags nos órgãos linfóides. As células T não activadas geralmente só conseguem passar do sangue para órgãos linfóides e não para tecidos periféricos, não podendo, assim, causar lesão tecidual. Este mecanismo verifica-se em casos em que os hospedeiros não tinham órgãos linfóides secundários (Ashton Chess *et al*, 2006). Também está presente se o nível de Ags presentes nos órgãos linfóides for inferior ao nível mínimo necessário para a activação imunológica ou, numa perspectiva diferente do transplante, se ocorre uma separação física entre Ags e células T como a barreira hemato-encefálica. (Kanradt *et al*, 2001).

A *supressão* baseia-se na acção das células T com capacidade de inibirem outras células efectoras. Parte destas células T são denominadas células Treg, conseguindo estas, nomeadamente, efectuar a supressão de respostas aloimunes. Foi descrito que, na maior parte dos modelos experimentais de transplante as células T supressoras são células T CD4⁺ (Wood *et al*, 2001) embora células T CD8⁺ também participem na regulação do sistema imunitário. Não foram ainda identificados marcadores específicos destas células, embora uma expressão de intensidade elevada de CD25 e do factor de transcrição FOXP3 pareça estar associada a uma

maior função “reguladora”. Vários modelos experimentais demonstraram um papel nesta supressão/regulação para as citocinas TGF- β e IL-10, juntamente com o marcador molecular CD152 (proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico – CTL4). Resultados de vários estudos demonstram ainda que as células Treg reconhecem aloantígenos expressos pelo MHC de APCs. Após este reconhecimento, alguns estudos defendem que as células sensibilizadas sofrerão lise por outras células T, enquanto que outros defendem que irão promover a lise celular das restantes células T (Wood *et al*, 2001).

O conhecimento sobre células Treg levou ao desenvolvimento de um novo conceito: a tolerância infecciosa (*infectious tolerance*). Baseia-se no facto de a transfusão de células Treg para um hospedeiro conferir a este tolerância relativamente ao aloantígeno em causa.

Tolerância periférica em células B

Os linfócitos B também sofrem processos de controlo da sua activação, que se incluem em mecanismos de indução e manutenção de tolerância periférica. De facto, não nos devemos esquecer que a acção dos linfócitos B depende da presença ou ausência de células T. Se não ocorrer a expansão clonal e activação de células T, as células B não irão ser activadas. Por outro lado, o contacto entre uma célula B e um linfócito T “anérgico”, induz também anergia na célula B.

1.4.4. Estratégias para indução de tolerância

As diferentes estratégias indutoras de tolerância para órgãos transplantados baseiam-se nos processos supracitados e classificam-se em estratégias baseadas no transplante prévio de

medula óssea (*previous bone marrow transplantation – BMT*) ou não baseadas neste processo (*Non-BMT*).

Entre as estratégias *non-BMT* distinguem-se a depleção linfocitária, o bloqueio dos sinais co-estimulatórios e a infusão de Ags do dador.

A *depleção linfocitária* pode ocorrer por irradiação linfóide total ou através do uso de Acs mono ou policlonais. A primeira está associada a alguns riscos e a uma baixa taxa de sucesso em humanos, não se adequando ao uso clínico (Ashton-Chess *et al*, 2006). Experiências com Acs tornaram-se, assim, mais comuns.

O Ac monoclonal Campath-1H, específico para células que expressam o marcador de superfície CD52 provoca uma depleção destas, incluindo células B, monócitos, células NK e aproximadamente 99% das células T (Ashton-Chess *et al*, 2006). Através da utilização deste anticorpo monoclonal, foi possível obter um transplante funcionante, que só precisou de imunossupressão mínima. Constitui assim uma estratégia de indução de quase tolerância.

Por outro lado, e apesar de bons resultados em ratinhos, o *bloqueio de sinais co-estimulatórios* não obteve bons resultados nos estudos realizados na clínica (Ashton-Chess *et al*, 2006).

Finalmente, a *infusão de Ags do dador* é conseguida por transfusão sanguínea específica do dador, consistindo numa espécie de vacinação. Contudo, estudos em ratinhos demonstraram que, apesar da indução de tolerância operacional, os transplantes desenvolveram, a longo prazo, sinais de rejeição crónica (Ashton-Chess *et al*, 2006).

As estratégias indutoras de tolerância baseadas no transplante prévio de medula óssea (*BMT*) envolvem, como o próprio nome indica, a administração consecutiva ou simultânea com o

transplante de células hematopoiéticas do dador. Como as restantes células T imaturas provenientes da medula óssea, também as células T, macrófagos, células dendríticas administradas se encaminharão para o timo do recipiente, integrando o estroma tímico. Aí, irão mediar a selecção negativa da nova geração de células T reactivas contra o dador, num processo de tolerância central.

Os resultados das várias experiências clínicas levadas a cabo baseadas nesta estratégia têm sido encorajadores (Ashton-Chess *et al*, 2006). No entanto, não está isenta de riscos. A administração consecutiva ou simultânea de células hematopoiéticas do dador pode despoletar a doença do transplante contra o hospedeiro.

Tabela 1. Estratégias de indução de tolerância testadas na clínica (adaptado de Ashton-Chess et al, 2006).

Tolerance-inducing strategies	Preclinical experience	Clinical experience	Future directions
1. Non-bone marrow transplantation (BMT) based			
A. Lymphocyte depletion			
(i) Total lymphoid irradiation	Some success in dogs when used in combination with antithymocyte globulin [23].	Some success but in a small proportion of patients [24].	Not suitable for routine use
(ii) Antibodies	Anti-CD3-immunotoxin very successful in primates when combined with deoxyspergualin [28] but no human equivalent as yet.	Monoclonal anti-CD52 Ab CAMPATH-1H has shown potential in inducing tolerance [11], but true tolerance elusive [31,32].	
B. Costimulation blockade	Tolerance-inducing in rodents but immunosuppressive only in nonhuman primates (NHP) [35,37,42].	Evidence to suggest that CTLA4-Ig can obviate the need for calcineurin inhibitor [38]. No tolerance-inducing study as yet.	Possible need for simultaneous blockade of multiple costimulation pathways. Specific antagonism of CD28 [39] may be beneficial, but remains to be tested clinically.
C. Donor antigen infusion	Much experience with donor-specific blood transfusion in rodents but, at least in certain models, the indefinite survival previously thought to be the result of tolerance is now known to be associated with chronic rejection [19].	Not tolerance-inducing and beneficial effects unclear [45,46].	Sensitization fears and agency recommendations make this approach less popular.
2. BMT based			
Consecutive bone marrow (BM) and organ transplantation		Performed as a consequence of patient disease. Successful in a handful of isolated cases [21, 53-55].	Not applicable on a wide scale because of risks of GVHD.
Simultaneous BM and organ transplantation	Successful in NHP depending on the type of organ transplant [50-52].	Deliberately performed and successful in several cases [58,59].	Again not applicable on a wide scale but promising in that this is the first time tolerance has been deliberately and successfully achieved in humans.

As últimas estratégias baseiam-se no *quimerismo*. Este define-se como a presença persistente no hospedeiro de um grande número de células do dador, ou seja de células que expressam Ags “*non-self*”, que também estão presentes no órgão transplantado. O quimerismo geralmente refere-se a células hematopoiéticas, presente na última técnica descrita.

O quimerismo diz-se total quando se procede à ablação total do sistema imunitário pré-existente. O objectivo é substituí-lo por um novo sistema imunitário tolerante relativamente aos Ags do transplante. Procede-se à imuno e mieloablação através da irradiação corporal total. Os linfócitos e restantes células imunes serão restituídos a partir das células hematopoiéticas do dador entretanto transferidas.

Os linfócitos imaturos, provenientes das células hematopoiéticas transferidas, irão encaminhar-se para o timo, onde serão sujeitos a selecção negativa baseada em Auto Ags e aloantígenos (antígenos do dador que também migraram para o timo) das células do estroma. Como se encontra supracitado, estas irão integrar células do dador (principalmente células dendríticas).

No *quimerismo misto*, há uma reconstituição apenas parcial do sistema imunitário. Células hematopoiéticas transferidas do dador co-existem com as do recipiente. No timo, existem linfócitos do dador e do recipiente, sendo eliminados os timócitos auto-reactivos e aloreactivos relativamente aos Ags do dador. Estes estão presentes no timo participando na selecção negativa através de células hematopoiéticas, especialmente as células dendríticas. Deste modo, os linfócitos existentes na periferia são tolerantes relativamente ao dador e ao recipiente.

O quimerismo parcial apresenta algumas vantagens relativamente ao total. Pode ser atingido sem o recurso a métodos mieloablativos, como a irradiação corporal total, que apresenta um risco excessivo de toxicidade. Quando comparados, o método misto revela uma

imunocompetência superior, presente no casos de incompatibilidade completa do MHC. Este facto constitui uma vantagem no caso de dadores cadáveres, em que é necessário ter em conta a possibilidade de incompatibilidades MHC. Estas podem provocar no quimerismo total imunoincompetência. Resulta isto do facto da selecção positiva que ocorre no timo ser em relação a MHCs do hospedeiro por oposição às APCs existentes na periferia que são na sua totalidade resultantes dos elementos hematopoiéticos transferidos do dador. Assim não existirá interacção entre os linfócitos (TCR) e as APCs (MHCII), tornando-se estas imunoincompetentes. Por oposição, no quimerismo misto continuam a existir APCs do dador, permitindo respostas efectivas por parte das células T.

Para que a tolerância atingida com o método misto seja persistente, é necessário manter o quimerismo no timo e não na periferia (Sykes, 2001). Como as APCs do timo estão em constante *turnover* celular, é necessário manter um aporte de APCs do dador ao timo do hospedeiro para o resto da vida do transplante. Deste modo é necessário o transplante de células estaminais hematopoiéticas em quantidades suficientes.

A toxicidade causada e a doença do transplante contra o hospedeiro, presente mesmo quando existem incompatibilidades parciais de MHC, impedem o uso rotineiro do quimerismo misto em humanos. No entanto, foram desenvolvidos vários protocolos de indução de quimerismo em animais. A sua aplicação permitiu o seu desenvolvimento e aperfeiçoamento.

Inicialmente é necessário proceder ao bloqueio da aloreactividade periférica. A depleção linfocitária pode ser atingida através do uso de Acs anti-CD4 e anti-CD8.

Depois é necessário criar “espaço” na medula óssea para que ocorra a fixação de células hematopoiéticas transferidas. Pode proceder-se à irradiação corporal total. Esta pode ser subletal (associada a elevada toxicidade) ou mínima. Se for mínima é necessário proceder à irradiação do timo. Tem como objectivo eliminar a aloreactividade aí residual e criar um “espaço”

hematopoiético para a fixação de células estaminais hematopoiéticas pluripotentes transferidas. A fixação no timo é um processo independente da fixação na medula óssea.

Em alguns protocolos, a irradiação do timo foi substituída pela administração de Acs anti células T ou bloqueio de sinais co-estimulatórios com administração de ciclosporina no período que antecede o transplante.

Outra técnica também testada baseia-se na administração de elevadas doses de células estaminais do dador. Algumas delas irão fixar-se na medula óssea do hospedeiro sem outras manobras de criação de “espaço”.

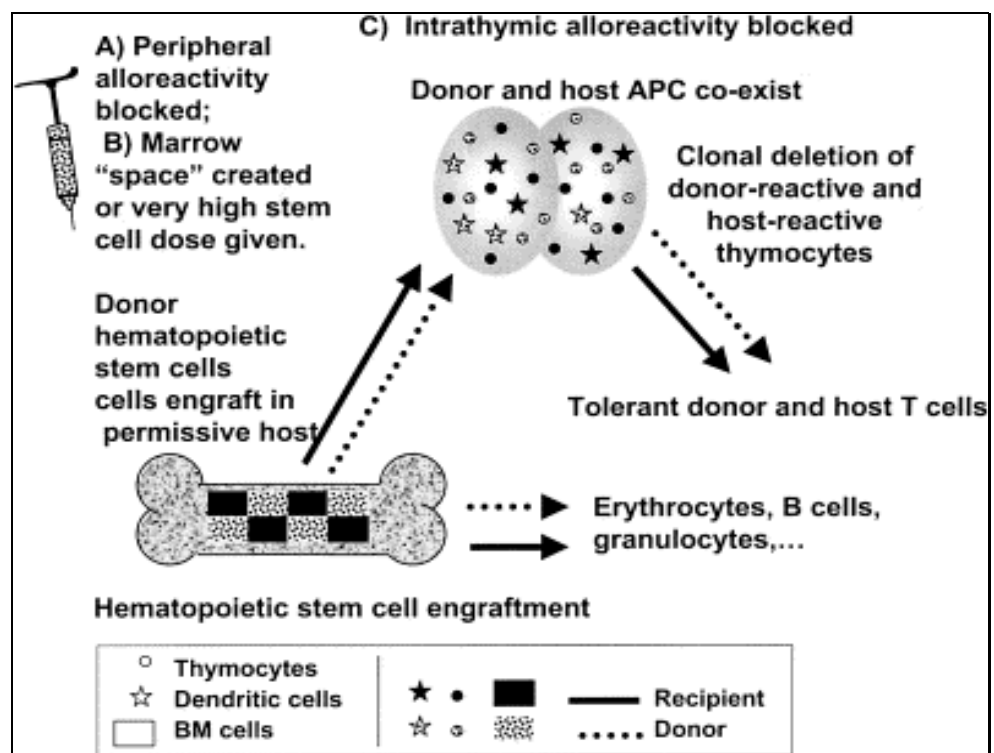


Figura 15. Representação esquemática de técnica de indução de quimerismo misto persistente (adaptado de Sykes, 2001).

Quanto às células NK, pensava-se que nos casos de incompatibilidade de MHC, cada célula teria que expressar na sua membrana receptores inibidores da sua acção para dois grupos diferentes de células com MHC, do dador e do hospedeiro. No entanto os estudos realizados não confirmam esta premissa. De facto, embora as experiências realizadas *in vitro* tenham mostrado uma ausência de tolerância das células NK do dador e do hospedeiro quanto ao hospedeiro e dador, respectivamente, os estudos *in vivo* demonstraram a existência de tolerância (Zhao *et al*, dados não publicados; citado em Sykes, 2001). Assim, o mecanismo de tolerância das células NK nos casos de quimerismo misto é diferente do dos restantes mecanismos de tolerância.

Apesar do quimerismo como técnica indutora de tolerância ser essencialmente objecto de investigação em animais, existem vários casos descritos em humanos (Scandling *et al*, 2008 e Kaway *et al*, 2008 são os mais recentes).

Em 1992, foram estudados 30 recipientes com transplantes renais e hepáticos com longa sobrevivência (alguns com mais de 30 anos). Foram identificados em todos a presença de microquimerismo leucocitário (presença de pequenas quantidades de leucócitos) de várias linhagens (Starzl, 2008). Postulou-se então que o microquimerismo seria um pré-requisito para a manutenção de um estado de depleção-exaustão clonal atingido no momento do transplante (Starzl, 2008).

O microquimerismo, ao contrário do quimerismo, pode ser atingido após o transplante através de células presentes no órgão transplantado (geralmente leucócitos) que migram para o recipiente (geralmente para órgãos linfóides secundários). Estes leucócitos são designados por “*passenger leucocytes*” (leucócitos passageiros).

Zinkernagel e Starzl propuseram que a possibilidade de surgir ou não tolerância a um transplante (órgão ou medula óssea) é determinada pelo equilíbrio entre o número de linfócitos do dador que migram para os órgãos linfóides secundários e o número de células T aloreactivas aí

produzidas (Starzl, 2008). Inicialmente, ocorre uma expansão clonal recíproca (isto é, dos linfócitos do dador e do receptor), à qual se segue uma deleção clonal também recíproca. Ou seja as respostas linfocitárias anulam-se mutuamente.

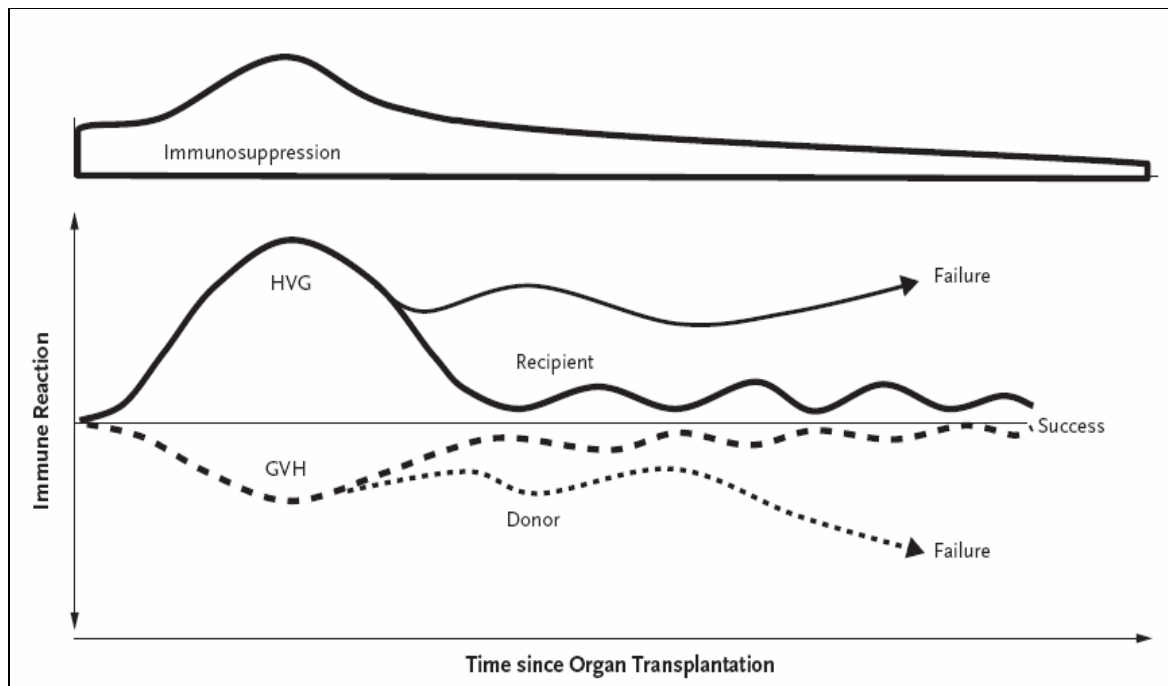


Figura 16. Cinética do desenvolvimento de respostas imunitárias (adaptado de Strazl, 2008). O gráfico mostra que as duas respostas imunes após o transplante, do recipiente em relação ao órgão transplantado (HVG – *Host Versus Graft*) e a resposta imune do órgão sobre o hospedeiro através do quimerismo, ocorrem simultaneamente, anulando-se entre si através de uma deleção clonal recíproca.

Os protocolos imunossupressores (com elevadas doses), a que os doentes transplantados são sujeitos, no período logo após o transplante, em que ocorre a migração máxima de leucócitos pode impedir o desenvolvimento do mecanismo tolerogénico de deleção – exaustão clonal. Foram então estabelecidos dois princípios com o fim de evitar esta situação: pré-tratamento do recipiente e redução ao máximo da imunossupressão após o transplante.

O conhecimento dos mecanismos de tolerância permitiu também o desenvolvimento de substâncias capazes de os induzir e assim promover um estado de tolerância. Estas substâncias consistem nos imunossuppressores usados na prática clínica diária, e serão abordados nos capítulos seguintes.

1.5. Terapêutica imunomoduladora

1.5.1. Conceitos gerais

O alvo principal dos fármacos imunossuppressores (I.S.) é o linfócito T CD4+.

A resposta celular do linfócito à activação aloimune foi dividida em três sinais, essenciais à estimulação da proliferação celular. Esta divisão pretende facilitar a compreensão da acção dos fármacos I.S..

Assim, a interacção entre o complexo MHC-peptido antigénico da célula dendrítica com o marcador CD3 do linfócito constitui o sinal 1.

Através da co-estimulação, com a ligação entre CD 80 ou CD86 da célula dendrítica com CD 28 do linfócito, ocorre o sinal 2.

A transdução dos sinais 1 e 2 processa-se através de 3 vias celulares: a via do cálcio-calcineurina, a via de proteína activada pelo mitogéneo-RAS (*RAS-mitogen activated protein – MAP Kinase pathway*) e a via do factor nuclear κ B (NF- κ B). Estas vias activam vários factores de transcrição que activam a expressão genética de algumas moléculas (IL-2, CD-154, CD-25).

A IL-2, juntamente com outras citocinas, estimula o “alvo da rapamicina” (*rapamicin target*), originando o Sinal 3.

Com a adaptação hospedeiro-transplante, meses depois do transplante, verifica-se que a anergia parcial das células T, designada por tolerância adaptativa, é caracterizada por uma diminuição da activação da tirosina-quinase e mobilização do cálcio (sinal 1) e diminuição da resposta à IL-2 (sinal 3).

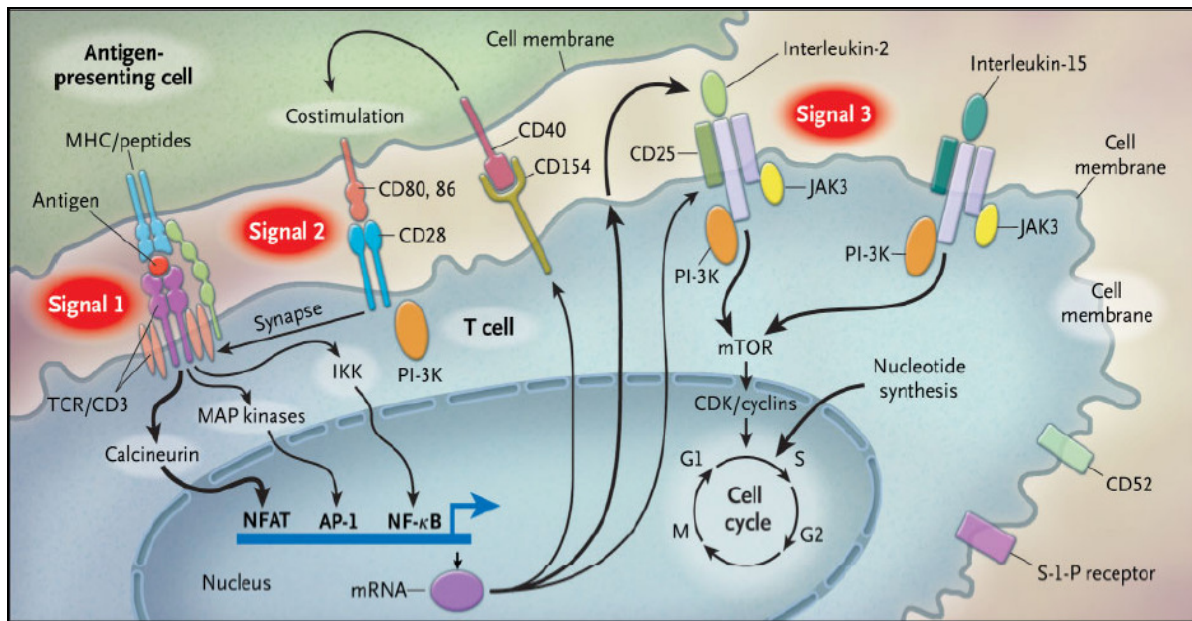


Figura 17. Sinais de activação linfocitária (adaptado de Halloran, 2004).

Para além da imunossupressão, os fármacos IS têm outros efeitos: a imunodeficiência (potencia infecções e cancro) e a toxicidade não imune (intrínseca a cada fármaco). Ambos são classificados como efeitos secundários não desejados. Constituem limitações à aplicação desta terapêutica.

1.5.1.1. Corticoterapia

Os fármacos corticoesteróides permanecem um dos principais grupos de fármacos usados na imunossupressão (Magee *et al*, 2004).

Actuam como agonistas de receptores intracelulares, que controlam a expressão genética. Através desta interacção influenciam os factores de transcrição, tais como a proteína activadora 1 NF-kB. Actuam a diversos níveis, nomeadamente a nível transcriptional, bloqueando a transcrição de citocinas tais como a IL-2, ou o IFN- γ .

Em elevadas doses têm efeitos independentes destes receptores.

A dose em que são administrados é progressivamente diminuída nos primeiros 3 a 6 meses (por exemplo até 5 a 10 mg de Prednisona) (Magee *et al*, 2004).

Têm como principais efeitos secundários a dislipidémia, a hipertensão arterial, a diminuição de tolerância à glicose e a osteoporose.

A sua suspensão completa está associada a um aumento da rejeição e a disfunção renal a curto e a longo prazo (Magee *et al*, 2004). No entanto, com o desenvolvimento de novos fármacos imunossupressores, a sua suspensão deve ser ponderada em doentes que desenvolveram toxicidade pós-transplante significativa (por exemplo. aparecimento de diabetes mellitus).

Os doentes que apresentam elevado risco de desenvolverem os efeitos secundários destes fármacos (p.e. osteoporose de início prévio ao transplante) devem também ser objecto de protocolos imunossupressores não esteróides ou com baixas doses de corticóides.

1.5.1.2. Outras terapêuticas imunomoduladoras

Halloran (2004) classifica os fármacos IS.. não esteróides em: pequenas moléculas, proteínas depletoras e proteínas não depletoras (Acs monoclonais e policlonais), proteínas de fusão e imunoglobulinas intravenosas (IgIV).

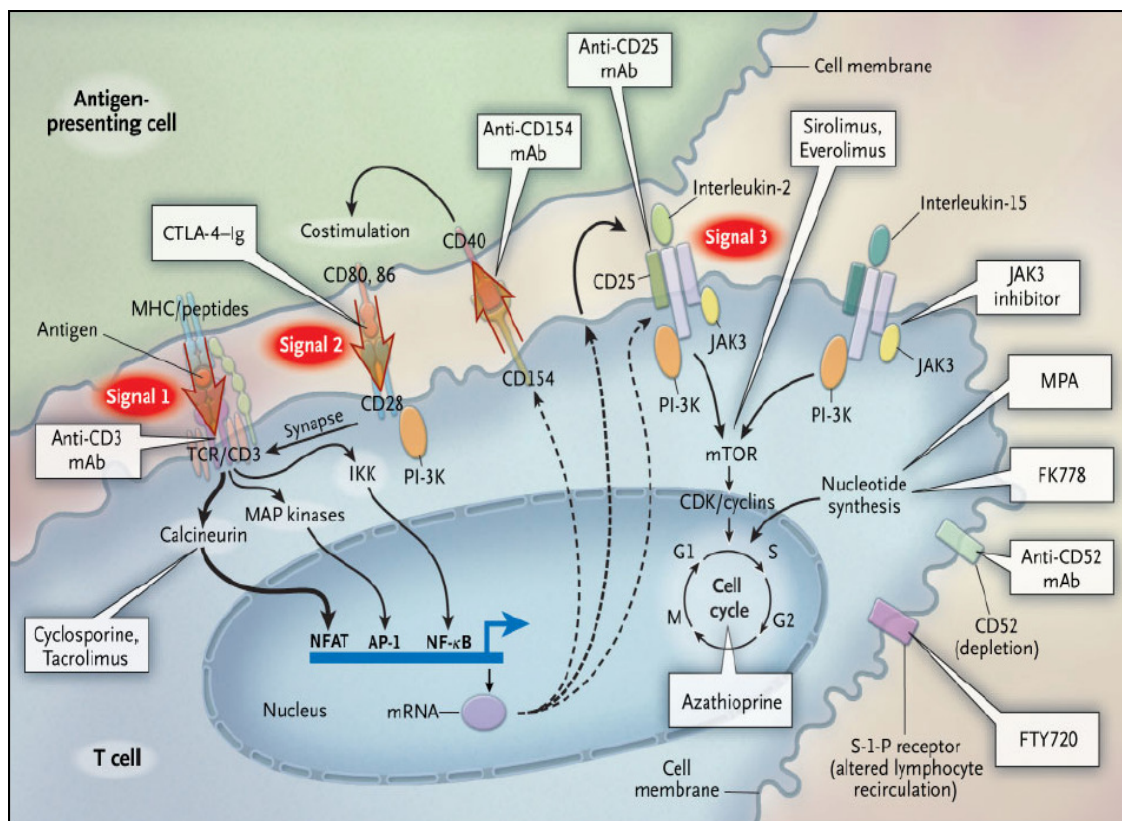


Figura 18. Locais de ação dos diferentes I.S. (adaptado de Halloran, 2004).

Pequenas Moléculas

A maioria das pequenas moléculas deriva de produtos microbianos e proteínas alvo que se têm mantido muito estáveis ao longo da evolução.

Usadas em concentrações terapêuticas, provavelmente não provocam saturação dos seus receptores, o que faz com que a sua acção seja dose-dependente, proporcional à sua concentração.

Neste grupo, assumem especial relevância os inibidores da calcineurina (ciclosporina e tacrolimus) e os inibidores da proliferação celular (sirolimus, micofenolato mofetil – MMF, azatioprina) (Magee *et al*, 2004).

A inibição da calcineurina vai bloquear o sinal 3 de activação celular.

A **ciclosporina** é um pró-fármaco que actua a nível intracelular através da união com a uma proteína da família da imunofilina, a ciclofilina. Este complexo irá ligar-se à calcineurina, bloqueando-a, o que leva à diminuição da transcrição de diversos genes pró-inflamatórios. Os seus efeitos secundários são dependentes da dose e incluem: nefrotoxicidade, hipertensão arterial, dislipidémia, hiperplasia gengival, hirsutismo, tremor, diabetes mellitus e síndrome hemolítico-urémico. A medição da sua concentração no sangue é usada para ajustar a dosagem. Baixas concentrações 2 horas após a administração (o critério geralmente usado, C2) estão associadas a rejeição aguda (Halloran, 2004). É necessário aumentar a dose administrada. O risco de nefrotoxicidade constitui mais um factor para monitorizar a creatininémia.

O **tacrolimus** (FK506) é um macrólido I.S. que tem um mecanismo de acção semelhante à ciclosporina. Também se liga a uma imunofilina, a proteína de ligação 12 - FK506 (FKBP12). Este complexo inibidor da calcineurina tem maior potência molar que o da ciclosporina. Quando comparado com a ciclosporina, Halloran (2004) refere que apesar de estudos iniciais indicarem estar associado a uma taxa de rejeição menor que a ciclosporina, estudos mais recentes sugerem

que com as doses actualmente usadas estão ambos associados a taxas de rejeição semelhantes. Outros estudos sugerem estar associado a maior incidência de nefropatias por poliomavirus BK, mas a uma melhor função renal. Apesar disso, tal como a ciclosporina também pode ser nefrotóxico e causar síndrome hemolítico urémico. Não partilha com tanta probabilidade os restantes efeitos secundários. Está, no entanto, associado a um maior poder diabetogénico.

Existem novas preparações de libertação lenta, o que permite uma única administração diária. É mais hidrossolúvel que a ciclosporina, facilitando a sua absorção (não depende de sais biliares, quando administrado oralmente). Por outro lado, a comida diminui a sua absorção, pelo que a administração é aconselhada fora das refeições.

Actualmente, segundo o mesmo autor, o tacrolimus é o principal inibidor da calcineurina. No entanto a opção depende de cada doente e da clínica existente prévia ao transplante. Em doentes com maior risco de desenvolver diabetes (idosos e obesos) a opção deve recair sobre a ciclosporina. Se existe história ou risco de hipertensão arterial, dislipidémia ou rejeição então o tacrolimus deve ser a opção escolhida.

Miller et al (“Maintenance immunosuppressive drugs in renal transplantation in adults”, 2008) refere que um dos dois inibidores de calcineurina é usado em cerca de 90% dos recipientes de transplante renal nos E.U.A. Tal como Halloran, também refere que o tacrolimus é mais popular que a ciclosporina.

O **sirulimus** e o **everolimus** também se ligam ao FKBP12, mas não interferem com a calcineurina, não fazendo parte do grupo de inibidores da calcineurina. Inibem o alvo da rapamicina. Também impedem que ocorra o sinal 3. Têm vários efeitos secundários: dislipidémia, trombocitopénia e atraso na cicatrização de feridas. Os doentes submetidos a estes fármacos apresentam ainda atraso na recuperação de necrose tubular aguda, diminuição da

concentração da testosterona, agravamento de proteinúria, úlceras orais, lesões na pele e pneumonite. No entanto, apresentam baixas taxas de infecção por CMV.

Apesar de ter sido desenvolvido com a intenção de ser usado com a ciclosporina, esta associação não acontece na medida em que está associada a maior nefrotoxicidade, síndrome hemolítico urémico e hipertensão. Assim foi associado com o tacrolimus. No entanto, outros estudos demonstraram que também está associado a maior nefrotoxicidade que a associação tacrolimus-MMF. Apesar disso estes fármacos demonstraram ter um efeito protector sobre as artérias e um efeito antineoplásico. Têm potenciais efeitos na oncologia (Miller et al, 2008, [2]).

O **MMF** pertence ao grupo de inibidores da síntese de nucleótidos, nomeadamente as purinas. Trata-se de um pró-fármaco, que liberta o ácido micofenólico. Este inibe a desidrogenase monofosfato iosina, enzima essencial à síntese das purinas. Vários estudos demonstraram ser mais eficaz na prevenção de rejeição que a azatioprina e que os protocolos em que se associa com um inibidor da calcineurina produzem maior sobrevivência do doente e do transplante (Halloran, 2004). O seu uso não necessita de monitorização. Nos seus efeitos secundários não se inclui risco cardiovascular ou toxicidade associada a outros órgãos. Os seus efeitos secundários são essencialmente gastrointestinais (diarreia) e hematológicos (anemia e leucopenia). Por todos estes factores, o seu uso tornou-se bastante comum. É no entanto um fármaco teratogénico. Mulheres em idade de engravidar e homens que planeiam ser pais não deverão usar o MMF (a azatioprina está indicada nestes casos) (Miller et al, 2008, [2]).

A **leflunomida** inibe a síntese de pirimidinas.

A **azatioprina**, o primeiro I.S. a ser criado, deriva da 6-mercaptopurina. Interfere com a síntese de ADN. Também foi ponderado a sua influência sobre a co-estimulação, transformando-a num sinal apoptótico. Após a introdução da ciclosporina, tornou-se um I.S. de segunda linha.

Magee *et al* (2004) classifica o MMF, a azatioprina e o sirolimus como fármacos antiproliferativos.

Proteínas Depletoras

Os **Acs policlonais anti timócitos (timoglobulinas)** podem ser produzidos em cavalos ou coelhos, previamente imunizados contra células linfóides humanas (por injeção destas células naqueles organismos). Obtêm-se após a remoção dos Acs tóxicos também produzidos (anti-plaquetas, anti-eritrócitos). É geralmente um dos fármacos usados na fase de indução da imunossupressão, durante 3 a 10 dias. Produz intensa linfopenia que persiste por mais de 1 ano. As Igs produzidas em coelhos têm apresentado maior potência (Halloran, 2004). Apresentam como principais efeitos secundários trombocitopenia, síndrome de libertação de citocinas, e ocasionalmente doença do soro.

O **muromonab-CD3 (OKT3)** é um Ac monoclonal antiCD3, produzido em ratinhos. É usado na fase de indução, além de fazer parte da terapêutica usada no tratamento da rejeição. Liga-se ao TCR e produz uma libertação em massa de citocinas. Tem também função depletora junto das células T. O seu uso tem vindo a declinar pelo facto do organismo humano ser capaz de produzir Acs anti muromonab e pelo facto do seu uso continuado aumentar o risco de doenças linfoproliferativas (Halloran, 2004).

O **alentuzumab** trata-se de um Ac monoclonal anti-CD52. Por produzir uma depleção intensa da população linfocitária não é usado na imunossupressão após o transplante. Aplica-se nos casos de leucemia linfocítica crónica de células B. É objecto de vários estudos em que é associado a outros I.S., com alguns resultados contraditórios (Halloran, 2004).

O **rituximab** (Ac monoclonal anti CD-20) reage contra precursores de células B (estas não expressam CD20), produzindo uma depleção profunda. É usado em doenças linfoproliferativas pós – transplantação e na supressão de respostas nocivas mediadas por aloanticorpos no hospedeiro, durante a fase de manutenção, juntamente com a plasmaferese e Ig I.V.

Proteínas Não Depletoras

O **daclizumab** e o **basiliximab** são Acs anti CD25, que é a cadeia α do receptor para a IL-2. Estes anticorpos interferem assim com a acção activadora e indutora de proliferação em linfócitos T. São usados na indução de imunossupressão em doentes com baixo a médio risco de rejeição. Revelam-se moderadamente eficazes, reduzindo em 1/3 a rejeição quando usados em associação com inibidores da calcineurina, para além de terem poucos efeitos tóxicos. (Halloran, 2004).

Proteínas de Fusão

A **LEA29Y** é uma proteína imunossupressora que resulta da fusão entre a molécula CTLA-4 (molécula inibitória da activação linfocitária e que interage com as moléculas acessórias em APCs (CD80 e CD86) e a porção Fc de IgG. Em alguns estudos demonstrou um efeito semelhante ao da ciclosporina na prevenção da rejeição, embora ainda seja objecto de estudo.

Imunoglobulinas intravenosas

As Igs IV são usadas nos casos de rejeição mediada por Acs. O seu mecanismo de acção não está, segundo Koch (2008, [2]) claramente definido. Sabe-se que os seus efeitos incluem a supressão da síntese de Igs, alteração de propriedade de fixação do complemento e inibição da sua activação. Incluem ainda Igs com propriedades de Acs anti-idiotípicos, que permitem neutralizar a ligação de Igs lesivas (como, por exemplo, as que reconhecem aloantígenios do dador) ao ligarem-se aos idiotopos destes anticorpos.

Em cada um dos grupos existem muitos outros fármacos que por limitações que dizem respeito ao tema e ao espaço não serão abordados neste texto.

Tabela 2. Fármacos I.S. usados na fase de manutenção da imunossupressão (adaptado de Magee *et al*, 2004)

Drug	Mechanisms of Action	Adverse Effects	Common Signs of Acute Toxicity	How Drug Dose is Monitored/Adjusted	Important Drug Interactions
Glucocorticoids	Blockade of cytokine gene transcription in lymphocytes, antigen-presenting cells, and other immune cells	Glucose intolerance, hypertension, hyperlipidemia, osteoporosis, osteonecrosis, myopathy, cosmetic defects, growth suppression in children	Multiple	Standard center protocol	Cyclosporine and tacrolimus potentiate diabetogenic effects
Cyclosporine	Inhibits calcineurin and ultimately lymphocyte synthesis of IL-2	Nephrotoxicity (acute and chronic), hyperlipidemia, hypertension, glucose intolerance, hirsutism, gum enlargement	Rising plasma creatinine, tremor	Trough blood concentrations or 2 hours after dosing	Inducers and inhibitors of cytochrome P450 decrease and increase blood concentrations, respectively
Tacrolimus	Inhibits calcineurin and ultimately lymphocyte synthesis of IL-2	Broadly similar to those of cyclosporine; diabetes mellitus more common; hypertension, hyperlipidemia and cosmetic defects less common	Rising plasma creatinine, tremor, GI upset	Trough blood concentrations	Same as for cyclosporine
Azathioprine	Inhibits leukocyte proliferation	Bone marrow suppression; rarely, hepatitis and/or pancreatitis	Marrow suppression	Initially, 1-2 mg/kg per day; dose reduced in case of marrow suppression	Allopurinol inhibits metabolism of drug, thereby greatly increasing toxicity
Mycophenolate mofetil	Inhibits leukocyte proliferation; relatively more selective for lymphocytes than azathioprine	Bone marrow suppression, nausea, abdominal pain, diarrhea; invasive CMV disease more common than with azathioprine	Marrow suppression, diarrhea	Initially 500-1000 mg bid; dose reduced in case of marrow suppression or GI adverse effects	GI symptoms exacerbated by tacrolimus
Sirolimus	Inhibits leukocyte proliferation	Bone marrow suppression, hyperlipidemia, diarrhea, interstitial pneumonitis (rare)	Marrow suppression, diarrhea	Trough blood concentrations	Inducers and inhibitors of cytochrome P450 decrease and increase blood concentrations, respectively; sirolimus enhances nephrotoxicity of cyclosporine and tacrolimus

Abbreviations: bid, twice daily; CMV, cytomegalovirus; DM, diabetes mellitus; GI, gastrointestinal; IL-2, interleukin 2; IMPDH, inosine monophosphate dehydrogenase.

1.5.1.3. Protocolos de indução e manutenção de imunossupressão

Os fármacos I.S. são usados em associações, com o intuito de diminuir a toxicidade associada a cada um deles, maximizando a sua eficácia global.

Existem assim inúmeros protocolos de imunossupressão, com diferentes combinações de fármacos, diferentes doses usados em diferentes fases.

Em comum têm a característica de produzirem uma imunossupressão mais profunda no período imediato pós-transplante, diminuindo progressivamente de intensidade nos meses seguintes (Magee *et al*, 2004). Deve-se ao facto do maior risco de rejeição aguda ocorrer nos 3 primeiros meses após o transplante (Miller *et al*, 2008, [1]).

Ao longo do tempo os protocolos de imunossupressão mantiveram-se fiéis às mesmas opções de combinações. A indução era estimulada com proteínas imunossupressoras. A pré-adaptação à fase de manutenção ocorria através da combinação de um inibidor de calcineurina, um I.S. de segunda linha (azatioprina ou MMF) e corticóides. Na fase de manutenção (pós-adaptação) mantinham-se os mesmos fármacos, mas em doses menores (Halloran, 2004). No entanto, actualmente existem muitas novas combinações, muitas ainda objecto de estudo.

Tabela 3. Possíveis combinações de fármacos com protocolos imunossupressores (adaptado de Halloran *et al*, 2004)

Protocol	Protocol Elements			Comments
	Protein Induction	Preadaptation Maintenance	Postadaptation Maintenance*	
Conventional treatment	Anti-CD25 antibody, polyclonal antithymocyte globulin, or none	Calcineurin inhibitor, mycophenolate mofetil, and prednisone	Calcineurin inhibitor and mycophenolate mofetil; prednisone tapered	Possibly excessive immunosuppression during postadaptation
Conventional treatment with no steroids ⁹⁵	Anti-CD25 antibody	Calcineurin inhibitor and mycophenolate mofetil; prednisone only if needed	Calcineurin inhibitor and mycophenolate mofetil; prednisone only if needed	Possible increase in rejection
Conventional treatment with depleting antibodies	Polyclonal antithymocyte globulin	Calcineurin inhibitor, mycophenolate mofetil, and prednisone	Calcineurin inhibitor and mycophenolate mofetil; prednisone tapered	Effects of depletion (e.g., increased incidence of post-transplantation lymphoproliferative disorder), possible late rejection
Sirolimus with cyclosporine withdrawal	Anti-CD25 antibody, polyclonal antithymocyte globulin, or none	Cyclosporine, sirolimus, and prednisone	Sirolimus; prednisone tapered	Early toxicity of cyclosporine-sirolimus combination
Calcineurin-inhibitor avoidance with maintenance sirolimus and mycophenolate mofetil ^{96,97}	Anti-CD25 antibody, polyclonal antithymocyte globulin, or none	Sirolimus, mycophenolate mofetil, and prednisone	Sirolimus and mycophenolate mofetil; prednisone tapered	Possibly excessive early rejection; no phase 3 trials; possible increase in late rejection
Calcineurin-inhibitor withdrawal with mycophenolate mofetil maintenance ⁹⁸	Anti-CD25 antibody, polyclonal antithymocyte globulin, or none	Calcineurin inhibitor, mycophenolate mofetil, and prednisone	Mycophenolate mofetil; prednisone tapered	No phase 3 trials
Alemtuzumab induction ⁸⁴⁻⁸⁶	Alemtuzumab	Sirolimus, prednisone	Sirolimus; prednisone tapered	Long-term consequences of severe depletion unknown; no controlled trials; possible increase in antibody-mediated rejection
Depletion with minimization of immunosuppressive drugs ⁹⁹	Polyclonal antithymocyte globulin	Tacrolimus only if no rejection	Minimal tacrolimus if no rejection	Risk of late rejection as lymphoid system recovers
Maintenance with CTLA-4-Ig and mycophenolate mofetil†	Anti-CD25 antibody	CTLA-4-Ig, mycophenolate mofetil, and prednisone	CTLA-4-Ig, mycophenolate mofetil, and prednisone	Efficacy and safety must be established

O uso precoce de ciclosporina é evitado, uma vez que pode causar atraso no funcionamento do transplante ou ausência de funcionamento primário, em que o transplante nunca é funcional. (Vella, *et al*, 2008, [4]).

Segundo Halloran (2004) muitos dos novos protocolos emergentes não são sujeitos aos estudos adequados, de modo a estabelecer as doses correctas e a conhecer a sua eficácia e efeitos secundários reais. Muitos estudos definem como objectivo terapêutico de análise a ocorrência ou não de rejeição (cuja incidência tem vindo a diminuir). Ficam assim por estudar a função do órgão e a toxicidade dos I.S. a longo prazo, sendo necessários estudos de “*follow-up*” a longo prazo. O mesmo autor alerta-nos ainda para o facto de transplantes que apresentem deterioração progressiva de função não serem automaticamente diagnosticados como casos de rejeição crónica. Deve-se antes procurar uma causa para este facto, que poderá residir na rejeição mediada por células T, mediada por Acs ou na toxicidade a fármacos.

A escolha dos I.S. utilizados deve também ter em conta as características clínicas de cada doente (idade, história, peso, etnia, perfil lipídico, história imunológica), uma vez que irão influenciar a eficácia dos diferentes agentes I.S. (Miller *et al*, 2008, [1]).

Também Vella *et al* (2008), [2] referem não existir consenso relativamente ao protocolo de indução. No entanto, recomendam o uso de uma das seguintes opções, ambas sujeitas a estudos. A primeira usa I.S. convencionais, enquanto que a segunda recorre a Acs anti células T.

- ciclosporina (microemulsão, 8 a 10 mg/Kg), MMF (1g bid) e prednisona (iniciar 1 a 2mg/dia e aumentar durante as duas semanas seguintes até 30mg/dia);
- metilprednisolona (7mg/kg) e timoglobulina (1.5mg/Kg) intra-operatoriamente seguida de timoglobulina (1.5mg/Kg) durante 3 a 6 dias.

Os mesmos autores referem a inclusão de fármacos não imunossupressores nos regimes de indução: a) ganciclovir (em casos de risco de infecção por Citomegalovírus); b) trimetoprim-sulfametoxazole (profilaxia de pneumonia por *Pneumocystis carinii*, sepsis e infecções do tracto urinário).

Nos doentes com risco acrescido de rejeição é aconselhado o uso de um protocolo mais agressivo. Nomeadamente timoglobulina (ou OKT3-anticorpo anti células T) como regime de indução e ciclosporina ou tacrolimus como regime de manutenção. Neste grupo integram-se os doentes em idade pediátrica, afro-americanos, recipientes de rins com elevado tempo de isquémia (o tempo que decorre entre a colheita e o transplante) e os doentes que apresentam maior risco imunológico (pré-sensibilizados) .

A dose de ciclosporina deve ser ajustada através da monitorização de C2. O objectivo é obter uma concentração de 800 a 1000ng/mL nos primeiros 3 meses, passando depois para 400 a 600ng/mL.

O Tacrolimus pode ser substituído pela ciclosporina.

Devido ao risco sério de desenvolver infecções e neoplasias malignas, a imunossupressão instituída no período pós transplante deverá ser reduzida de forma progressiva e lenta até se atingir uma fase de manutenção em 6 a 12 meses. O risco está directamente relacionado com a quantidade total de imunossupressão. Deverá ser instituído em quase todos os transplantes renais (Miller *et al*, 2008, [1]).

Em termos globais, a maioria dos centros que realizam transplantes renais usam um regime imunossupressor de manutenção triplo: um inibidor da calcineurina (ciclosporina ou tacrolimus), um anti-metabolito (azatioprina ou MMF) e a prednisona. Em alguns casos o sirolimus substitui o inibidor da calcineurina ou o anti-metabolito (Miller *et al*, 2008. [1]).

Este regime parece estar associado a baixas taxas de rejeição, apresentando mesmo uma sobrevivência do transplante 1 ano após a cirurgia >90%.

Os autores citados fazem ainda referência a outros regimes. Estes envolvem uma redução no recurso aos IS com o objectivo de minimizar a toxicidade farmacológica, sem comprometer a sobrevivência a curto prazo do órgão transplantado. Baseiam-se na redução/desmame, evitamento ou minimização de corticóides ou de inibidores da calcineurina. Alguns centros usam regimes duplos (sirolimus e inibidores da calcineurina; sirolimus e antimetabolitos).

Ainda assim os autores privilegiem o protocolo de manutenção em regime triplo supracitado., uma vez que está associados a baixas taxas de rejeição.

1.5.1.4. Tratamento de Rejeição Aguda e Rejeição crónica.

Segundo Koch *et al*, 2008, [2], perante a suspeita clínica de um processo de rejeição, antes de proceder a qualquer alteração no regime imunossupressor em curso deverá proceder-se a uma biópsia.

Após a confirmação, importa também saber se a rejeição é mediada por células ou por Acs.

Os casos de rejeição mediada por células devem ser tratados com corticóides (metilprednisolona IV, 3 a 5 mg/Kg por dia durante 3 dias). Pode ser usado em combinação com outros I.S.:

- Se o resultado da biópsia for “rejeição celular Bannf I” (tubulite), então após os 3 dias pode-se, se necessário, aumentar a dose de tacrolimus ou MMF.
- Se não há resposta aos corticóides, a clínica se agrava ou se o resultado da biópsia é “rejeição celular Bannf II-III” (com envolvimento arterial), além da metilprednisolona, também é administrado timoglobulina (6mg/Kg em dois ou quatro dias).

Se a rejeição celular se tornar refractária é importante repetir a biópsia e despistar novamente um processo de rejeição mediado por Acs. Se não se confirmar, deve-se considerar o uso de OKT3 ou IG IV.

As recomendações quanto ao momento em que se deve cessar a terapêutica em doentes com rejeição recorrente são:

- Presença de infecção concorrente;
- Ausência de resposta a regimes intensos com OKT3 ou antitumoglobulina, ausência de evidência de rejeição mediada por Acs, ou qualquer outra etiologia para o processo em curso;
- Biópsia de repetição evidencia tecido renal não viável.

A necessidade de realizar uma biópsia antes de iniciar tratamento imunossupressor deve-se ao facto da nefropatia induzida por uma infecção a vírus BK produzir uma clínica semelhante à presente na rejeição aguda. O desconhecimento desta hipótese pode pôr em risco o órgão transplantado, uma vez que a terapêutica para cada uma das situações é significativamente diferente. A incidência destas infecções é segundo os autores supracitados cerca de 5 a 8%.

Se o processo em curso for rapidamente progressivo, uma infecção por vírus BK é pouco provável. O risco de desenvolver insuficiência renal aguda, potencialmente comprometedora do órgão leva a ser defendido a administração de um bolus de corticosteróides enquanto se aguarda os resultados da biópsia urgente.

Os casos de rejeição mediada por Acs são tratados com recurso a um protocolo com plasmaferese, IgIV e corticóides, com ou sem terapêutica anti-linfocitária.

O objectivo é remover os Acs circulantes e diminuir as lesões causadas.

Existem várias modalidades, quanto à frequência (diária ou em dias alternados) e quanto ao volume da plasmaferese. Geralmente só é suspendida após os níveis de creatinina atingirem 20 a 30% dos valores plasmáticos anteriores à rejeição.

No final de cada transfusão são administrado 100mg/Kg de IgIV. Após o final planeado da plasmaferese, frequentemente administra-se 500mg/Kg por dia durante 1 ou dois dias (até uma dose cumulativa total de 1000mg/Kg de IgIV).

A metilprednisolona é também administrada durante os 3 a 5 dias seguintes (300 a 500mg/dia), sendo depois substituída por prednisona.

Se o MMF e o tacrolimus fizerem parte do protocolo I.S. prévio do doente, então as suas doses serão aumentadas. Se não fizer parte, o protocolo anterior deverá ser então substituído por um novo com estes dois fármacos.

Nos casos refractários ao tratamento, junta-se ao protocolo referido o rituximab (375mg/m²).

Sempre que a análise ao tecido biopsado indicar simultaneamente características de rejeição celular e rejeição mediada por Acs, recorre-se a um protocolo que combina a plasmaferese com Ig IV, metilprednisolona e timoglobulina.

A confirmação da rejeição aguda deverá levantar sempre a suspeita de deficiente imunossupressão, quer devido ao uso de doses inadequadas quer devido a baixa aderência por parte do doente. O não reconhecimento destes factores de risco põe em risco o futuro do transplante. Possibilita novos episódios de rejeição aguda e a progressão para a rejeição crónica, uma vez que o processo agudo é em si o maior factor de risco para rejeição crónica.

O tratamento da nefropatia crónica do transplante inclui terapêutica imunossupressora e não imunossupressora (facto este relacionado com a sua etiologia).

Vella *et al*(2008, [3]) referem que sempre que um protocolo de um doente transplantado com nefropatia crónica incluir a ciclosporina, a diminuição da dose ou suspensão pode ser eficaz. Pode ser substituída por tacrolimus.

Sempre que houver evidência de actividade humoral envolvida (C4d, detecção de Acs anti-dador) os autores indicam a substituição dos I.S. por tacrolimus e MMF (ou aumentar a dose destes se já fazem parte do regime instituído).

Quanto às intervenções não imunológicas, estas baseiam-se no tratamento de factores etiológicos não imunológicos. Incluem o controlo agressivo da HTA (com fármacos inibidores da enzima conversora da angiotensina – IECAs, ou antagonistas dos receptores da angiotensina – ARA) e da hiperlipidémia.

1.5.1.5. Protocolos de Dessensibilização

Os doentes altamente sensibilizados para Ags humanos “*non-self*” (geralmente do grupo MHC e AB0) têm dificuldades acrescidas em encontrar dadores vivos compatíveis.

Uma vez que a sensibilização prévia também pode ocorrer através de transfusões sanguíneas, todos os doentes com patologia renal só deverão, quando necessário, receber sangue após depleção leucocitária, uma vez que são estas as células que expressam mais Ags MHCs (Magee *et al*, 2004).

É possível proceder à dessensibilização destes doentes, aumentando assim as hipóteses de encontrar um dador vivo compatível ou até um dador não vivo.

Relativamente aos Ags do grupo AB0, nos EUA, os grupos A e 0 são os mais prevalentes entre a população. Acs anti A e anti B são encontrados no soro do sangue do grupo 0. Estes indivíduos apresentam títulos de isoaglutininas anti-A e anti-B superiores aos títulos presentes no

grupo B e grupo A respectivamente. O tempo de espera para o transplante é maior entre os doentes do grupo B (por ser menos prevalente que o A e o 0) e 0 (pelos elevados títulos de Acs anti-A e anti-B).

Existem vários protocolos possíveis para a dessensibilização, incluindo plasmaferese, imunoadsorção, infusão de Ig IV, globulinas antitimócitos, Acs anti receptores de IL-2, anti-CD20 e esplenectomia. Existem várias combinações possíveis.

Os doentes com doença renal em estágio final estão amplamente sensibilizados relativamente a Acs HLA. Assim, os dois principais protocolos são: Ig IV a altas doses e Ig IV a baixas doses juntamente com o recurso à plasmaferese. Segundo Koch *et al* (2008, [2]) o primeiro envolve menos recursos e é menos dispendioso.

II. Conclusão

Muito antes da sua prática ser viável, já o transplante renal se afigurava como uma alternativa/hipótese terapêutica tentadora para a doença renal em estadió final. Com o tempo, veio mesmo a confirmar-se, neste contexto clínico, como sendo mais eficaz do que a diálise, quer no que diz respeito à mortalidade associada quer na qualidade de vida proporcionada.

No entanto, a sua prática nunca esteve isenta de riscos. O risco imediato que ameaçou a transplantação desde sempre foi o da rejeição imunológica. A necessidade de interferir neste processo levou ao conhecimento e determinação da histocompatibilidade entre potenciais dador e hospedeiro, cujo principal determinante (com implicações mais frequentes) reside na molécula do MHC. A RLM e o teste de microtoxicidade, além da reacção cruzada entre soros e rastreio de Igs anti-HLA permitem não só identificar as semelhanças existentes como também excluir os indivíduos pré sensibilizados e portanto com maiores riscos de rejeição (é mesmo o principal factor de risco para a rejeição humoral aguda).

Relativamente ao alotransplante, mesmo na presença da dupla dador-hospedeiro ideal, ou seja com maior grau de histocompatibilidade possível, existirão sempre diferenças relativamente a vários grupos de antigénios que terão de ser tidas em conta. Todos os casos necessitam, à partida, de algum grau de controlo do sistema imunitário.

A identificação dos processos e das lesões causadas pelos dois grandes tipos de rejeição, celular e humoral, foi também importante. Ainda que se apresentem de forma semelhante, as lesões por eles causadas são distintas. No caso da rejeição humoral, com a importância das lesões não específicas, desenvolveram-se outros métodos de diagnóstico, nomeadamente a detecção de Igs circulantes e, principalmente, a detecção imunohistoquímica do componente C4d do sistema do complemento. Pela elevada correlação deste com a rejeição humoral, observada em diversos

estudos, o seu diagnóstico alterou-se significativamente, tendo contribuído para o conhecimento da sua verdadeira incidência.

A importância do diagnóstico diferencial deve-se a diferenças significativas na actuação médica nos dois casos.

O conhecimento dos vários processos de rejeição revelou-se também essencial para o desenvolvimento de fármacos I.S., uma área ainda em franco desenvolvimento actual. Um dos maiores desafios criados foi a necessidade de desenvolver I.S. o mais específicos possíveis, afim de evitar os efeitos secundários que determinam patologias como o cancro e infecções secundárias assim como a toxicidade de alguns fármacos. Constituem um forte contributo para a mortalidade associada ao transplante.

A evolução e aplicação de testes de histocompatibilidade e terapêuticas imunossupressoras mais eficazes fizeram alterar o padrão de rejeição existente. Assim, se no início predominavam a rejeição hiperaguda e aguda, com o tempo estas foram controladas, aumentando a sobrevivência do transplante e também a prevalência de rejeição crónica. Esta constitui hoje um desafio importante.

Os critérios histológicos de rejeição, organizados na classificação de Banff, são um importante contributo para a uniformização do diagnóstico, facilitando ainda a monitorização.

Os resultados das biopsias efectuadas constituem, assim, directrizes essenciais à actuação médica na patologia associada ao transplante. É importante que numa situação aguda, a sua realização preceda a instituição do tratamento.

O conhecimento de casos de tolerância natural constituiu uma referência e estímulo ao estudo de estratégias indutoras deste estado.

A maioria das estratégias encontradas tem em comum o contacto de Ags do dador com os agentes imunitários do recipiente, geralmente imaturos, afim de influenciar a sua tolerância. Pode

decorrer de vários modos. Se for central ocorre no timo, através da expressão destes Ags nas células do estroma tímico. Se for periférica, ocorre nos órgãos linfóides secundários: (gânglios linfáticos, baço). Relativamente às células do dador, portadoras dos Ags indutores de tolerância, estas podem entrar em contacto com o sistema imunitário do recipiente antes ou depois do transplante. O primeiro caso ocorre através de transfusões sanguíneas específicas do dador ou transplantes de medula óssea e o segundo através da acção dos *passenger leucocytes* ou outras células, num processo de quimerismo.

Conclusões recentes sobre a acção inibidora dos fármacos I.S. sobre o desenvolvimento de mecanismos naturais potenciadores de tolerância terão, certamente, grande influência nos futuros protocolos imunossupressores.

BIBLIOGRAFIA

- Akalin E.; Watschinger B. 2002, “Antibody-Mediated Rejection”, *Seminars in Nephrology*, vol.27, no.4, pp. 393-407
- Akalin, E.; Pascual, M. 2006, “Sensitization after Kidney Transplantation”, *Clinical Journal of American Society of Nephrology*, vol.1, pp. 433-440
- Alexander, S.I.; Smith, N.; Hu, M.; Verran, D. 2008, “Chimerism and Tolerance in a Recipient of a Deceased-Donor Liver Transplant”, *The New England Journal of Medicine*, vol. 358, no.4, pp. 369-374
- Andrews, P.A. 2002, “Recent developments: Renal transplantation” , *British Medical Journal*, vol.324, pp. 530-534
- Ashton-Chess, J.; Brouard, Souillou, J.P. 2006, “Is clinical tolerance realistic in the next decade?”, *Transplant International*, vol. 19, pp. 539-548
- Boshiero, L.; Nacchia, F.; Fior, F.; Cordiano, C.; Tridente, G.; Bellisola, G. 2007, “Specific Alloantigen Self-Control by Regulatory T Cells in Organ Transplantation: A Review”, *Transplant Proceedings*, vol. 39, pp. 2013-2017
- Burlingham, W.; Grailer, A. P.; Heisey, D.M.; Claas, F.H.J. *et al.* 1998, “The Effect of Tolerance to Noninherited Maternal HLA Antigens on the Survival of Renal Transplants from Sibling Donors”, *The New England Journal of Medicine*, vol. 339, no.23, pp. 1657-1664
- Collins, A.B.; Chicano, S.L., Cornell, L.D.; Tolckoff-Rubin, N. *et al.* 2006, “Putative Antibody-Mediated Rejection With C4d Deposition in HLA-Identical, ABO-Compatible Renal Allografts”, *Transplant Proceedings*, vol. 38, pp. 3427-3429
- Colvin, R.B. 2003; “Chronic Allograft Nephropathy”, *The New England Journal of Medicine*, vol. 349, no. 24, pp. 2288-2290
- Colvin, R.B. 2007, “Antibody-Mediated Renal Allograft Rejection: Diagnosis and Pathogenesis”, *Journal of American Society of Nephrology* , vol.18, pp.1046-1056
- Cornell, L.D.; Smith, R.N.; Colvin, R.B. 2008, “Kidney Transplantation: Mechanisms of Rejection and Acceptance”, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, vol.3, pp.189-220
- Dragun, D.; Muller, D.N.; Brasen, J.H.; Fritsche, L. 2005; “Angiotensin II Type 1-Receptor Activating Antibodies in Renal-Allograft Rejection”, *The New England Journal of Medicine*, vol. 352, pp. 558-570

- Flegel, W.A. 2007, “Will MICA Glitter for Recipients of Kidney Transplants?”, *The New England Journal of Medicine*, vol.357, no.13, pp. 1337- 1339
- Gertson, D.W. 2000, “Impact of delayed graft function and acute rejection on kidney graft survival”, *Clinical transplantation*, vol.34 , no.6, pp.467-480
- Goldsby, R.A.; Kindt, T.J.; Osbourne, B.A.; Kuby, J. 2002, *Immunology*, W.H.Freeman and Company, Fifth Edition, New York
- Halloran, P.F. 2004, “Immunosuppressive Drugs for kidney Transplantation”, *The New England Journal of Medicine*, vol. 351, no.26, pp. 2715-2727
- Jordan, S.C.; Pescovitz, M.D.2006; “Presensitization: The Problem and its Management”, *Clinical Journal of American Society of Nephrology*, vol.1, pp. 421-432
- Kanradt, T.; Mitchison, N.A. 2001, “Tolerance and Autoimmunity”, *The New England Journal of Medicine*, vol. 344, no.9, pp. 655-661
- Kerjaschki, D; Regele, H.M.; Moosberger, I.; Nagy-Bojarskyi, K. *et al*, 2004, “Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates”, *journal of American Society of Nephrology*, vol.15, pp.603-612
- Koch, M.; Brennan, D.C. 2008, “C4d staining in renal allografts and treatment of antibody mediated rejection”, *UpToDate*, [online] [1]
- Koch, M.J.; Brennan, D.C. 2008, “Acute renal allograft rejection: Treatment”, *UpToDate*, [online] [2]
- Koch, M.J.; Brennan, D.C. 2008, “Differential diagnosis of renal allograft dysfunction”, *UpToDate*, [Online] [3]
- Koch, M.J.; Brennan, D.C. 2008, “HLA and ABO sensitization and desensitization in renal transplantation”, *UpToDate*, [Online] [4]
- Land, W.G. 2007, “Innate Alloimmunity: History and Current Knowledge”, *Experimental and Clinical Transplantation*, vol.1, pp. 575-584
- Lebeck, L.K.; Garovoy, M.R. 1999, “Histocompatibility Testing and Organ Sharing” in *Atlas of the Diseases of the Kidney*, vol. 5, Current Medicine, Philadelphia,
- Lee, H.; Clark, B.; Gooi, H.C.; Stoves, J.; Newstead, C.G. 2004, “Influence of recipient and donor IL-1 α , IL-4 e TNF α genotypes on the incidence of acute renal allograft rejection”, *Journal of Clinical Pathology*, vol. 57, pp. 101-103

- Leichtman, A.B. 2007, “Balancing Efficacy and Toxicity in Kidney-transplant Immunosuppression”, *The New England Journal of Medicine*, vol. 357, no. 25, pp. 2625-2627
- Libby, P. 2001, “Chronic Rejection”, *Immunity*, vol. 14, pp. 387-397
- Magee, C.C.; Pascual, M. 2004, “Update in Renal Transplantation”, *Archives of Internal medicine*, vol.164, pp.1373-11388
- Mannon, R. B.; Lirk, A.D. 2006, “Beyond Histology: Novel Tools to Diagnose Allograft Dysfunction”, *Clinical Journal of American Society of Nephrology*, vol.1, pp. 358-366
- Matthews, J.B.; Ramos, E.; Bluestone, J.A. 2002, “Clinical Trials of Transplant Tolerance: Slow But Steady Progress”, *American Journal of Transplantation*, vol. 3, pp. 794-803
- McCluskey, J.; Peh, C.A. 1999, “The human leucocyte antigens and clinical medicine: na overview”, *Reviews in Immunogenetics*, vol. 1, pp. 3-20
- Miller, B.W.; Brennan, D.C. 2008, “Maintenance immunosuppressive drugs in renal transplantation in adults”, UpToDate, [online] [1]
- Miller, B.W.; Brennan, D.C. 2008, “Withdrawal or avoidance pg glucocorticoids after renal transplantation”, UpToDate, [online] [2]
- Morris, P.J. 2004, “Transplantation-A Medical Miracle of the 20th Century”, *The New England Journal of Medicine*, vol. 351, no. 26, pp. 2678-2680
- Nankinell, B.J.; Borrows, R.J.; Fung, C.-L.S.; O’Connel, P. J.; Allen, R.D.M.; Chapman, J.R. 2003, “The Natural History of Chronic Allograft Nephropathy”, *The New England Journal of Medicine*, vol. 349, no.24, pp. 2326-2333
- Pascual, M.; Theruvath, T.; Kawai, T., Tolkoff-Rubin, N., Cosimi, A.B. 2002, “Strategies to Improve Long-Term Outcomes After Renal Transplantation”, *The New England Journal of Medicine*, vol. 346, no.8, pp. 580-590
- Perez, R.P.; Huang, C.Q.; Johnson, J.R.; Gallay, B.J. *et al.* 2003, “Pretransplant Soluble Adhesion Molecule Expression Predicts Outcome After Living Donor Renal Transplantation”, *Archives of Surgery*, vol.138, pp. 1113-1120’
- Quigg, R.J. 2003; “Complement and the Kidney”, *The Journal of Immunology*, vol. 171, pp. 3319-3324
- Racusen L.C.; Haas M. 2006, “Antibody-mediated rejection in renal allografts: lessons from pathology”, *Clinical Journal of American Society of Nephrology*, vol.1, pp.415-420

- Roussey-Kesler, G.; Giral, M.; Moreau, A.; Subra, J.-F. et al. 2006, “Clinical Operational Tolerance after Kidney Transplantation”, *American Journal of Transplantation*, vol.6, pp.736-746
- Rush, D. 2006, “Protocol Transplant Biopsies: An Underutilized Tool in Kidney Transplantation”, *Clinical Journal of American Society of Nephrology*, vol.1, pp.138-143
- Sarwal, M.; Chua, M.-S.; Kambham, N.; Hsieh, S.-C. et al. 2003, “Molecular Heterogeneity in Acute Allograft Rejection Identified by DNA Microarray Profiling”, *The New England Journal of Medicine*, vol. 349, pp. 125-138
- Scandling, J.D.; Busque, S.; Dejbakhsh-Jones, S.; Benike, C. 2008, “Tolerance and Chimerism after Renal and Hematopoietic-Cell Transplantation”, *The New England Journal of Medicine*, vol. 38, no.4, pp. 362-368
- Schatzki, S. 2003, “The First Kidney Transplantation”, *AJR-american roentgen ray society*, vol.182, p. 190
- Starzl, T.A. 2008, “Immunosuppressive Therapy and Tolerance of Organ Allografts”, *The New England Journal of Medicine*, vol. 358, no. 4, pp.407-411
- Strom, T.B. 2005, “Rejection – More than the Eye Can See”, *The New England Journal of Medicine*, vol. 353, no.22, pp. 2394-2396
- Sykes, M. 2001, “Mixed Chimerism and Transplant Tolerance”, *Immunity*, vol.14, pp.417-424
- Tantravashi, J.; Womer, K.L.; Kaplan, B.2007, “Why Hasn’t Eliminating Acute Rejection Improved Graft Survival?”, *Annual Review of Medicine*, vol.58, pp.369-385
- Tatsuo, K.; Cosimi, A.B.; Spitzer, T. R.; Tolkoff-Rubin, N. et al. 2008, “HLA Mismatched Renal Transplantation without Maintenance Immunosuppression”, *The New England Journal of Medicine*, vol. 358, no. 4, pp. 353-361
- Tinckan, K.J.; Chandraker, A. 2006, “Mechanisms and Role of the HLA and non-HLA Alloantibodies”, *Clinical Journal of American Society of Nephrology*, vol.1, pp. 404-414
- Vella, J. 2008, “Risk factors for graft failure in kidney transplantation”, UpToDate, [Online] [1]
- Vella, J. 2008, “Transplant Immunobiology”, UpToDate, [online] [2]
- Vella, J.; Brennan, D.C. 2008, “Chronic renal allograft nephropathy”, UpToDate, [Online] [3]
- Vella, J.; Brennan, D.C. 2008, “Induction Immunosuppressive therapy in renal transplantation”, UpToDate, [online] [4]

- Vella, J.; Koch, M.J.; Brennan, D.C. 2008, “Acute renal allograft rejection: diagnosis”, UpToDate, [Online] [5]
- Wolfe, R.A.; Ashby, V.B.; Milford, ER.L. et al, 1999, “Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant”, *The New England Journal of Medicine*, vol.341, pp. 1725-1730
-
- Wood, J.K.; Jones, N.D.; Bushell, A.R.; Morris, P.J. 2001, “Alloantigen-induced specific immunological unresponsiveness”, *The royal society*, vol. 356, pp. 665-680
- Zou, Y.; Stastny, P.; Susal, C., Dohler, B.; Opelz, G. 2007, “Antibodies against MICA Antigens and Kidney-Transplant Rejection”, *The New England Journal of Medicine*, vol.357, no.13, pp.1293-1300
- Roberts, J.P.; Wolfe, R.A.; Bragg-Gresham, J.L.; Rush, S.H. 2004, “Effect of Changing the Priority for HLA Matching on the Rates and Outcomes of Kidney Transplantation in Minority Groups”, *The New England Journal of Medicine*, vol.350, no.6, pp. 545-552