

Microquimerismo após transplante renal e transfusão sanguínea

Microchimerism after renal transplantation and blood transfusion ouse dust mites in the city of Salvador-BA

Vanda Benini¹, Sophie Caillat-Zucman², Wilma C. N. Forte³

1 – Professora Assistente de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2 – Professora Doutora. Responsável pelo "Laboratoire D'histocompatibilité de L'Hôpital Necker" em Paris, França; 3 – Professora Adjunto de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

Resumo

Objetivo: Recentemente, o microquimerismo foi sugerido ser o responsável pela indução da não res-ponsividade imunológica aos transplantes, bem como pela ação benéfica das transfusões de sangue adm-nistradas no pré-transplante renal. O presente tra-balho teve como objetivos verificar a presença de células quiméricas após protocolos de transfusões de sangue em pacientes em hemodiálise e após trans-plante renal com doador vivo intra-familiar, com função renal estável por longo período de tempo.

Métodos: Foram estudados 75 pacientes e foi utili-zada a técnica da PCR-SSP (Reação de polimeriza-ção em cadeia, utilizando "primers" com seqüência específica) para a pesquisa de células quiméricas em sangue periférico.

Resultados: A presença de microquimerismo foi constatada em seis pacientes (16,2%) após os proto-colos de transfusões de sangue e em quatro (10,5%) após transplante renal. Dos pacientes submetidos aos protocolos de transfusões de sangue e que apresenta-ram microquimerismo, quatro (10,8%) compartilha-ram um haplótipo ou um HLA-DR com o doador de sangue. Os pacientes que apresentaram células qui-méricas após o transplante haviam recebido transfu-são específica do doador (DST) no pré-transplante renal.

Conclusões: Os resultados do atual trabalho mos-tram que o microquimerismo foi achado pouco fre-qüente após protocolo de transfusões de sangue em pacientes em hemodiálise e esteve associado a núme-ro não significativa de transplantes renais tolerantes a longo prazo, independentemente se no pré-trans-plante os pacientes houvessem recebido DST ou fusão inespecífica de banco de sangue. Possivelmen-te, vários fatores interferiram na imunomodulação e tolerância ao transplante renal e o microquimerismo tenha alguma participação, porém não exclusiva. Por outro lado, o microquimerismo pode refletir as célu-las do doador ignoradas pelo hospedeiro e que per-manecem em coabitação com as células do receptor.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 1999; 22(1):25-33 microquimerismo, transplante renal, transfusão san-güínea, PCR-SSP (Reação de polimerização em ca-deia,

Resultados

Grupo I – As 13 crianças em hemodiálise ti-nham idade variando entre cinco anos e dois me-ses e 17 anos e nove meses, com média e desvio padrão ($X \pm DP$)=11,8±4,6 anos,meses. Oito cri-anças (61,53%) eram do sexo masculino. Cinco crianças (38,46%) receberam DST. Oito crianças (61,53%) receberam TSI de seis doadores dife-rentes, sendo que cinco delas (62,5%) compar-tilhavam um HLA-DR com um dos doadores das transfusões.

Dos cinco pacientes que receberam DST, dois (40%) apresentaram microquimerismo nas amos-tras de sangue periférico colhidas nos 7º e 30º dias após as transfusões, em um deles, e no 60º dia, no outro. Os aloantígenos encontrados foram HLA-DR3 em um paciente e HLA-DR4 no ou-tro. As demais amostras colhidas até no 120º dia após as transfusões não apresentavam os aloantí-ge-nos do doador. As duas crianças que apresen-taram microquimerismo após protocolo de trans-fusões foram transplantadas dois meses após o protocolo. Não foi verificada a presença de alo-antígenos dos doadores no sangue periférico, 14 meses após o transplante renal bem sucedido. Das oito crianças que receberam TSI uma (12,5%) apresentou microquimerismo apenas na amostra de sangue colhida no 30º dia após as transfusões. Essa criança não apresentava com-patibilidade HLA-DR com os doadores das trans-fusões. O aloantígeno quimérico encontrado foi HLA-DR4.

A análise desses dados revelou não haver dife-rença estatisticamente significativa entre a presen-ça do microquimerismo e o tipo de transfusão sanguínea administrada no pré-transplante renal ($p=0,5$). Do mesmo modo, não houve diferença estatisticamente significativa entre transfusões sanguíneas que compartilhavam uma haplo-iden-tidade (DST) ou uma compatibilidade HLA-DR com os receptores e a presença de microquime-rismo ($p=1,0$).

O grupo de adultos em hemodiálise, composto de 24 pacientes, apresentava idade que variava entre 17 e 60 anos com média e desvio padrão ($X \pm DP$)=40,8±13,6 anos. Quatorze pacientes (58,33%) apresentavam uma

empregando "Primers" com Sequência Específica).

Abstract

Objective: Recently, microchimerism has been suggested to be the responsible agent for both the induction of immunological non-responsivity to transplants and also beneficial action in blood transfusions administered in the renal pre-transplant period. This study's objective was to verify the presence of chimeric cells after blood transfusion protocols in patients on hemodialysis and after intrafamilial renal transplant with living donor, with long-lasting stable renal function.

Methods: Seventy-five patients were studied and the PCR-SSP (sequence specific primers) was used for the research of chimeric cells in peripheral blood.

Results: The presence of microchimerism was verified in six (16,2%) patients after the blood transfusion protocols and in four (10,5%) patients after renal transplant. Of the patients who both underwent blood transfusion protocols and presented microchimerism, four (10,8%) shared a haplotype or a HLA-DR with the blood donor. The patients presenting chimeric cells after transplant had received donor specific transfusion (DST) in the renal pre-transplant period.

Conclusion: The results of this study show the microchimerism was found very seldom after blood transfusion protocols in patients on hemodialysis and, then, it associated to a non-significant number of long-term tolerant renal transplants, irrespective of whether in the pre-transplant period the patients had received DST or non-specific transfusion from a blood bank. Possibly, several factors may interfere in the immunomodulation and tolerance to renal transplant, and the microchimerism may play a role, too, but not exclusively. On the other hand, the microchimerism can reflect the donor's cells which were ignored by the host and which have remained in cohabitation with the receptor's cells.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 1999; 22(1):25-33 microchimerism, renal transplant, blood transfusion, PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers).

Introdução

A palavra microquimerismo foi introduzida em 1974 por Liegeois *et al*¹, para definir uma pequena proporção de células do doador, detectadas no baço de camundongos submetidos a transplante de pele e injeção de células de medula óssea provenientes de doadores da mesma espécie. Proliferação e sobrevivência de células linfóides do doador significam que o receptor tornou-se uma quimera, com coexistência de células linfóides circulantes de ambos, doador e receptor.

O mecanismo de tolerância a um enxerto não está perfeitamente esclarecido. Provavelmente, vários mecanismos estão envolvidos e o timo ocuparia papel de destaque nesse processo. Estudos comprovam que o repertório dos linfócitos T periféricos é influenciado pelo microambiente encontrado no timo, no início do seu desenvolvimento, sendo

compatibilidade HLA-DR com seus doadores sanguíneos. A idade desses pacientes variou entre 17 e 60 anos, com média e desvio padrão ($X \pm DP$) = $43,2 \pm 14,0$ anos. Dez pacientes (57,14%) eram do sexo masculino. Cinco pacientes apresentavam, além de uma compatibilidade HLA-DR, uma compatibilidade HLA-B com seus doadores.

A pesquisa do microquimerismo foi positiva em dois pacientes (14,28%). Esses pacientes, além de um HLA-DR, compartilhavam um HLA-B. Os aloantígenos quiméricos foram o HLA-DR4 encontrado no sangue periférico colhido no 7º dia após a transfusão em um paciente e, no outro, o HLA-DR3 encontrado nas amostras sanguíneas colhidas nos 7º, 30º e 60º dias após a transfusão. Um dos pacientes desse grupo (MHB) foi submetido a biópsia de um linfonodo periférico no ato do transplante renal, realizado doze meses após o protocolo de transfusão. O DNA genômico analisado não apresentou aloantígenos do doador da transfusão, do mesmo modo que não havia apresentado aloantígenos do doador nas amostras de sangue analisadas até o 120º dia após a transfusão sanguínea.

Dez pacientes desse grupo (41,66%) receberam transfusões sanguíneas sem compatibilidade HLA-DR. A idade desse grupo variava entre 22 anos e 56 anos, com média e desvio padrão ($X \pm DP$) = $37,5 \pm 13,0$ anos. Oito pacientes (80%) eram do sexo masculino. Nas análises das amostras de sangue periférico de um dos pacientes, colhidas nos 7º, 30º e 60º dias após transfusão, foram encontrados aloantígenos quiméricos. Esses aloantígenos eram representados pelo HLA-DR4. O mesmo paciente (PA) apresentou aloantígenos do doador e do receptor do material de biópsia de pele, realizada seis meses após o transplante renal bem sucedido. No entanto, o HLA-DR quimérico encontrado foi o HLA-DR11 e não o HLA-DR4, anteriormente encontrado. Um outro paciente (BY) desse grupo foi submetido a biópsia de um linfonodo periférico no momento do transplante renal, realizado 13 meses após o protocolo de transfusão. Não foram encontradas células quiméricas. Do mesmo modo que não havia apresentado aloantígenos do doador no sangue periférico até 120º dias após a transfusão. A presença de microquimerismo foi observada em seis pacientes (16,21%), sendo três crianças (23,07% das crianças estudadas) e três adultos (10,71% dos pacientes adultos analisados).

A análise dos dados revelou não haver diferença estatisticamente significativa entre presença de microquimerismo e o tipo de transfusão sanguínea administrada (DST ou TSI), assim como, entre a microquimerismo e a presença ou ausência de compatibilidade HLA-DR ou haplo-identidade com o doador da transfusão ($p=1,0$).

Grupo II – A idade dos pacientes variava de três anos e dois meses a 21 anos e nove meses, com média e desvio padrão ($X \pm DP$) = $11,7 \pm 4,7$ (anos, meses). Em 78,94% dos casos os doadores dos transplantes renais intra-familiares, em crianças, foram suas mães. Quatorze pacientes (36,84%) não receberam DST no pré-transplante renal. A idade desses pacientes variava de quatro anos e sete meses a 19 anos e sete meses, com média e desvio padrão ($X \pm DP$) = $11,4 \pm 4,4$

selecionado pelas células epiteliais tímicas ou pelas células provenientes da medula óssea – células macrofágicas/dendríticas². Os lin-fócitos T liberados pelo timo são capazes de re-conhecer os antígenos em associação às proteínas próprias do seu HLA e incapazes de reconhecer os antígenos ligados às proteínas de um HLA es-tranho ao hospedeiro. Estabelecer-se-ia, assim, o fenômeno de tolerância, definido como a não-responsividade das células T alo-reativas aos an-tígenos próprios³.

O emprego de transfusões sanguíneas na ob-tenção de tolerância ao enxerto subsequente, ini-ciou-se nos anos 60. Até então, acreditava-se que as transfusões administradas no pré-transplante deveriam ser evitadas, com o intuito de diminuir os efeitos imunizadores e, portanto, deletérios ao órgão a ser transplantado. O efeito benéfico das transfusões na sobrevida dos enxertos renais foi amplamente comprovado por Opelz *et al*⁴, em 1981, porém a política transfusional no prétrans-plante renal é ainda controversa. Estudos realiza-dos por Lagaaij *et al*⁵, evidenciaram que a sobre-vida do enxerto era maior quanto maior fosse a compatibilidade HLA-DR entre o receptor e o doador da transfusão sanguínea.

Com o objetivo de aumentar a sobrevida dos transplantes renais com doador vivo, Salvatierra *et al*⁶ iniciaram um protocolo com transfusões es-pecíficas do doador – "donor-specific transfu-sion" (DST), mostrando que, com este procedi-mento, a sobrevida aproximava-se daquela dos transplantes HLA idênticos. Entretanto, 25 a 30% dos pacientes que recebem DST desenvol-vem anticorpos linfocitotóxicos anti-HLA, fican-do impossibilitados de serem transplantados com seus doadores em potencial. A introdução de ci-closporina ao protocolo de DST diminuiu essa sensibilização⁷.

Dentre os mecanismos imunológicos aventa-dos para explicar a indução de tolerância a um enxerto após transfusão sanguínea prévia, pode-mos citar a seleção dos receptores "maus respon-dedores", a indução de anticorpos anti-idiotípi-cos⁸, o mecanismo de deleção clonal⁹ e a dimi-nuição de determinadas citocinas¹⁰. A interleu-cina-2 (IL-2) tem papel central na amplificação da resposta imune. Animais de laboratório pré-tratados com DST e tolerantes ao transplante re-nal mostraram produção diminuída de IL-2 assim como de interferon gama (INFg). Esta tolerância era inibida pela administração de INFg ou IL-2 re-combinante no momento do transplante¹⁰.

Kashiwagi *et al*¹¹, em 1969, descreveram pela primeira vez o microquimerismo. Em nove re-ceptores de transplantes hepáticos, do sexo femi-nino, cujos doadores eram masculinos, foi verifi-cada a presença do cariótipo masculino nas célu-las do endotélio vascular hepático e feminino nas células de Kupffer, até 400 dias após o transplan-te. Do mesmo modo, foi observado no soro de três desses pacientes a presença de gamaglobuli-na cujos fenótipos eram específicos aos doa-dores¹¹.

(anos, meses). Treze pacientes (92,85%) eram do sexo masculino. O tempo de seguimento variou entre dois meses e sete anos e seis meses, com média e desvio padrão ($X \pm DP$)=4,6±2,9 (anos, meses). Esses pacientes não receberam DST por não preencherem os requisitos do protocolo. Em ne-nhum dos 14 pacientes que não receberam DST foi encontrado microquimerismo nas amostras de sangue periférico.

Vinte e quatro pacientes (63,15%) foram sub-metidos ao protocolo de DST no pré-transplante renal. Esse grupo de pacientes tinha idade que variava de três anos e dois meses a 21 anos e nove meses, com média e desvio padrão ($X \pm DP$)=12±5 anos. Doze pacientes (50%) eram do sexo masculino. O tempo de seguimento va-riou entre dois meses e 14 anos, com média e desvio padrão ($X \pm DP$)=5,5±4,7 (anos, meses). Doze pacientes (50%) receberam tratamento com ciclosporina concomitante ao protocolo de trans-fusões.

Dentre os 38 receptores de transplante renal, observamos a presença de HLA-DR quimérico em sangue periférico em quatro pacientes (10,52%), sendo que todos foram tratados com DST. Os aloantígenos quiméricos encontrados em todos os casos foram HLA-DR3. Três pacien-tes que apresentaram microquimerismo são acompanhados há mais de onze anos ($X \pm DP$ =12,3±1,5 anos) e o quarto, há dois anos.

A análise estatística desses dados revelou que em crianças transplantadas renais não há diferen-ça estatisticamente significativa entre microqui-merismo e o tipo de transfusão sanguínea admi-nistrada no pré-transplante ($p=0,20$).

Discussão

O objetivo maior em transplantes de órgãos é alcançar o estado de tolerância aos aloantígenos do doador. No entanto, os mecanismos de indu-ção de tolerância ao aloenxerto, assim como de imunomodulação induzido pelas transfusões san-güíneas, ainda não se encontram completamente elucidados. Várias hipóteses são discutidas e, possivelmente, elas não são mutuamente exclu-sivas. Mais recentemente, foi sugerida como pro-vável mecanismo de imunomodulação e tolerân-cia, a presença de microquimerismo. Neste caso, as transfusões sanguíneas e a infusão de medula óssea administradas no pré-transplante renal se-riam fatores propiciadores deste fenômeno²⁰.

A tolerância ao órgão transplantado decorreria da migração das células dendríticas/macrofágicas do enxerto, para o timo do receptor. Esta migra-ção celular acarretaria a deleção dos precursores dos linfócitos T citotóxicos, específicos ao doa-dor, do repertório imunológico do receptor, le-vando ao microquimerismo persistente¹⁴.

Para avaliar se o microquimerismo estaria rela-cionado aos efeitos benéficos das transfusões sanguíneas administradas no pré-transplante re-nal e ao mecanismo de tolerância ao enxerto re-nal, foram analisadas amostras de sangue perifé-ricos de pacientes em hemodiálise e receptores de transplantes renais de doadores vivos fami-liares.

Starzl *et al.*¹², em 1992, estudaram receptores de transplantes hepáticos do sexo feminino, cujos enxertos apresentavam boa função, entre 10 e 19 anos após a cirurgia. Essas pacientes foram trans-plantadas com órgãos de doadores do sexo masculino e o cromossomo Y foi encontrado no sangue periférico, pele e linfonodos. Esse fato sugere a ocorrência de migração celular e, de acordo com os autores, teria papel importante na indução de um estado de não-responsividade ao enxerto¹².

Embora o microquimerismo seja detectado em pacientes tolerantes aos enxertos, não há evidências claras de que ele seja o responsável pela indução e manutenção da tolerância.

Duas hipóteses são sugeridas para explicar os possíveis mecanismos implicados na tolerância induzida por um estado de microquimerismo após transplantes de órgãos, assim como após as transfusões sanguíneas: as células linfóides do enxerto migrariam para a periferia, produzindo uma expansão clonal recíproca das células linfóides do doador e do receptor equivalente a uma cultura mista linfocitária bidirecional¹³ ou as células imunocompetentes do enxerto, células dendríticas e células linfóides, migrariam para o timo, colonizando-o e induzindo um estado de quimerismo hamatopoiético. As células tímicas do receptor vão se educar face às células intratímicas do doador e, desse modo, serão incapazes de reconhecê-las na periferia. As experiências com inoculação intratímica de células da medula óssea realizadas no pré-transplante cardíaco favoreceram tal hipótese¹⁴.

A hipótese de que a indução e obtenção de tolerância ao enxerto seria decorrente da presença de microquimerismo, começou a ser contestada por observações feitas em animais e no homem.

Estudos realizados por Caillat-Zucman *et al.*¹⁵, em sangue periférico e pele de 34 receptores de transplantes renais doadores cadáveres, dois a 20 anos após a cirurgia, mostraram que os pacientes apresentavam função renal estabilizada, com exceção de três, que estavam em rejeição crônica. A presença de microquimerismo foi constatada em pequena percentagem de casos e não se correlacionou com a tolerância ao órgão. Em dois dos três pacientes que apresentavam rejeição crônica, o exame da pele revelou a presença de microquimerismo¹⁵.

Ishida *et al.*, examinando sangue periférico de 13 receptores de transplantes renais de doadores vivos relacionados, com funções renais estabilizadas 15 anos após a cirurgia, encontraram microquimerismo em apenas um dos pacientes¹⁶.

Objetivos do trabalho

1. Verificar o aparecimento de microquimerismo após transfusões sanguíneas administradas a pacientes em hemodiálise.
2. Verificar o aparecimento de microquimerismo após

A pesquisa foi realizada com auxílio da biologia molecular e ampliação do DNA genômico por PCR. A técnica utilizada foi a PCR-SSP, que é bastante sensível, realizada em tempo reduzido e, principalmente, tem procedimento simples.

A análise do sangue periférico de setenta e cinco pacientes mostrou microquimerismo em apenas dez (13,3%). Seis pacientes (8%), três crianças e três adultos, estavam em tratamento hemodialítico e pertenciam aos protocolos de transfusões sanguíneas. Quatro pacientes (5,6%) eram transplantados renais. A presença de células quiméricas após transfusões sanguíneas ocorreu em números não significantes em casos e, mesmo quando presente, não foram encontradas em todas as amostras sanguíneas, analisadas no decorrer do tempo, em um mesmo paciente. Dentre os pacientes que estavam em hemodiálise e apresentaram microquimerismo no sangue periférico, dois (33,3%) haviam recebido DST. A pesquisa de microquimerismo, 14 meses após os transplantes realizados com os rins dos doadores da DST, dois meses após o término do protocolo, revelou-se negativa. Desse modo, é pouco provável que o efeito benéfico do tratamento com DST seja decorrente do microquimerismo, já que os alelos quiméricos estiveram presentes em número não significante de casos e, quando presentes, não foram encontrados em sangue periférico, após transplantes renais tolerantes.

Células quiméricas foram encontradas em três (12,5%) dos 24 pacientes adultos em hemodiálise, sendo que em dois deles havia não somente uma compatibilidade HLA-DR com uma das transfusões sanguíneas administradas, mas também uma compatibilidade HLA-B. O terceiro paciente apresentou microquimerismo após a transfusão de sangue sem compatibilidade HLA-DR com o receptor. Quando submetido a biópsia de pele, seis meses após o transplante renal, o alelo quimérico encontrado foi diferente daquele detectado no pré-transplante (HLA-DR4 e DR11 respectivamente).

O presente trabalho não evidenciou o microquimerismo como responsável pelo efeito benéfico da administração de transfusões sanguíneas com uma compatibilidade HLA-DR com receptor, visto que apenas 10,5% dos pacientes que receberam essas transfusões apresentaram células quiméricas.

Dos 38 pacientes transplantados com funções renais normais, quatro (10,5%) apresentaram células quiméricas, sendo que dois deles haviam recebido DST no pré-transplante.

Os dados encontrados neste estudo mostram que o efeito benéfico das transfusões sanguíneas, DST ou TSI com uma compatibilidade HLA-DR com o receptor, provavelmente não é devido à presença de microquimerismo, pois o número de casos positivos encontrados não foi estatisticamente significativo. Do mesmo modo, o microquimerismo não é indispensável para a tolerância ao enxerto haplo-identico, visto que, em pacientes transplantados renais, com função renal normal após longo período de seguimento, ele esteve presente em pequena percentagem de casos.

Nossos achados são coerentes com estudos recentes da

transplantes renais tolerantes a lon-go prazo.

Métodos

Foram estudados 75 pacientes, (51 crianças e 24 adultos). Trinta e sete estavam em tratamento hemodialítico. Trinta e oito pacientes eram crian-ças transplantadas renais, com enxertos intra-fa-miliares haplo-idênticos em 37 delas e, em uma, intra-familiar sem compatibilidade HLA-DR.

Foram excluídos do protocolo de transfusões sanguíneas os pacientes que já haviam recebido transfusões ou transplantes e as pacientes que já haviam engravidado. O estudo foi iniciado após o consentimento dos pais ou responsáveis.

Grupo I – constituído por 37 pacientes em he-modiálise, submetidos aos protocolos de transfu-sões sanguíneas e aguardando transplante renal. Todas as 13 crianças deste grupo receberam transfusões com uso concomitante de ciclospori-na. Aquelas a serem transplantadas com doadores renais intra-familiares receberam transfusões de seus futuros doadores –transfusão específica do doador (DST). As demais receberam transfusão inespecífica de banco de sangue (TSI). Quatorze pacientes adultos pertenciam ao protocolo de STI, cujos doadores sanguíneos apresentavam uma compatibilidade HLA-DR com seus recep-tores. Dez pacientes adultos pertenciam ao proto-colo de TSI, sem compatibilidade HLA-DR entre doadores e receptores das transfusões. Para os pacientes adultos, o protocolo de transfusões foi realizado sem o uso concomitante de ciclospori-na.

Grupo II – constituído por 38 pacientes sub-metidos ao transplante renal com doadores vivos intra-familiares. Os pacientes apresentavam fun-ção renal normal por ocasião da última consulta médica. Este grupo era constituído por 14 paci-entes que não receberam DST no pré-transplante renal por tratar-se de segundo transplante ou por haverem recebido mais que duas TSI. Vinte e quatro pacientes receberam DST no pré-trans-plante renal, sendo que doze foram tratados com ciclosporina concomitantemente ao protocolo de DST.

A pesquisa baseou-se no estudo de sangue pe-riférico em todos os pacientes. As amostras san-güíneas foram colhidas com intervalos regulares de tempo previamente determinados, após trata-mento com DST ou com TSI. Assim, as colheitas foram feitas no dia inicial do protocolo e nos 7º, 30º, 60º, 90º e 120º dias após as transfusões. As amostras de sangue das crianças transplantadas foram colhidas por ocasião da consulta médica, sendo que cada uma delas encontrava-se em épo-cas diferentes do período pós-transplante renal. Os materiais de biópsias de linfonodos periféri-cos e pele, se disponíveis, eram igualmente examinados e foram obtidos em pacientes adultos por ocasião do transplante renal ou após este.

Os linfócitos do sangue periférico, linfonodos e pele dos receptores foram utilizados como fon-te de DNA¹⁷.

A Reação de Polimerização em Cadeia com "primers" de seqüência específica (PCR-SSP) foi a técnica empregada

literatura. Assim, Garnier *et al.*, estu-dando pacientes transplantados renais de doado-res vivos haplo-idênticos, não observaram micro-quimerismo no sangue periférico²¹. Outros estu-dos têm evidenciado que transplantes com boa função renal após longa data, provenientes de do-adores cadáveres ou vivos, apresentam somente uma pequena percentagem de células quiméricas, encontradas em pele, rim, sangue periférico ou linfonodos. Os autores não correlacionam tole-rância ao órgão com a presença de microqui-merismo²².

Os resultados do presente trabalho indicam que o microquimerismo, para o qual foi proposto ser o mecanismo de tolerância imunológica anti-geno-específica do transplante, pode aparecer após transplante renal de doador vivo, porém em número não significativo de casos. É possível que o baixo número de células migratórias do rim se-ja responsável por esta baixa freqüência de célu-las quiméricas. Por outro lado, as células do doa-dor poderiam se alojar em outros órgãos do re-ceptor como timo, baço ou linfonodos, e o san-gue periférico não seria o melhor local para pes-quisá-las. No entanto, a presença de microquime-rismo, como responsável pelo efeito benéfico das transfusões, não foi confirmada em linfonodos periféricos de dois pacientes submetidos ao pro-tocolo de transfusões sanguíneas e analisados por ocasião do transplante renal. A tolerância, por sua vez, é conseqüente a mecanismos não perfei-tamente identificados até o momento. Possivel-mente, vários fatores interferiram na imunomodu-lação e tolerância ao transplante e o microqui-merismo teria seu lugar, porém não exclusivo. Por outro lado, o microquimerismo pode refletir as células do doador que são ignoradas pelo hos-pedeiro, permanecendo em coabitação com as células do receptor.

Conclusões

No presente trabalho, o microquimerismo este-ve associado em número não significativo de ca-sos após transfusões sanguíneas, independente-mente de serem específicas do doador (DST), inespecíficas de banco de sangue (TSI) e com ou sem compatibilidade HLA-DR com o receptor. Em pacientes transplantados renais, seguidos por longo período de tempo e com função renal nor-mal, o microquimerismo foi achado pouco fre-qüente, não estando associado à sobrevida do enxerto.

Referências bibliográficas

1. Liegeois A, Charreire J, Brennan LB. Allograft enhancement induced by bone marrow cells. *Surg Forum* 1974;25:297-300.
2. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell toleran-ce by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987; 49:273-80.
3. Marrack P, Lo D, Brinster R, Palmiter R, Burkly L, Flavell RH *et al.* The effect of thymus environ-ment on T cell development and tolerance. *Cell* 1988;53:627-34.
4. Opelz G, Graver B, Terasaki PI. Induction of high kidney graft survival rate by multiple trans-fusion. *Lancet* 1981;1:1223-5.
5. Lagaij EM, Hennemann IPH, Ruigrok M, Haan MW, Persijn GG, Termijtelen A, *et al.* Effect of one HLA-DR antigen matched and completely HLA-DR mismatched blood transfusions on sur-vival of heart and kidney allograft. *N Engl J Med* 1989;321:701-5.
6. Salvatierra O, Amend W, Vincenti F, Potter D, Iwaki Y, Opelz G, *et al.* Pretreatment with donor-specific blood transfusions in related recipients with high MLC. *Transplant Proc* 1981;13:142-9.
7. Al-Muzairi IA, Innes A, Hillis A, Stewart KN, Bone JM, Catto GRD, *et al.* Renal transplanta-tion: Cyclosporin A and antibody development

para a detecção de micro-quimerismo. Essa técnica baseia-se no princípio de que a eficiência da reação de PCR é maior quando se utiliza um "primer" totalmente compatível, comparada com "primers" que tenham uma ou mais incompatibilidades. Estes "primers" oli-gonucleotídicos são designados para amplificar determinados alelos ou grupos de alelos¹⁸.

O "kit" PCR-SSP utilizado é comercializado pela Dynal A.S., Oslo, Norway¹⁹. Esse "kit" é constituído de 24 diferentes tubos de ensaio, con-tendo cada um deles uma mistura de "primers" que amplifica os alelos DRB1 de uma mesma especificidade sorologicamente definida. Três des-ses tubos contêm uma mistura de "primers" que amplifica as superespecificidades de DRW51, DRW52 e DRW53, correspondentes respectiva-mente ao HLA-DR 15,16, HLA-DR 11,12,13,14, 17,18 e HLA-DR 4,7,9, fornece um controle adi-cional de tipagem específica, sendo útil para con-firmar a presença dos alelos quando amplificados em outros tubos. Para o controle interno da posi-tividade de amplificação, é incluído em cada rea-ção de PCR um par de "primers" que amplifica o terceiro **intron** do gene HLA-DRB1 e que origi-nará um fragmento com peso molecular de 429 pb. Esta reação serve como garantia de que o processo de amplificação enzimática do DNA funcionou em cada tubo testado. Quando existe a amplificação de outro alelo de uma dada PCR, a faixa correspondente ao controle de positividade da reação poderá ser mais clara e uma segunda faixa é visível na altura equivalente ao peso mo-lecular dos pares de base desse alelo amplificado. Este fato é importante em casos de indivíduos homozigotos, em que teremos no exame do gel de agarose somente uma faixa de amplificação, porém o "primer" referente ao controle de posi-tividade incluído em cada reação de PCR será amplificado em todas as reações, confirmando que o processo enzimático funcionou.

Para a preparação de cada reação de PCR fo-ram utilizados 5 µl desta mistura de "primers", 2 µl do DNA extraído pelo método fenol-clorofór-mio, 3 µl da solução de PCR e 1,0 U de Taq DNA polimerase. A amplificação foi realizada segundo os parâmetros habituais e o produto de amplificação examinado sob luz ultravioleta, após eletroforese em gel de agarose e documen-tado em fotografia.

Quando o receptor ou o doador era homozigo-to para o alelo HLA-DR4, foi utilizado o "kit" PCR-SSP com oito reações de PCR para identi-ficação dos subtipos desse alelo. Para a prepara-ção desta PCR utilizou-se procedimento seme-lhante ao anteriormente descrito.

Para podermos detectar a presença de um pe-queno número de células do doador, é necessário que a técnica seja bastante sensível e quantificá-vel. A técnica de PCR-SSP apresenta um grau de resolução e, no presente estudo, a detecção do li-miar de sensibilidade foi feita por diluições seria-das do DNA alvo, em presença de quantidade constante (100 ng/µl) de um DNA de referência. O DNA alvo foi detectado até diluição a 1/5.000 equivalente a 100 pg, o que corresponde à pro-porção de uma célula do doador para 5 000 célu-las do receptor.

- after donor-specific transfusion. *Kidney Int* 1989; 35:1057-63.
8. Fagnilli L & Singal DP. Blood transfusions may induce anti-T cell receptor antibodies in renal pa-tients. *Transplant Proc* 1982;14:319-21.
9. Terasaki PI. The beneficial transfusion effect on kidney graft survival attributed to clonal deletion. *Transplantation* 1984;37:119-25.
10. Dallman MJ, Wood KJ, Hamano K, Bushell AR, Morris PJ, Wood MJA, *et al*. Cytokines and peri-pher-al tolerance to alloantigen. *Immunol Rev* 1993;133:5-18.
11. Kashiwagi N, Porter KA, Penn I, Brettschneider L, Starzl TE. Studies of homograft Sex and of gammaglobulin phenotypes after orthotopic ho-motransplantation of the human liver. *Surg Fo-rum* 1969;20:374-6.
12. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Ramos H, Zeevi A, Rudert WA, *et al*. Systemic chimerism in human female recipients of male livers. *Lancet* 1992;340:876-7.
13. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Ricord C, Ildstad S, Terasaki PI *et al*. Chimerism after liver transplantation for type IV glycogen storage di-sease and tytel Gaucher's disease. *N Engl J Med* 1993;328:745-9.
14. Ito A, Ito T, Kamiike W, Nozaki S, Uchikoshi F, Tanaka T *et al*. Induction of tolerance in rat car-diac allograft model by intrathymic injection of bone marrow cells. *Transplant Proc* 1995;27: 1607-8.
15. Calliat-Zucman S, Legendre C, Suberbielle C, Bach JF, Kreis H. systemic chimerism in cadave-ric kidney allograft recipients. *Transplant Proc* 1995;27:153-4.
16. Ishida H, Kawai T, Tanabe K, Hayasaka Y, Ya-suo M, Toma H *et al*. Status of microchimerism in recipients 15 years after living related kidney transplantation. *Transplantation* 1996;62:126-8.
17. Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, Mckee R, Turck A, Eisenberg A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of geno-mic DNA from blood. *Nucl Acids Res* 1989; 17:8390.
18. Ross DW. Tools of recombinant DNA technolo-gy. In: Ross DW. Introduction to molecular medi-cine. New York, Springer-Verlag, Inc, 1992.p.29.
19. Olerup O, Zetterquism H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific pri-mers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice inclu-ding donor-recipient matching in cadaveric trans-plantation. *Tissue Antigens* 1992;39:225-35.
20. Brennan DC, Mohanakumar T, Flye MW. Donor-specific transfusion and donor bone marrow infu-sion in renal transplantation tolerance: a review of efficacy and mechanisms. *Am J Kid Dis* 1995; 26:701-15.
21. Garnier JL, Touraine JL, Gebuhrer L. No detec-table microchimerism in long-term tolerant reci-pients of living-donor kidneys. *Transplant Proc* 1997;29:1181.
22. Sakurada M, Okazaki H, Sato T, Miura S, Amada N, Ohkohchi N *et al*. Peripheral blood chimerism in renal allograft recipients transfused with do-nor-specific blood. *Transplant Proc* 1997; 29:1187-8.

Endereço para correspondência:

Wilma Carvalho Neves Forte

Rua Manacá, 407 – Residence Park

Granja Viana

Tel: (011) 4922542 Fax: (011) 2223062CEP 06700-000 Cotia – SP

Análise estatística

Os resultados serão apresentados sob a forma de média e desvio padrão da média, e foram comparados por meio do Teste "t" de Student.

O teste exato de Fisher foi utilizado para as as-sociações entre o microquimerismo e os protocolos de transfusões sanguíneas administradas no pré-transplante renal aos pacientes em tratamento hemodialítico ou transplantados renais.

O nível das significâncias para as comparações e correlações foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).



[\[Home Page SBAI\]](#) [\[Índice Geral\]](#) [\[Índice do Fascículo\]](#)

A Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia é publicação oficial da Sociedade Brasileira de Alergia e Imunopatologia.
Copyright 1998 - SBAI - Av. Prof. Ascendino Reis, 455 - São Paulo - SP - Brasil - CEP: 04027-000