

JOSE DE RIBAMAR OLIVEIRA LIMA

PERFIL DA CISTATINA C, INTERLEUCINA 2, INTERLEUCINA 6  
E FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM RECEPTORES DE  
TRANSPLANTE RENAL

BRASÍLIA

2011

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JOSÉ DE RIBAMAR OLIVEIRA LIMA

PERFIL DA CISTATINA C, INTERLEUCINA 2, INTERLEUCINA 6 E FATOR DE  
NECROSE TUMORAL ALFA EM RECEPTORES DE TRANSPLANTE RENAL

Tese apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde  
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Francisco de Assis Rocha Neves

BRASÍLIA

2011

Lima, José de Ribamar Oliveira Lima.

Perfil da cistatina C, interleucina 2, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa em receptores de transplante renal. / José de Ribamar Oliveira Lima. ---- Brasília, 2011.

114: il.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Francisco de Assis Rocha Neves.

Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2011.

1. Transplante renal. 2. Marcadores – cistatina C – Interleucinas. I. Neves, Francisco de Assis Rocha. II. Título.

CDU: 616-089.843.61

JOSÉ DE RIBAMAR OLIVEIRA LIMA

PERFIL DA CISTATINA C, INTERLEUCINA 2, INTERLEUCINA 6 E FATOR DE  
NECROSE TUMORAL ALFA EM RECEPTORES DE TRANSPLANTE RENAL

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do  
título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 20 / 05/ 2011

BANCA EXAMINADORA

Francisco de Assis Rocha Neves – (Presidente)

Universidade de Brasília

Natalino Salgado Filho

Universidade Federal do Maranhão

Alcione Miranda dos Santos

Universidade Federal do Maranhão

Valdir Filgueiras Pessoa

Universidade de Brasília

Adriana Lofrano Alves Porto

Universidade de Brasília

Angélica Amorim Amato

Universidade de Brasília

Monalisa Ferreira Azevedo

Universidade de Brasília

*A Deus, por toda inspiração e sabedoria concedida.*

*À minha esposa Ana Cleyde, e aos meus filhos Marina, Márcio e Maysa, bençãos de Deus na minha vida, que com amor, carinho e compreensão, deram o incentivo necessário para a realização deste trabalho*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Francisco de Assis Rocha Neves, pela disponibilidade e colaboração na orientação deste trabalho.

Ao Dr. Natalino Salgado Filho, pelos ensinamentos, colaboração e amizade, toda a minha gratidão e admiração, pelo exemplo de seriedade, competência e dedicação com que conduz suas atividades, demonstrando grande amor por aquilo que realiza, socializando o conhecimento adquirido que se traduz em benefícios ao bem comum.

A Dra. Teresa Cristina Alves Ferreira e Dra. Maria Inês Gomes de Oliveira, pela colaboração, paciência e pela atenção dispensada durante a elaboração, desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Um especial agradecimento à Dra. Alcione Miranda Santos, pelo incentivo, disponibilidade e competência na transmissão dos conhecimentos sobre estatística e que muito ajudaram para a conclusão desse trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário, que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado, em especial ao Dr. Maurício Coelho Meireles, Dr. João Vítor Leal Salgado, Dra. Hilma Alencar de Souto, Dr. Antonio Moraes Fernandes.

Aos professores Dra. Maria Clotilde Henriques Tavares, Dr. Carlos Alberto Bezerra Tomaz, Dr. Pedro Sadi Monteiro, Dra. Diana Lúcia Moura Pinho, Dr. Valdir Filgueiras Pessoa e Dr. Edgardo Alvarez, pelos exemplos de dedicação, incentivo e entusiasmo com que se empenham para a valorização e desenvolvimento da pesquisa científica e pela competência em transferir conhecimentos.

Aos pacientes que participaram desse trabalho, pela disponibilidade em colaborar, dando exemplos de esperança e de coragem, durante o transcurso do estudo.

Aos colegas de turma Bernadete Salgado, Humberto Serra, José Márcio, João Vítor, Lídia Saldanha, Nair Portela, Nila Conceição, Sílvia Leite e Socorro Bispo, pelo convívio, solidariedade e amizade compartilhada todo esse tempo.

Aos amigos e irmãos da Renovação Carismática Católica que intercederam por mim em oração ao Pai Celeste e com palavras de confiança, me motivaram e fortaleceram para o término deste trabalho.

A todos o meu profundo agradecimento.

*“A sabedoria distribui a ciência e a prudente inteligência; eleva à glória aqueles que a possuem. O temor ao Senhor é a raiz da sabedoria, seus ramos são de longa duração.”*

*ECLESIÁSTICO 1,24-25*



## RESUMO

O transplante renal é a melhor opção terapêutica e de reabilitação para pacientes com Doença Renal Crônica em estágio terminal. O aumento da sobrevida do enxerto tem sido um desafio constante, existindo a necessidade de um monitoramento contínuo para que precocemente seja detectada uma disfunção do enxerto e tomada de decisões, evitando a rejeição. Evidências sugerem que a inflamação persistente e o estresse oxidativo começam precocemente no processo de queda da função renal, apontando o valor potencial dos marcadores inflamatórios em pacientes transplantados renais como preditor de disfunção do enxerto. Com o objetivo de investigar o perfil da cistatina C (CysC), interleucina 2 (IL-2), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) em receptores de transplante renal, analisou-se no período do pré transplante, com 30 e 180 dias do pós transplante através do método imunonefelométrico, a CysC sérica e através dos ensaios imuno enzimáticos humanos, os níveis séricos de IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$  em 23 pacientes que realizaram transplante renal com faixa etária compreendida entre 18 e 60 anos, transplantados com rim de doador vivo e que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. 19 pacientes foram submetidos ao esquema de imunossupressão compreendendo inibidor de calcineurina (INC) (Tacrolimus), Micofenolato de Mofetil e Prednisona e 04 pacientes ao esquema INC (Ciclosporina), Azatioprina e Prednisona. 08 pacientes receberam indução, sendo 6 com anticorpo monoclonal (Basiliximab) e 2 com anticorpo policlonal (Timoglobulina), e 15 não receberam indução. A média de idade dos pacientes foi de 34,3 anos ( $\pm$  11,7), havendo predominância do sexo feminino (52%) e da etnia negra (61%). Na internação, as médias de peso, peso seco, altura, pressão diastólica e sistólica, hemoglobina, albumina, fósforo e creatinina encontradas foram de 55,2Kg ( $\pm$  14,0), 54,7Kg ( $\pm$ 13,3), 158 cm ( $\pm$  0,1), 133 mmHg ( $\pm$ 21,6), 88 mmHg ( $\pm$ 15,6), 11,7 g/dL ( $\pm$ 1,9), 4,1 mg/dL ( $\pm$ 0,5), 6,2 mg/dL ( $\pm$ 1,7) e 8,9 mg/dL ( $\pm$ 4,1) respectivamente, havendo um predomínio de doenças não glomerulares como doença de base. Quando comparados entre si, nos diferentes tempos de coleta, a CysC e creatinina (Cr) apresentaram diferença significativa entre a internação e com 30 dias do pós-transplante ( $p < 0,0001$ ) e entre a internação e com 180 dias do pós-Transplante ( $p < 0,0001$ ), a IL-2 com 30 e 180 dias do pós-transplante ( $p = 0,0418$ ) e TNF- $\alpha$  na internação e com 30 dias do pós-

transplante ( $p=0,0001$ ). Observou-se uma correlação negativa estatisticamente significativa da CysC com TNF- $\alpha$  na internação e IL-6 com 180 dias do pós-transplante. Quando comparados os pacientes biopsiados e não biopsiados, a Cr e a CysC apresentaram diferença estatisticamente significativa nos pacientes biopsiados com 30 e 180 dias do pós-transplante. Esses resultados indicam que não existe correlação significativa entre os níveis séricos de CysC, IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$  em um seguimento a curto prazo de receptores de transplantados renais. Nos pacientes submetidos à biópsia e não biopsiados, os níveis de CysC foram muito similares aos níveis de creatinina, ao contrário da IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$ , sendo necessário a realização de novos estudos para avaliação do perfil destes marcadores a longo prazo.

Palavras-chave: cistatina C; interleucinas; marcadores; transplante renal.

## ABSTRACT

Kidney transplantation is the best therapeutic and rehabilitation option for patients with end-stage chronic kidney disease. The increase of graft survival rate has been a constant challenge. It is necessary a continuous monitoring in order to detect as soon as possible a graft dysfunction and so that the implementation of a decision for preventing graft rejection. Evidences suggest that persistent inflammation and oxidative stress begin early in the process of a failing kidney function, indicating the potential importance of inflammatory markers in kidney transplant patients as a predictor of graft dysfunction. We aimed to investigate the profile of cystatin C (CysC), interleukin 2 (IL-2), interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in kidney transplant recipients. We performed the analyses before transplantation and within 30 and 180 days after transplantation. For the serum CysC we used the immunonephelometric assay, and for IL-2, IL-6 and TNF- $\alpha$ , the human enzyme immunoassay. We investigated 23 patients whose ages were between 18 and 60 years and who underwent living donor kidney transplantation. All patients signed a consent form. 19 patients underwent immunosuppressive regimen consisting of calcineurin inhibitor (CNI) (tacrolimus), mycophenolate mofetil and prednisone. Other 04 patients received CNI (cyclosporin), azathioprine and prednisone. 08 patients received induction therapy, with 6 of them, with monoclonal antibody (Basiliximab) and 2 with polyclonal antibody (Thymoglobulin). 15 did not receive induction. The patient's average age was 34.3 years ( $\pm$  11.7), with more females (52%) and black ethnicity (61%). The weight, dry weight, height, systolic and diastolic blood pressure, hemoglobin, albumin, creatinine and phosphorus averages, at admission to the hospital, were 55.2 kg ( $\pm$  14.0), 54.7 kg ( $\pm$  13.3), 158 cm ( $\pm$  0.1), 133 mmHg ( $\pm$  21.6), 88 mmHg ( $\pm$  15.6), 11.7 g / dL ( $\pm$  1.9), 4.1 mg / dL ( $\pm$  0.5) , 6.2 mg / dL ( $\pm$  1.7) and 8.9 mg / dL ( $\pm$  4.1) respectively. The non-glomerular diseases were more prevalent as underlying disease. When compared each other at different times of collection, CysC and creatinine (Cr) showed a significant difference ( $p$  <0.0001) between admission and 30 days after transplantation and between admission and 180 days after transplantation ( $p$  <0.0001); IL-2, between 30 and 180 days after transplantation ( $p$  = 0.0418) and TNF- $\alpha$  between admission and 30 days after transplantation ( $p$  = 0.0001). A statistically significant negative correlation of CysC with TNF- $\alpha$  at

admission, and IL-6 within 180 days after transplantation was observed. When comparing patients who underwent biopsy and those who did not, the Cr and CysC had a statistically significant difference in patients biopsied between 30 and 180 days post-transplantation. These results indicate that there is no significant correlation between serum CysC, IL-2, IL-6 and TNF- $\alpha$  in a short-term follow-up of renal transplant recipients. In patients who underwent biopsy and those who did not, the levels of CysC and creatinine were very similar, unlike IL-2, IL-6 and TNF- $\alpha$ . It is necessary to perform new studies to evaluate the profile of these markers on long term.

Keywords: cystatin C, interleukins, markers; kidney transplantation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Rejeição do enxerto mediada primariamente por células T. ....	29
Figura 2 – Rejeição hiperaguda do enxerto. ....	32
Figura 3 – Teste de correlação de Spearman entre TNF- $\alpha$ e a Cistatina C no momento da internação e Interleucina 6 e Cistatina C seis meses do pós-transplante .....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características demográficas e clínicas da população estudada (n=23) no momento da internação. São Luis, MA, 2008.....	54
Tabela 2 – Coeficiente de correlação de Spearman dos biomarcadores com a idade nos diferentes momentos de coleta. São Luis, MA, 2008. ....	54
Tabela 3 – Coeficiente de correlação de Spearman dos biomarcadores com parâmetros clínicos. São Luís, MA, 2008 .....	55
Tabela 4 – Médias e desvios padrão dos biomarcadores nos diferentes momentos de coleta. São Luis, MA, 2008.....	55
Tabela 5 – Coeficiente de correlação de Spearman dos biomarcadores com cistatina C nos diferentes momentos de coleta. São Luis, MA, 2008 .....	56
Tabela 6 – Coeficiente de correlação de Spearman dos biomarcadores com creatinina nos diferentes momentos de coleta. São Luis, MA, 2008.....	57
Tabela 7 – Médias e desvios padrão dos marcadores no momento da internação para o transplante em pacientes biopsiados e não biopsiados após o transplante renal. São Luis, MA, 2008 .....	57
Tabela 8 – Médias e desvios padrão dos marcadores 30 dias após o transplante em pacientes biopsiados e não biopsiados. São Luis, MA, 2008.....	58
Tabela 9 – Médias e desvios padrão dos marcadores em 180 dias após o transplante em pacientes biopsiados e não biopsiados. São Luis, MA, 2008 .....	58
Tabela 10 – Médias e desvios padrão dos marcadores no momento da internação para o transplante em pacientes que receberam indução e os que não receberam após o transplante renal. São Luis, MA, 2008.....	59
Tabela 11 – Médias e desvios padrão dos marcadores 30 dias após o transplante em pacientes que receberam indução e os que não receberam. São Luis, MA, 2008 .....	59
Tabela 12 – Médias e desvios padrão dos marcadores 180 dias após o transplante em pacientes que receberam indução e os que não receberam. São Luis, MA, 2008 .....	59
Tabela 13 – Médias e desvios padrão dos marcadores com 180 dias após o transplante em pacientes com creatinina $\leq 1,5$ mg/dL e $> 1,5$ mg/dL. São Luis, MA, 2008 .....	60

Tabela 14 – Médias e desvios padrão dos marcadores com 180 dias após o transplante em pacientes com Cistatina C $\leq 0,95$ mg/dL e $> 0,95$ . São Luis, MA, 2008 ...	60
Tabela 15 – Coeficiente de correlação de Spearman entre os biomarcadores IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$ nos diferentes tempos da coleta. São Luis, MA, 2008. ....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP - Alanina aminopeptidase  
AP - Alkaline phosphatase  
APC - Antigen presenting cell  
CPH - Complexo principal de histocompatibilidade  
CYR61 - Cysteine rich protein 61  
CYST C - Cistatina C  
DPP - Dipeptidyl peptidase IV  
DRC - Doença renal crônica  
DAC - Doença arterial coronariana  
DCE - Disfunção crônica do enxerto  
EROs - Espécies reativas de oxigênio  
BSF-2 - Fator 2 estimulatório de células B  
BCDF- Fator de diferenciação de células B  
FG - Filtração glomerular  
HLA - Antígeno leucocitário humano  
FK-506 - Tacrolimus  
GAMA-GTP - Gama glutamyl transpeptidase  
ICAM-1 - Intercellular adhesion molecule-1  
IF/TA - Fibrose intersticial/atrofia tubular  
IL-1 - Interleucina 1  
IL-1b - Interleucina 1b  
IL-2 - Interleucina 2  
IL-2R - Receptores de IL-2  
IL-4 - Interleucina 4  
IL-5 - Interleucina 5  
IL-6 - Interleucina 6  
IL-8 - Interleucina 8  
IL-10 - Interleucina 10  
IL-18 - Interleucina 18  
INF $\gamma$  - Interféron gama  
IFN -  $\beta_2$  - Interferon- $\beta_2$



INC - Inibidores da calcineurina  
KDOQI - Kidney Disease Outcomes Quality Initiative  
KIM -1 - Kidney injury molecule 1  
LAK - Lymphokine-activated killer  
MDA - Malondialdeído urinário  
MDRD - Modification of Diet in Renal Disease  
MMF - Micofenolato de Mofetil  
MHC - Complexo de histocompatibilidade principal  
NEP - Neutral endopeptidase  
NF-AT - Nuclear factor of activated T cell  
NF- $\kappa$ B - Nuclear factor kappa B  
N-GAL - Neutrophil gelatinase associated lipocalin  
NHE3 - Sodium/hydrogen exchanger isoform 3  
NKF - National Kidney Foundation  
NK - Natural killer  
PCR - Proteína C reativa  
PENIA - Particle enhanced nephelometric immunoassay  
PETIA - Particle enhanced turbidimetric immunoassays  
PGE<sub>2</sub> - Prostaglandina E<sub>2</sub>  
PPM - Partes por milhão  
RA - Rejeição aguda  
RANTES - Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted  
RBP - Proteína ligada ao retinol  
SSAT - Spermidine/Spermine N(1)-acetyltransferase  
TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa  
TNF- $\beta$  - Fator de necrose tumoral beta  
TCR - Receptor da célula  
TR - Transplante renal  
TRS - Terapia renal substitutiva  
kDa - Kilodalton

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	24
2.1 Histórico do tratamento dialítico e transplante renal .....	24
2.2 Transplante renal e rejeição do enxerto .....	26
2.2.1 A rejeição dos enxertos é uma resposta imunológica mediada primariamente por células T .....	27
2.2.2 Rejeição do enxerto e citocinas.....	33
2.2.2.1. Interleucina 2.....	36
2.2.2.2. Interleucina 6.....	37
2.2.2.3. Interferon gama.....	38
2.2.2.4. Fator de Necrose Tumoral Alfa .....	38
2.2.2.5. Fator de Necrose Tumoral Beta .....	39
2.3 BIOMARCADORES .....	40
2.3.1 BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS .....	41
2.4 CISTATINA C .....	45
3. OBJETIVOS .....	48
3.1 Objetivo Geral .....	48
3.2 Objetivos Específicos.....	49
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1 Tipo e período do estudo .....	49
4.2 População em estudo .....	49
4.3 Amostra em estudo .....	50
4.4 Coleta de dados .....	50
4.5 Processamento e análise bioquímica das amostras .....	51
4.6 Análise estatística .....	52
4.7 Aspectos Éticos.....	53

5. RESULTADOS.....	53
6. DISCUSSÃO .....	61
7. CONCLUSÃO.....	70
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	77
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO .....	79
ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA BRASÍLIA MÉDICA:.....	80
ANEXO C – APROVAÇÃO DE ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA.....	99
ANEXO D – ARTIGO APROVADO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA.....	100

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o transplante renal tornou-se um procedimento rotineiro para o tratamento dos pacientes com Doença Renal Crônica (DRC) em estágio terminal, oferecendo-lhes maior qualidade de vida e prolongando significativamente a expectativa de vida quando comparada àquela do paciente mantido cronicamente em diálise (1;2).

O transplante renal é o tratamento de escolha no que se refere à sobrevida destes pacientes. Com o advento de novos fármacos imunossupressores, os índices de rejeição aguda diminuíram significativamente, embora o impacto na meia-vida dos enxertos tenha sido menos importante (1;3).

A expansão dos conhecimentos e o surgimento de novas técnicas em biologia celular e molecular vêm revolucionando o entendimento da fisiopatogenia de diversas condições associadas com disfunção dos enxertos, possibilitando diagnósticos mais precisos e precoces. Estas técnicas, aplicadas no estudo da rejeição subclínica, rejeição aguda e crônica, têm contribuído na elucidação de seus mecanismos imunológicos (1).

A rejeição aguda (RA) e a disfunção crônica do enxerto (DCE) são entre outras, importantes causas de perda de enxertos. A RA quando associada à disfunção inicial do enxerto é um fator de impacto negativo na sobrevida tardia. A DCE tem terapêutica inespecífica em virtude de sua etiologia multifatorial, e evitar ou retardar a sua progressão pela prevenção ou com diagnóstico precoce, assume importância primordial no manejo do paciente transplantado renal. Agentes imunossupressores químicos e biológicos utilizados de forma combinadas em protocolos de imunossupressão são usados com o objetivo de minimizar o fenômeno da rejeição do enxerto. Essas drogas, por meio de mecanismos moleculares complexos visam modificar a resposta imunológica de forma a “aceitar” ou “ignorar” o órgão transplantado (1;2).

Atualmente a monitorização dos enxertos renais é feita pela medida de sua função, determinando-se rotineiramente a creatinina sanguínea, cujas variações não

são específicas para a rejeição, e pela biópsia renal, um procedimento invasivo com potencial de morbidade, caro e sujeito a erro de amostragem, uma vez que os processos inflamatórios podem ser focais e que na biópsia examina-se um pequeno fragmento renal. Desta forma, a identificação de moléculas por métodos não invasivos, sensíveis, úteis na prática clínica, os chamados biomarcadores, tem sido objeto de extensos estudos por vários grupos de pesquisadores (1).

A terapia renal de substituição da função renal, diálise ou transplante renal deveria ser considerada a alternativa mais provável para um paciente portador de DRC que apresenta falência funcional renal, contudo não é. Na verdade, os pacientes com DRC têm mais chance de óbito por causas cardiovasculares ao longo da progressão de suas doenças do que de iniciar a diálise ou de ser submetidos a transplante renal. Além do mais, a DRC é considerada atualmente o principal fator de risco de morbimortalidade cardiovascular, o que torna a sua identificação precoce importante não só para os nefrologistas, mas também para os clínicos em geral (cardiologistas, endocrinologistas, médicos de atenção primária) (4).

O diagnóstico da DRC, particularmente nos seus estágios iniciais, quando ela é freqüentemente assintomática, ficou enormemente facilitado com a adoção, em todo o mundo, da definição da doença introduzida pelo Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) da National Kidney Foundation americana (NKF). Por definição, é portador de DRC todo indivíduo que apresentar: 1. Filtração glomerular (FG)  $<60\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ ; 2.  $\text{FG} >60\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$  e pelo menos um marcador de lesão do parênquima renal (p. ex., proteinúria) e 3. Cronicidade das alterações, ou seja, que elas estejam presentes por um período  $\geq 3$  meses. Adicionalmente, o grupo de trabalho do KDOQI propôs estagiar a DRC baseado na FG ( $\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ ): estágio 1 ( $\text{FG} \geq 90$ ), estágio 2 (60-89), estágio 3 (30- 59), 4 (15-29) e estágio 5 ( $<15$ , estando ou não o paciente em diálise). Um aspecto importante na identificação da DRC é decidir quem rastrear (4).

No Brasil, a prevalência de pacientes mantidos em programa crônico de diálise mais que dobrou nos últimos oito anos. A incidência de novos pacientes cresce cerca de 8% ao ano e estima-se que existam cerca de 1,2 milhões de brasileiros com DRC. Apesar dos avanços nos métodos dialíticos e no transplante renal, a mortalidade na

DRC permanece elevada, principalmente em sua fase terminal, estando associada a eventos cardiovasculares na maioria dos pacientes (5).

Diversos trabalhos têm destacado o papel central que o processo inflamatório crônico presente na hemodiálise desempenha na aterosclerose acelerada e na mortalidade cardiovascular. Além disso, a inflamação na diálise participa, direta ou indiretamente, da fisiopatologia da desnutrição, da calcificação vascular e da síndrome da anemia cardiorenal, apresentando grande impacto na sobrevida dos pacientes. A causa da inflamação na diálise é multifatorial, porém já está bem demonstrado que a PCR apresenta forte correlação com hipoalbuminemia, anemia, desnutrição e mortalidade, sendo atualmente considerado, além de marcador, um importante mediador inflamatório relacionado à disfunção/ativação endotelial e à patogênese da aterosclerose (6).

Evidências sugerem que a inflamação persistente e o estresse oxidativo (desequilíbrio entre a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante total do organismo) começa precocemente no processo de queda da função renal. Estudos recentes demonstram que a doença renal é associada com uma pequena elevação de proteína C reativa (PCR), mesmo entre os pacientes com doença renal moderada. Os leucócitos polimorfonucleares parecem ser um mediador chave do baixo grau de inflamação e estresse oxidativo em doença cardiovascular leve. Porque os marcadores inflamatórios e pró-trombóticos predizem mudanças na função renal, intervenções que reduzam a inflamação têm sido sugeridas para conferir benefício não só da doença cardiovascular, mas também renal. Nos pacientes com doença renal em estágio final a elevação mediana dos níveis de PCR tem sido documentada tanto perto do início da diálise, como em pacientes que receberam diálise (7).

O transplante renal deve ser visto como um processo indutor de intensa reação inflamatória, onde um órgão proveniente do doador, repleto de antígenos imunogênicos, é apresentado ao complexo sistema imune do receptor. Em consequência é esperado que as citocinas e quimiocinas tenham papel importante na mediação desse processo. Várias quimiocinas e citocinas têm sido pesquisadas no sangue e no tecido renal de transplantados renais. Algumas dessas substâncias têm

sido relacionadas com fibrose intersticial/atrofia tubular (IF/TA), rejeição aguda (RA), presença de dislipedemia e infecções (8)

Tem existido interesse recente no valor potencial de marcadores inflamatórios no pré transplante como preditor de rejeição aguda e perda do enxerto em pacientes transplantados renais adultos. O marcador de inflamação mais amplamente estudado é a PCR, uma proteína reagente de fase aguda sintetizada pelo fígado em resposta a interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1b (IL-1b). Portanto, alto nível de PCR é reflexo de um estado inflamatório. Além do mais, PCR também tem efeitos pró inflamatórios próprios como complemento de ativação e estimulação da atividade de células natural killer. Embora a meia vida da PCR seja somente de 4 a 6 horas, uma alta concordância nos níveis durante longos períodos de tempo (>6 meses) tem sido demonstrada. Além disso, PCR é medida facilmente no soro e os níveis aumentam até 1000 vezes com inflamação (9).

A identificação de novos biomarcadores que possam detectar precocemente um comprometimento da função renal tem sido um grande desafio para a comunidade científica nos dias atuais, ao mesmo tempo em que também instiga a busca incessante de respostas promissoras para que em tempo hábil sejam tomadas medidas de proteção do rim.

A busca de um biomarcador não invasivo que possa auxiliar na estimativa de risco de rejeição ainda no pré transplante, bem como um biomarcador que possa preceder o início da rejeição aguda e a nefropatia crônica do enxerto, indicando paciente em risco ou a atravessar um episódio de rejeição, pode ser uma valiosa contribuição do monitoramento ao paciente em curso.

As investigações em causas de perda de transplantes de rim tem apontado os mecanismos imunológicos mediados por células e anticorpos, como uma ameaça grave para o transplante renal, podendo acontecer a rejeição do rim transplantado em diferentes pontos do tempo do pós transplante através da apresentação de aloantígenos diferentes e de mecanismos imunes.

Para o sucesso do transplante de órgãos é extremamente necessário um adequado controle do enxerto, devendo-se dar especial atenção à compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos nesta modalidade de terapia substitutiva, pois na maioria dos casos as respostas imunes adaptativas aos órgãos enxertados são o principal impedimento ao transplante bem sucedido.

Neste cenário, a investigação deve estar centrada na busca de exames laboratoriais preditivos que possam ser úteis na identificação de pacientes com alto risco de rejeição do enxerto. Buscando ampliar os conhecimentos sobre as características e comportamento fisiológico da cistatina C, interleucina 2, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa em três momentos distintos: no pré transplante, com um mês e seis meses do pós transplante, este estudo se propõe ao aprofundamento no conhecimento destes biomarcadores, como potenciais indicadores precoces nas alterações que possam ocorrer nestes pacientes.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Histórico do tratamento dialítico e transplante renal**

Em 23 de dezembro de 1954, um rim foi transplantado intervivos entre dois irmãos gêmeos, de um gêmeo saudável para um que estava com doença renal. A cirurgia foi realizada no hospital Peter Bent Brigham, em Boston, e John Merrill, Joseph Murray e Hartwel Harrison lideraram a equipe clínica. A operação foi bem sucedida, a função renal foi restaurada no receptor (embora ele pudesse mais tarde ter ambos os rins próprios removidos a fim de controlar a hipertensão), e o doador não sofria efeitos de doença. Este foi o primeiro bem sucedido transplante realizado mediante uma experiência de falência. Por esta razão, isto gerou enorme estímulo, tanto nos meios de comunicação como entre os médicos, em um tempo quando os pioneiros de transplantes renais foram desanimados sobre a possibilidade de alguma aplicação clínica real (10).

Este transplante bem sucedido ocorreu cerca de 50 anos depois que Emerich Ullmann realizou a primeira experiência de transplante de rim entre cachorros em Viena em 1902. Uns poucos anos mais tarde, em 1906, Mathieu Jaboulay, professor



de cirurgia em Lyon, França, conectou uma artéria renal de uma ovelha e um rim de porco, respectivamente, para a artéria braquial de dois pacientes que estavam morrendo de falência renal. Nenhum rim funcionou, mas estes foram os primeiros transplantes com enxertos estranhos, que tinham sido realizados em humanos. A técnica usada para anastomosar os vasos foi a desenvolvida e descrita por Alexis Carrel, que era um jovem cirurgião da unidade Jaboulay's e de fato a técnica de anastomose descrita por Carrel, é ainda utilizada até hoje, para os transplantes renais. Carrel disse que os transplantes estariam resolvidos quando se desenvolvessem mecanismos de prevenção de rejeição de tecidos estranhos. Existiu uma séria atenção clínica por um cirurgião russo Yu Yu Voronoy, que transplantou seis rins de cadáveres, para seis receptores humanos, mas sem sucesso (10).

A era moderna de transplante começou em Paris e Boston, após a segunda guerra mundial, com destaque para o pós guerra, com uma pequena série de transplantes renais de falecidos realizados por David Hume em Boston (10).

O transplante renal tem sido realizado no Brasil desde 1964, e o primeiro programa regular de transplante de rim iniciou em 1965 na Universidade de São Paulo. Existem 160 centros de transplante no Brasil, 111 dos quais realizam transplantes de rim. O número total de transplante renal tem aumentado continuamente desde 1970, alcançando aproximadamente 3.400 por ano. Expressado como uma proporção da população total, o número de transplante renal chega a aproximadamente 22 ppm, duas vezes a média da América Latina (11).

Embora os transplantes envolvendo doadores vivos fossem esmagadoramente predominantes em 1970 e 1980, o uso de doadores falecidos tem aumentado desde o começo de 1990, chegando aproximadamente à metade do total em 2001. Isto reflete a melhor obtenção de órgão, aumentando a qualificação das equipes de transplante, o uso de melhores técnicas de conservação, e nos últimos cinco anos, a organização de lista de espera para órgãos compartilhados. O governo brasileiro paga aproximadamente dez mil dólares por transplante renal, incluindo honorários médicos. O Ministério da Saúde também financia a terapia tripla padrão (ciclosporina, azatioprina e esteróides). Mais recentemente muitos centros de transplantes

introduziram o Micofenolato de Mofetil (MMF) e o Tacrolimus (FK-506), com a garantia do governo, dentro de um protocolo de imunossupressão (11).

No Brasil houve um aumento expressivo no número de transplante de órgãos a partir de 1997, quando foi sancionada a Lei nº 9.434 de 04/02/1997. O maior conhecimento acerca dos antígenos de histocompatibilidade e regulação da resposta imune, bem como a introdução de drogas imunossupressoras potentes, representaram um marco para o sucesso dos transplantes (12).

## **2.2 Transplante renal e rejeição do enxerto**

O transplante renal deve ser indicado quando houver doença renal crônica terminal, contudo, existindo exceções a esta norma: 1- pacientes devem ser transplantados quando a creatinina sérica estiver em torno de 6 a 7 mg% (depuração de creatinina em torno de 10ml/min), para que não haja as complicações vasculares, cardíacas, oculares e neurológicas do diabetes, e 2- crianças com idade inferior a 10 anos, para se evitar prejuízo no crescimento, a osteodistrofia renal e principalmente as dificuldades dialíticas (13).

Contudo, pacientes após transplante de rim precisam de medicação imunossupressora permanente para evitar a rejeição do enxerto e perda do enxerto. O mecanismo de todas as atuais drogas imunossupressoras tem como alvo atingir a ativação de células T, produção de citocinas e expansão clonal. Ciclosporina e Tacrolimus inibem a atividade de fosfatase da calcineurina, suprimindo a produção de IL-2 e outras citocinas. O uso de drogas imunossupressoras requer um delicado equilíbrio entre uma adequada imunossupressão para prevenir rejeição e excessiva dosagem conduzindo a toxicidade (14).

Os inibidores de calcineurinas são eficazes na redução de episódios agudos e graves de RA, constituindo a terapia primária em transplante renal. Tanto a ciclosporina como o tacrolimus produz, porém, efeitos nefrotóxicos que podem comprometer o enxerto, levando à disfunção renal, hipertensão e hiperlipidemia. As manifestações de nefrotoxicidade podem ser agudas ou crônicas, funcionais e/ou estruturais. As alterações estruturais incluem diferentes lesões histológicas, e a

extensão do comprometimento renal pode não se relacionar com o nível sérico das drogas. Ao mesmo tempo, os dois inibidores produzem lesões idênticas, que ocorrem dentro do primeiro ano de vida do enxerto e que, clinicamente, são difíceis de serem diferenciadas de um episódio de RA. Dessa forma, a biópsia renal tem sido a melhor ferramenta diagnóstica da nefrotoxicidade induzida pelos inibidores da calcineurina (INC) e do diagnóstico diferencial desse processo com as diferentes alterações da rejeição aguda e/ou crônica. As alterações estruturais renais causadas pela toxicidade a INC incluem lesões em arteríolas, glomérulos, túbulos e intertício (15).

O Transplante renal é o tratamento de escolha para uma proporção significativa de pacientes em estágio final da doença renal terminal. O resultado em muitos desses pacientes, entretanto, é ainda limitado pela perda do enxerto ou morte com um transplante em funcionamento; por outro lado, a morte dos pacientes transplantados renais é, sobretudo causada por doenças cardiovasculares. A inflamação diretamente associada à aterosclerose pode influenciar tanto a perda do enxerto e a doença cardiovascular. Estudos têm mostrado que os marcadores de inflamação incluindo a PCR, TNF- $\alpha$  e IL-6 estão associados com a ocorrência de episódios de RA, contudo, eles nem sempre foram úteis na distinção entre rejeição e infecção ou dano tubular (16;17).

Múltiplos fatores de risco têm sido descritos no retardo da função do enxerto: fatores dependendo do doador, fatores dependendo do processo de extração – preservação – implantação e finalmente fatores que dependem do receptor. Esta última categoria inclui muitos fatores de risco: idade, re-transplante, níveis de anticorpos citotóxicos, compatibilidade-incompatibilidade do sistema HLA e tempo em diálise (17;18).

### **2.2.1 A rejeição dos enxertos é uma resposta imunológica mediada primariamente por células T**

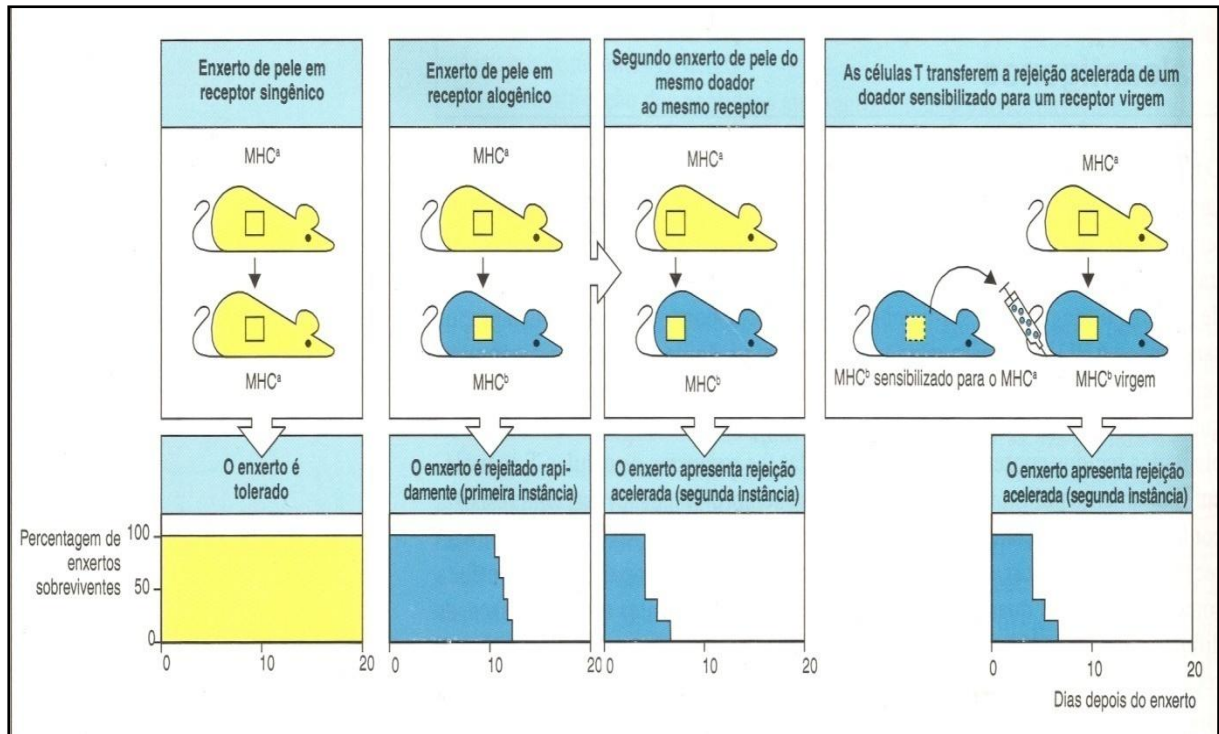
As regras básicas do enxerto de tecidos foram elucidadas pela primeira vez utilizando transplante de pele entre linhagens endocruzadas de camundongo (Figura

1). A pele pode ser enxertada com 100% de sucesso entre diferentes locais de um mesmo animal ou pessoa (**auto-enxerto**) ou entre animais ou pessoas geneticamente idênticas (**enxerto singênico**).

Porém quando a pele é enxertada entre dois indivíduos não aparentados ou alogênicos (**aloenxerto**), o enxerto é inicialmente aceito, mas então rejeitado 10-13 dias após. Isso é denominado **rejeição de primeira instância**, e é bastante consistente. Ela depende de uma resposta das células T do receptor, pois a pele enxertada no camundongo *nude*, que não possui células T, não é rejeitada. Pode-se restaurar a capacidade de rejeição da pele do camundongo *nude* por meio de transferência adotiva de células T normais (19).

Quando um receptor que já rejeitou um enxerto sofre novo enxerto com pele do mesmo doador, o segundo enxerto é rejeitado mais rapidamente (seis a oito dias) por uma **rejeição de segunda instância**. A pele de um terceiro doador enxertada ao mesmo tempo no mesmo receptor não demonstra essa resposta mais rápida, obedecendo à evolução da rejeição de primeira instância. O curso rápido da rejeição de segunda instância pode ser transferido a receptores normais ou irradiado por meio de transferência de células T do receptor inicial, demonstrando que a rejeição do enxerto é provocada por uma reação imunológica específica (19).

As respostas imunes são barreiras importantes contra a eficácia dos transplantes de tecidos, destruindo-os por meio de uma resposta imune adaptativa às suas proteínas estranhas. Essas respostas podem ser mediadas por células T CD8 citotóxicas, por células T<sub>H</sub>1 ou por ambas. Os anticorpos também contribuem para a rejeição de segunda instância dos enxertos de tecido (19).



JANEWAY et al.2000. Imunobiologia: O sistema imunológico na saúde e na doença

### Figura 1 – Rejeição do enxerto mediada primariamente por células T.

A rejeição do enxerto resulta de uma resposta anti-enxerto mediada por células T. Os enxertos singênicos são aceitos permanentemente (primeiro quadro), mas os enxertos com diferentes MHC são rejeitados entre 10-13 dias após (rejeição de primeira instância, segundo quadro). Quando um camundongo recebe um enxerto pela segunda vez com a pele do mesmo doador, rejeita-o mais rapidamente (terceiro quadro). Isso é denominado “rejeição de segunda instância”, e a resposta acelerada é MHC-específica; a pele de um segundo doador do mesmo tipo de MHC é rejeitada com a mesma velocidade, mas a pele de um doador com MHC diferente é rejeitada em um padrão de primeira instância (não mostrado). O camundongo virgem que recebe células T de um doador sensibilizado comporta-se como se já tivesse sido enxertado (quadro final).

Grande número de atualizações são, periodicamente, introduzidas na prática do transplante renal. Novos regimes imunossupressores e critérios utilizados para a seleção de doadores e receptores estão entre as mais relevantes modificações introduzidas nos últimos anos, justificando-se amplamente análises periódicas dos resultados (3).

No entanto, a rejeição ao rim transplantado ainda ocorre e a monitoração pós-transplante apresenta dificuldades. A rejeição aguda consiste em um processo inflamatório agudo, resultante do reconhecimento direto de aloantígeno (antígenos do complexo de histocompatibilidade principal - MHC) do enxerto pelas células T do receptor e constitui a maior causa de complicação nos primeiros três meses, podendo

ocorrer até seis meses após o transplante. Nesse processo ocorre infiltração do rim transplantado por células imunológicas ativadas, além de uma complexa interação entre as citocinas produzidas. Essas interações resultam na proliferação de células imunocompetentes e amplificação da resposta imune, causando efeito tóxico aos tecidos do enxerto. A estimulação do sistema imune resulta na indução da secreção de proteínas de fase aguda. Dentre essas, destaca-se a PCR, secretada pelos hepatócitos após estimulação pela IL-6 (12;20).

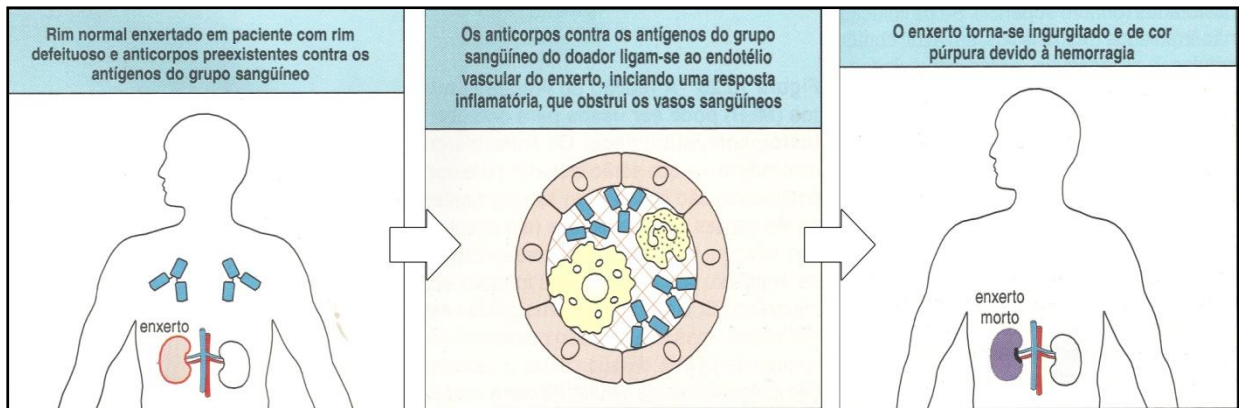
O reconhecimento do antígeno de histocompatibilidade (aloantígeno) do doador pelos linfócitos T do receptor ocorre em algum órgão linfóide secundário, onde células apresentadoras de antígeno estimulam e ativam linfócitos T, que entram em expansão clonal e migram para o enxerto onde irão exercer sua função efetora. Após a estimulação dos linfócitos pela interação receptor da célula T (TCR)/Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) e moléculas de adesão/co-estimulação, os complexos TCR/CD3 e CD4 ou CD8 tornam-se fisicamente associados e ativam várias enzimas intracelulares denominadas tirosino-quinases, que elevam a concentração de cálcio intracelular e ativam várias proteínas citoplasmáticas regulatórias (fatores de transcrição). Entre esses fatores de transcrição destacam-se nuclear factor kappa (NF- $\kappa$ B), Oct-1 e NFAT (nuclear factor of activated T cells), que se ligam a regiões regulatórias dos genes de várias citocinas como a IL-2, IL-4, g-interferon e TNF- $\alpha$ . A ativação da imunidade celular, seguida de resposta do tipo hipersensibilidade tardia com a ativação de macrófagos/monócitos e linfócitos citotóxicos parece ser o mecanismo final da agressão celular ao enxerto (1;21).

Os linfócitos T CD8+ ou citotóxicos são responsáveis pelo reconhecimento e destruição das células-alvo. Os mediadores citolíticos descritos são a perforina e as granzimas, que ficam estocadas no citoplasma desses linfócitos, em grânulos semelhantes aos lisossomos e, quando as células são ativadas, migram para a membrana citoplasmática, fundem-se a ela e liberam os grânulos na direção da célula-alvo. Em decorrência do ataque citolítico, a célula-alvo pode morrer por necrose (caracterizada por ruptura da membrana citoplasmática e destruição das organelas) ou apoptose (caracterizada por condensação da cromatina, fragmentação do DNA e bolhas de membrana com citoplasma condensado). Outra via de ataque

citotóxico utilizada pelas células T CD8+ é a indução de morte celular via interação Fas/Fas ligante, que leva a apoptose das células-alvo (1;21).

A ativação de linfócitos B também está presente na rejeição aguda. Quando predominante, ou significativa, ela está associada a acometimento vascular (vasculites) e depósitos de imunoglobulinas ou ativação da cascata do complemento (depósito de C4d), caracterizando a rejeição humoral que tem prognóstico mais reservado. A apresentação clínica da rejeição aguda depende substancialmente da “quantidade” de imunossupressão a qual o paciente está submetido, ou seja, regimes imunossupressores mais potentes em geral não se acompanham dos sinais e sintomas outrora característicos, tais como dor e aumento de volume do enxerto, febre e diminuição da diurese. Assim, o diagnóstico da rejeição aguda baseia-se no quadro clínico, em exames laboratoriais e de imagem, mas fundamentalmente na demonstração de processo inflamatório agressivo intra-enxerto demonstrável por análise histopatológica ou citopatológica em fragmentos de biópsia renal de fragmento ou citologia aspirativa, respectivamente (1;22).

As respostas de anticorpos também são uma causa potencial importante de rejeição de enxerto. Os aloanticorpos preexistentes a antígenos de grupo sanguíneo e antígenos MHC polimórficos podem causar a rejeição aguda de órgãos transplantados em uma reação dependente de complemento que pode ocorrer em minutos. Isto é conhecido como **reação hiperaguda ao enxerto** (Figura 2). A maioria dos enxertos que são transplantados rotineiramente na medicina clínica são enxertos de órgãos vascularizados, ligados diretamente à circulação do receptor. Em alguns casos, o receptor já pode ter anticorpos circulantes contra os antígenos do doador, que foram produzidos em resposta a um transplante prévio ou a uma transfusão de sangue. Esses anticorpos podem causar a rejeição muito rápida dos enxertos vascularizados, pois reagem com os antígenos das células endoteliais vasculares do enxerto, iniciando as cascatas do complemento e a coagulação do sangue, bloqueando os vasos do enxerto e provocando sua morte imediata. Esses enxertos tornam-se ingurgitados e de cor púrpura devido ao sangue na hemorragia, que se torna desoxigenado (19).



JANEWAY et al.2000. Imunobiologia: O sistema imunológico na saúde e na doença

### Figura 2 – Rejeição hiperaguda do enxerto.

O anticorpo preexistente contra os antígenos do doador do enxerto pode causar rejeição hiperaguda do enxerto. Em alguns casos, os receptores já têm anticorpos contra os antígenos do doador. Quando o órgão do doador é enxertado nesses receptores, esses anticorpos ligam-se ao endotélio vascular, iniciando as cascatas do complemento e da coagulação. Os vasos sanguíneos no enxerto tornam-se obstruídos por coágulos e vazam, causando hemorragia no enxerto. Esse se torna ingurgitado e de cor púrpura pela presença de sangue desoxigenado.

A rejeição aguda é um dos principais fatores deletérios do enxerto renal, podendo levar à sua falência, nomeadamente no primeiro ano do pós transplante, sendo-lhe atribuída também a principal responsabilidade no desenvolvimento da rejeição/disfunção crônica. Em qualquer dos casos a sua influência negativa na sobrevivência do enxerto é inquestionável, mas não é só a perda de enxerto que tem efeitos negativos na evolução do transplante, a morbidade causada pelas terapêuticas anti-rejeição, como as infecções (CMV), a diabetes, a hipertensão arterial, a obesidade e a osteoporose, têm implicações que podem refletir-se na própria sobrevivência do doente (23).

A rejeição crônica do rim transplantado é denominada “nefropatia crônica do enxerto” e resulta da associação de causas imunológicas (rejeição) e não imunológicas. É definida como uma deterioração progressiva, irreversível, funcional e morfológica do enxerto renal, que ocorre em meses ou anos após o transplante. Essa perda lenta e variável da função renal está associada, freqüentemente, à proteinúria e hipertensão (12).

A principal causa da falência tardia do órgão é a rejeição crônica, caracterizada por arteriosclerose concêntrica dos vasos sanguíneos do enxerto,



acompanhada por fibrose e atrofia glomerular e tubular. Os mecanismos que contribuem para a rejeição crônica podem ser divididos naqueles devidos à alorreatividade e naqueles devidos a outras vias, e em eventos precoces e tardios após o transplante. Os mecanismos alorreativos incluem a lesão precoce associada com a rejeição aguda e a alorreatividade tardia, que é um processo grandemente silencioso. Outras causas importantes da rejeição crônica incluem a lesão por isquemia-reperfusão, que ocorre no momento do enxerto, e fatores adversos de desenvolvimento posterior, como a toxicidade crônica por ciclosporina ou a infecção por citomegalovírus (19).

A infiltração dos vasos e tecidos do enxerto por macrófagos, seguida pela fibrose são características histológicas proeminentes da rejeição tardia do enxerto. Foi desenvolvido um modelo de lesão em que as células T alorreativas infiltrando o enxerto secretam citocinas que estimulam a expressão de moléculas de adesão endotelial e também quimiocinas como a RANTES, que levam ao recrutamento de monócitos que amadurecem em macrófagos no enxerto. Uma segunda fase de inflamação crônica sobrevém, dominada por produtos dos macrófagos incluindo a IL-1, a TNF- $\alpha$  e a quimiocina MCP, que leva a mais recrutamentos de macrófagos. Esses mediadores conspiram para causar inflamação crônica e fibrose, que eventualmente levam a insuficiência irreversível do órgão (19).

### **2.2.2 Rejeição do enxerto e citocinas**

O grau de sucesso alcançado em transplantes de rins de doadores vivos é muito superior ao de enxertos provenientes de doadores falecidos. A persistente escassez de órgãos de doadores tem levado a listas de espera mais longas e a uma crescente porcentagem de pacientes que falecem durante a espera. Em consequência, vem ocorrendo uma mudança gradual rumo à aceitação de doadores subótimos. O uso de doadores com maior idade e indicação marginal é agora rotineiro, e o número de doadores sem batimentos cardíacos vem aumentando significativamente ao longo dos últimos anos. Há duas décadas, o doador típico tinha menos de 30 anos, era razoavelmente saudável e morria de lesão cerebral traumática. Hoje, o doador médio tem mais de 50 anos e a principal causa de óbito é a hemorragia intracraniana. As melhorias alcançadas no regime de tratamento do

receptor, na preservação de órgãos, na redução do tempo de isquemia fria e em melhor alocação de órgãos de doadores têm sido mascaradas pelo uso de doadores de qualidade inferior (24).

No passado, um grande esforço foi direcionado à imunossupressão pós-transplante e à preservação de órgãos durante o transporte. Hoje, os fatores de risco e as condições que precedem a retirada de órgãos do doador necessitam ser reconhecidos, por seu impacto sobre a viabilidade desses órgãos. Os efeitos prejudiciais da morte cerebral sobre os resultados de transplantes renais têm sido convincentemente demonstrados no campo experimental. Em estudos clínicos, no entanto, é difícil mostrar que a morte cerebral exerça, por si mesma, uma influência independente sobre o resultado do transplante, uma vez que doadores vivos e falecidos diferem também em outros aspectos, que não unicamente a morte do cérebro. Entretanto, quando se estratificam os índices de sobrevida por idade, os enxertos provenientes de doadores falecidos apresentam menor sobrevida dentro de cada grupo etário mesmo no grupo relativamente jovem dos doadores de 25 a 36 anos (24).

Apesar dos avanços na terapia imunossupressora nos últimos anos, a rejeição do aloenxerto continua a ser uma preocupação com a falência do enxerto renal. Citocinas são mediadores-chave na indução e fases efetoras de todas as respostas imunes e inflamatórias. A rejeição do aloenxerto é um fenômeno complexo, mediado por mecanismos imunológicos e interações entre citocinas e fatores de crescimento. Muitos polimorfismos de gens de citocinas foram primariamente considerados somente em receptores de transplante com resultados diferentes. No entanto, existem muitas respostas imunes relevantes também no doador que são diferentes do sistema do receptor. O resultado das interações doador-receptor ocorre por efeitos da rede de fatores derivados do doador e do receptor. Em vista das interações entre células do enxerto, e infiltrações de leucócitos no enxerto é provável que a suscetibilidade à rejeição seja influenciada pelo polimorfismo alélico em genes que codificam as citocinas ou células receptores de citocinas, não somente no receptor, mas também no doador. Talvez a análise antecipada da genotipagem dos receptores e doadores possa evocar conseqüentes resultados da função do enxerto.

Prevenção da rejeição é imperativa se o doador de rins estiver em ótimas condições, minimizando o re-transplante (14;25).

A rejeição ao aloenxerto envolve uma complexa rede de interações celulares e humorais, na qual o linfócito T apresenta um papel central, identificando, reconhecendo e mediando respostas celulares e humorais à aloantígenos. As principais moléculas responsáveis pela resposta alogênica e, conseqüentemente, pela rejeição, são os antígenos do MHC de classe I e de classe II. O reconhecimento de aloantígenos é feito pelo receptor de células T (TCR, "T cell receptor"). Os receptores de células T não são capazes de reconhecer o antígeno livre, reconhecendo-o apenas na superfície de outras células, sejam células do doador, sejam células apresentadoras de antígeno (APC, "antigen presenting cell"). Dependendo da natureza e da origem da célula que apresenta o antígeno, são caracterizadas duas vias de alo-reconhecimento: a via direta e a via indireta (26).

Segundo o modelo da via direta de reconhecimento, os receptores de células T são capazes de identificar alomoléculas intactas de MHC presentes nas células do doador. Tem sido proposto que a rejeição celular aguda na fase inicial pós-transplante é mediada predominantemente pela via direta, embora a via indireta também tenha participação neste tipo de rejeição. Segundo o modelo da via indireta de reconhecimento, células da linhagem monocítica/macrofágica, bem como células dendríticas e endoteliais, fagocitam moléculas MHC das células do enxerto, processando-as e reexpressando-as na superfície celular na forma de um complexo tridimensional formado por MHC+peptídeo (26).

A interação de moléculas do MHC com o receptor do linfócito T gera o primeiro sinal para o processo de ativação do linfócito T. Este primeiro sinal determina a ativação de enzimas presentes na membrana celular da célula T, promovendo fosforilação de fosfolípides de membrana, dando início a uma série de eventos citoplasmáticos que vão desde a abertura de canais iônicos para cálcio até a ativação da calcineurina, uma fosfatase cálcio-dependente. Esta fosfatase induz de maneira rápida e eficiente o aumento da transcrição de genes que codificam interleucina 2 (IL-2) e outras citocinas. Concomitantemente, há aumento da expressão de receptores para IL-2 nas células T vizinhas ao local do reconhecimento inicial, amplificando

assim a resposta imune celular. A interação da IL-2 com o receptor para IL-2 (IL-2R) induz crescimento e diferenciação celular, levando à proliferação clonal e determinando o aparecimento de grande número de células efetoras. O resultado final de toda esta cadeia de eventos é o agravamento da resposta inflamatória local e agressão ao aloenxerto através de diferentes vias efetoras (26).

Genótipos de citocinas têm sido estudados em pacientes submetidos a transplante de órgãos sólidos bem como certos polimorfismos têm sido implicados no desenvolvimento de complicações como falência, rejeição aguda e crônica do aloenxerto, embora o papel de cada gene variante seja controverso. O sistema imune é regulado por uma matriz de citocinas, que influencia ativação celular, diferenciação e função (26;27).

Citocinas e fatores de crescimento são proteínas produzidas por diversas células que agem em outras células-alvo, através de receptores específicos. Estão relacionadas com crescimento e diferenciação celular, além de participarem de reações de hipersensibilidade do tipo tardio. Neste caso, células T CD4<sup>+</sup> secretam citocinas capazes de recrutar e ativar um grande número de células efetoras, principalmente macrófagos e linfócitos T e B. Estudos realizados em biópsias renais de pacientes submetidos a transplante renal demonstraram a presença de citocinas e receptores para citocinas no infiltrado intersticial de casos com rejeição celular aguda, sugerindo que estas citocinas têm importância neste processo (26).

### **2.2.2.1. Interleucina 2**

IL-2 age como um fator para o crescimento e diferenciação de células natural killer (NK), alguns linfócitos B e células killer linfocina ativada (LAK). Além disso, a IL-2 ativa monócitos a produzir citocinas, especialmente TNF- $\alpha$ . Estimulação da produção de IL-2 em células T é observada após a ativação antígeno-induzida. Em um cenário natural de estimulação antigênica, a síntese de IL-2 é iniciada após combinada com os receptores de células T. A ativação de células NK pela IL-2 resulta em um aumento da produção de interferon gama (INF $\gamma$ ) e o aumento de efeitos citotóxicos (27).

A interleucina 2 (IL-2) é, da mesma maneira que o IFN- $\gamma$ , uma citocina também produzida por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e que interagindo com os receptores para IL-2 (IL-2R) nos linfócitos T ativados, amplifica a capacidade de resposta imunológica (26).

No processo de ativação do linfócito T, no contexto da rejeição ao enxerto, ocorre aumento da transcrição e da síntese de IL-2 e, concomitantemente, há aumento da expressão de IL-2R na superfície celular. A interação da IL-2 com seus receptores é fundamental para o desencadeamento da proliferação celular. Esta expansão clonal de células T antígeno-específicas é responsável pela resposta efetora de agressão ao enxerto (28).

#### **2.2.2.2. Interleucina 6**

IL-6 é uma citocina pleotrópica, envolvida em muitos diferentes aspectos da resposta de inflamação. Ela é produzida por uma ampla gama de células de origem hematopoiética e não hematopoiética, incluindo macrófagos, linfócitos, células endoteliais células mesangiais, e músculo liso vascular. A IL-6 é um integrante do mediador de resposta de fase aguda e modula tanto imunidade local como sistêmica (27).

Sinônimos anteriores de IL-6 ilustram algumas das atividades biológicas. Eles incluem Interferon- $\beta_2$  (IFN-  $\beta_2$ ), hibridoma/fator de crescimento plasmocitoma, fator estimulante de hepatócito, fator 2 estimulatório de células B (BSF-2), fator de diferenciação de células B (BCDF). IL-6 é uma glicoproteína que varia de 21 a 28 kDa, dependendo do grau de modificação pós-translacional. A IL-6cDNA foi clonado em 1986 e a codificação do gene foi mapeado no cromossomo 7 em humanos (29).

A IL-6 é produzida por uma variedade de células incluindo fagócitos mononucleares, células T, e fibroblastos. Além da estimulação da síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado, a IL-6 atua como um fator de crescimento para células B maduras e induz a sua maturação final em células plasmáticas produzindo anticorpos. Ela está envolvida na diferenciação e ativação de células T, e participa na indução de IL - 2 e expressão de IL-2 do receptor. Alguns dos efeitos regulatórios de

IL-6 envolvem a inibição da produção de TNF, fornecendo um feedback negativo, limitando a resposta inflamatória aguda (30).

Elevação da produção de IL-6 tem sido observada em uma variedade de doenças inflamatória crônica e auto-imunes como a tireoidite, diabetes tipo I, artrite reumatóide, esclerose sistêmica, glomerulonefrite proliferativa mesangial, psoríase, neoplasias, como o mixoma cardíaco, carcinoma de células renais, mieloma múltiplo, linfoma leucemia (30).

### **2.2.2.3. Interferon gama**

O interferon *gama* (IFN- $\gamma$ ) é uma importante citocina responsável pelo aumento da expressão de moléculas MHC nas células aloenxertadas, além de ser um potente ativador de macrófagos. Estes, uma vez ativados, são capazes de secretar outras citocinas, como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF), responsáveis pela ativação do processo de migração leucocitária para a região aloenxertada, seja através do aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície dos linfócitos, seja através da expressão de quimiocinas (26).

### **2.2.2.4. Fator de Necrose Tumoral Alfa**

Em 1985, Old e colaboradores, identificaram uma proteína sérica responsável pela necrose hemorrágica em coelhos tratados com endotoxinas, transplantados ou injetados com tumor, denominando-a como de Fator de Necrose Tumoral-alfa. Paralelamente a estes achados, um grupo de pesquisadores liderados por Cerami e colaboradores (1985), identificaram em pacientes com câncer uma proteína circulante responsável pelo desenvolvimento da caquexia, que a nomeou de caquetina, onde, através de comparações bioquímicas verificou-se que TNF- $\alpha$  e a caquetina eram idênticas (31-34).

TNF- $\alpha$ , é um potente indutor de resposta inflamatória e é regulador central da imunidade inata. A resposta inflamatória para TNF- $\alpha$  é mediada diretamente e através da estimulação de outras citocinas pró inflamatórias. A citocina pró inflamatória TNF- $\alpha$ , a qual estimula a função do macrófago e aumenta a expressão antígeno MHC

classe II, tem sido implicada tanto na rejeição aguda, como na rejeição crônica. A ativação de células endoteliais e da subsequente expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) induzida por TNF- $\alpha$ , pode reforçar a permeabilidade vascular e, portanto, aumentar a infiltração de granulócitos pró inflamatórios no enxerto. O nível de produção dessas citocinas no local do aloenxerto pode ser importante na aceleração da rejeição (27).

TNF- $\alpha$  e  $\beta$  são citocinas que se ligam aos receptores comuns sobre a superfície de células alvo e apresentam várias atividades biológicas comuns. TNF- $\alpha$  e  $\beta$  humanas tem 17 e 25 kDa respectivamente. Seus correspondentes cDNAs foram clonados em 1984 e os genes que codificam os fatores foram mapeados no cromossomo 6 em seres humanos na região de maior complexo de histocompatibilidade (MHC). TNF- $\alpha$  ou caquetina existe como um trímero e é um dos produtos de macrófagos/monócitos ativados, fibroblastos, mastócitos e algumas células NK. TNF- $\alpha$  e IL-1 compartilham várias propriedades pro-inflamatórias. TNF- $\alpha$  também compartilha uma importante propriedade inflamatória com a IL-6 e IL-11, ou seja, a indução de produção de proteínas de fase aguda reagente produzida pelo fígado. TNF- $\alpha$  e IL-1 ainda exercem efeitos secundários inflamatórios, estimulando a síntese de IL-6 em células de vários tipos. IL-6 serve de mediador de seus próprios efeitos e os do TNF- $\alpha$  e IL-1 induzindo febre e resposta de fase aguda, assim perpetuando a resposta inflamatória através de uma cascata de citocinas com propriedades sobrepostas (30).

#### **2.2.2.5. Fator de Necrose Tumoral Beta**

TNF  $\beta$  também conhecida como linfotoxina é produzida por linfócitos T e B ativados. Ele se liga aos mesmos receptores de alta afinidade para TNF- $\alpha$  e incluem a indução de apoptose (morte celular programada) em muitos tipos de células transformadas, infectadas por vírus, células tumorais e a estimulação de muitas funções efetoras de polimorfonucleares (30)

Embora em geral os efeitos das citocinas sejam exercidos no local da sua produção, TNF- $\alpha$  e TNF  $\beta$ , bem como IL-1 e IL-6 tem maior efeito sistêmico quando

produzidos agudamente em grandes quantidades, como no caso de sepse bacteriana ou cronicamente em menor quantidade, em casos de infecções crônicas (27).

### 2.3 BIOMARCADORES

Biomarcadores são ferramentas que podem fornecer alguma informação necessária, especialmente quando usadas em conjunto com dados clínicos e laboratoriais. Um biomarcador deve consistir em indicador de processos biológicos, patogênicos ou resposta farmacológica para um tratamento terapêutico (35).

A busca por novos biomarcadores para detecção da lesão renal está se desenvolvendo rapidamente com avanço da tecnologia. Com melhores biomarcadores, possivelmente tornará viável a detecção precoce da lesão renal, a identificação de lesões subclínicas, o fornecimento de informação prognóstica do curso da doença, a identificação dos segmentos mais afetados, a avaliação da resposta para determinados tratamentos e a classificação dos pacientes de risco para lesão renal (36).

As características desejáveis de um biomarcador clinicamente aplicável incluem: (a) não serem invasivos, com fácil realização, utilizando material mais acessível como urina e sangue; (b) a mensuração deve ser rápida, exequível e padronizada; (c) devem ser altamente sensíveis para detecção precoce; (d) devem ser altamente específicos, permitindo detecção de etiologias e subtipos (36).

Recentemente, tem havido muito interesse no valor potencial de marcadores inflamatórios no pré transplante como preditores de rejeição aguda e perda do enxerto renal no adulto (9). Em estudo realizado por Magro et al (35), foi identificado um perfil conciso de 29 biomarcadores de lesão renal, estudados em pesquisa com modelos animais e estudos clínicos nos últimos anos destacando-se a interleucina 18 (IL-18), a IL-6, a interleucina 8, o hidrato de carbono (HNK-1), o Malondialdeído urinário (MDA), a Cistatina C, o Dendrimer-enhanced MRI, a Glutathione alpha-transferase e pi-transferase, o Neutrophil gelatinase-associated Lipocalin (N-GAL), a Protein P53, o Proatrial natriuretic peptide (1-98), a Urinary actin, a N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, a alpha-1-microglobulin, o Kidney Injury molecule-1 (KIM-1), a Retinol Binding Protein



(RBP), a Neutral endopeptidase (NEP), a Beta 2-microglobulin, urinary, o Sodium/hydrogen exchanger isoform 3 (NHE3), o Neutrophil CD11b, Spermidine/Spermine N(1)-acetyltransferase (SSAT), a Cysteine rich protein 61 (CYR61, CCN1), o 1,5-anhydroglucitol, a Adenosina deaminase binding protein, a Glycosyl transferase e entre as enzimas de lesão tubular encontraram-se a Gamma-Glutamyl transpeptidase (Gama-GTP), a Alanine aminopeptidase (AAP), a alkaline phosphatase (AP), a Leucine aminopeptidase e dipeptidyl peptidase IV (DPP).

Cada marcador possui suas próprias forças e fraquezas para determinar o início e a severidade da lesão renal aguda. No entanto, em combinação, um painel de marcadores renais pode servir como ferramentas poderosas para o diagnóstico de lesão renal com alta acurácia (37).

### **2.3.1 BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS**

Inflamação é a resposta do organismo a diversos estímulos. Mediadores de inflamação incluem complementos, pró coagulantes, citocinas e fibrinolíticos. No transplante renal imediatamente depois que um rim é adquirido, ocorre isquemia seguida de reperfusão (IR), envolvendo mecanismos imunológicos e não imunológicos. A inflamação causa a produção de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e apoptose e necrose celular simultâneas. Os mediadores de lesão IR incluem leucócitos, plaquetas e pró-coagulantes. Eventualmente, a inflamação pode causar extensa destruição tecidual. A atenuação do processo inflamatório é conseguida através da utilização de anticorpos IL-6, pré tratamento em zinco e nocautes com P-selectina. A relação entre a inflamação e a rejeição aguda (RA) está presente antes da transplantação. As concentrações séricas de proteína C-reativa no pré transplante, IL-2 e interferon (IFN)- $\gamma$  antes e na 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> semanas depois do transplante são mais elevados nos pacientes que desenvolvem RA. Além disso, a expressão renal de IL-6 é quatro vezes maior em pacientes com RA (38).

Inflamação, uma resposta do tecido à lesão, é caracterizada na fase aguda por aumento do fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular em decorrência do acúmulo de líquido, leucócitos e mediadores inflamatórios, como citocinas. Na fase crônica, é caracterizada pelo desenvolvimento de resposta imune humoral e celular a

patógenos presentes no local da lesão tecidual. Durante os processos inflamatórios agudos e crônicos, vários fatores solúveis estão envolvidos em recrutamento de leucócitos através de expressão aumentada de moléculas de adesão celular e quimiotaxia. Muitos desses mediadores solúveis regulam a ativação das células residentes (como fibroblastos, células endoteliais, macrófagos do tecido e mastócitos células endoteliais, macrófagos do tecido, e mastócitos) e as células recém-recrutadas (como monócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos) e alguns desses mediadores resultam na resposta sistêmica do processo inflamatório (ex. febre, hipotensão, síntese de proteínas de fase aguda, leucocitose e caquexia) (30).

Os fatores solúveis que servem de mediadores a estas respostas correspondem a quatro categorias principais: 1- Metabólitos lipídicos inflamatórios tais como fator ativador de plaquetas (FAP) e numerosos derivados do ácido aracdônico (prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas) que são gerados à partir de fosfolipídios celulares, 2- Três cascatas de proteases/substrato solúveis (coagulação, complemento e cininas) que geram numerosos peptídeos pró-inflamatórios, 3- Óxido nítrico, um potente vasodilatador endógeno, cujo papel no processo inflamatório só recentemente começou a ser explorado e 4- Um grupo de polipeptídeos derivados de células, conhecida como citocinas, que em grande medida conduzem a resposta inflamatória, ou seja elas são os principais determinantes da formação do infiltrado celular, o estado de ativação celular e a resposta sistêmica à inflamação. A maior parte das citocinas são multifuncionais, moléculas pleiotróficas, que provocam efeitos locais ou sistêmicos (30).

O desenvolvimento de rejeição crônica é uma das várias etapas do processo que podem ser distinguidas pelo tipo de infiltrado celular, citocinas e fatores de crescimento que estão presentes em lesões crônicas. A rejeição crônica está associada com obliteração vascular e outras mudanças que precedem a fibrose progressiva do órgão transplantado. As indicações de rejeição crônica em órgãos transplantados são inflamação perivascular, fibrose e arteriosclerose caracterizada pela difusão, espessamento interno aumentado, resultando em estreitamento luminal final e oclusão das artérias e arteríolas do órgão transplantado (27).

A presença de inflamação é um achado consistente em pacientes com DRC e tem sido reconhecida como um novo fator de risco para doença arterial coronariana (DAC). Acumulam-se evidências sugerindo que a inflamação crônica é crucial para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose nos pacientes com DRC. Nível sérico elevado de marcadores do estado inflamatório, como a proteína C-reativa (PCR), é encontrado em pacientes com DRC em diferentes fases de sua progressão. A presença de níveis plasmáticos elevados de outros marcadores inflamatórios, como a IL-6, e de estresse oxidativo, como a peroxidação lipídica, além de outros mecanismos, tais como, a uremia, infecções persistentes (ex., *Chlamydia pneumoniae* e infecções dentárias) e o próprio processo aterosclerótico, contribuem para o aumento da resposta inflamatória observada em pacientes com DRC (5).

Embora redução de colesterol na terapia com estatinas reduzir a incidência de eventos cardíacos em pacientes transplantados renais, eventos cardiovasculares prematuros e morte prematura ainda é uma grande preocupação nesta população. A prevalência de fatores de risco cardiovascular tradicionais não pode explicar completamente a maior incidência de eventos cardiovasculares, e diversos relatos têm enfatizado o papel dos não-tradicionais fatores de risco cardiovascular (39).

A Inflamação e a ativação do sistema imunológico podem desempenhar papéis importantes na aterogênese. As citocinas induzem a produção de IL-6 a partir de vários tecidos, incluindo o fígado, e o aumento de mediadores adjuvantes, como a PCR. Os receptores de transplante renal, pelo processo de recepção de um enxerto, têm uma ativação adicional do seu sistema imunitário (39).

Em pacientes com doença renal crônica, uma associação entre desnutrição, inflamação e aterosclerose tem sido demonstrada. Também tem sido especulado que uma melhor sobrevivência do enxerto, alcançada em transplante, pode ser devida à menor exposição aos marcadores de inflamação associada com diálise. Em receptores de transplante renal há poucos estudos examinando a associação entre os marcadores inflamatórios e mortalidade por qualquer causa, eventos cardíacos ou acidentes vasculares cerebrais (39).

É possível que esses fatores interajam mutuamente, resultando em um ciclo vicioso em que participam diversas substâncias pró-inflamatórias, como citocinas, moléculas de adesão, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio, culminando na formação da placa aterosclerótica e levando à oclusão arterial (5).

A incidência de inflamação em pacientes renais em estágio terminal é alta. A restauração da função renal por transplante melhora a inflamação crônica nestes indivíduos. Estudo epidemiológico demonstrou que mesmo uma redução moderada na função renal (iniciando com taxa de filtração glomerular de 60 mL/min) está associada com o aumento do risco cardiovascular e que o nível da função renal por si mesmo é um preditor independente do desfecho cardiovascular e causa de mortalidade, sustentando a premissa que outros fatores relacionados a condições urêmicas aceleram aterosclerose. Dentre os fatores de risco cardiovascular não tradicional, a inflamação e o estresse oxidativo têm sido propostos como um mecanismo de ligação entre uremia crônica e doença cardiovascular. A inflamação das paredes dos vasos e a modificação de lipoproteínas de baixa densidade são agora reconhecidas como eventos chaves no desenvolvimento precoce de aterosclerose (40;41).

Numerosos estudos documentam que níveis elevados da citocina pró-inflamatória IL-6 e a fase aguda reagente da proteína C reativa é importante preditor de evento cardiovascular, ambos em população geral e em pacientes com doença renal crônica e que aumenta a concentração circulante tanto quanto a deterioração da função renal. Do mesmo modo, altos níveis de marcadores de estresse oxidativo são também comuns em pacientes com doença renal crônica e tem sido correlacionado com ocorrência e severidade da doença cardiovascular (41).

PCR sérico no pré transplante tem sido demonstrado como um preditor de rejeição aguda e nefropatia crônica do enxerto, embora as últimas descobertas possam indicar uma potencial utilidade deste marcador como indicador de risco imunológico, tendo a limitação de um único ponto de medida, que não necessariamente traduz a presença de curso inflamatório durante um longo período de tempo. Estudos com medidas repetidas dos marcadores de inflamação foram executados dentro de um curto período após o transplante renal e mostram que, em

ausência de rejeição, marcadores de inflamação mostram um imediato aumento após o transplante, seguido por um decréscimo dos níveis basais na próxima semana. No entanto, nenhum estudo demonstrou se os marcadores inflamatórios mudam em pacientes transplantados renais estáveis em seguimento mais longo (42).

A patogênese da falência renal aguda isquêmica tem sido atribuída à regulação anormal do fluxo sanguíneo local, seguindo o episódio isquêmico inicial. Uma vasoconstrição persistente pré-glomerular pode ser um fator contribuinte, entretanto, a inflamação contribui de uma forma importante para uma redução do fluxo sanguíneo local para a região do córtex e para o exterior da medula com consequência adversa sobre a função e viabilidade do túbulo (43).

## **2.4 CISTATINA C**

A Cistatina C foi descoberta em 1961, como traço  $\gamma$  numa banda eletroforética de fluido cerebrospinal, sendo também no mesmo ano identificada na urina (44). O primeiro imunoenensaio para quantificar cistatina C foi desenvolvido por Lofberg e Grubb em 1979 (45). Este foi um radioimunoensaio de comprimento competitivo que tinha um limite de detecção de 30 g/L, o qual foi mais que suficiente para detectar a cistatina C em soro de indivíduos saudáveis e permitir estudos de valores de cistatina C. Em 1985, foi demonstrada pela primeira vez, a forte correlação inversa da cistatina C sérica com a função glomerular (46;47).

A cistatina C é um membro da superfamília dos inibidores da cisteína protease. É uma proteína de baixo peso molecular (13 kDa), considerada o inibidor fisiológico mais importante das proteases endógenas da cisteína. É produzida pelas células nucleadas em nível constante, filtrada livremente pelo glomérulo, reabsorvida e catabolizada, mas não secretada pelos túbulos. Em função renal normal, a reabsorção tubular e o catabolismo da cistatina C é quase completo (45) e a cistatina C é somente detectada em pequenas quantidades na urina. Em controles saudáveis, a medida de cistatina C urinária por imunodifusão radial simples foi inferior a 0,30 mg/L. Aumento da cistatina C urinária foi notada especialmente em desordens renais tais como o dano tubular associado com ervas chinesas, nefropatia por HIV, e nefrite intersticial aguda. A cistatina C não sofre interferência de outras proteínas de baixo

peso molecular, tais como a proteína ligada ao retinol (RBP) e a B2-microglobulina, que também são utilizadas para a avaliação da capacidade de filtração glomerular em vigência de processos de desnutrição grave, inflamatórios e infecciosos (44;48-52).

As cisteína proteases são enzimas proteolíticas envolvidas em uma série de processos patológicos, tais como os estados de inflamação, doenças neurológicas, invasão tumoral, formação de metástases. As proteases são cruciais para o bom funcionamento do metabolismo celular, para a degradação do colágeno e clivagem de proteínas precursoras (51).

Devido ao seu baixo peso molecular e à carga positiva, a cistatina C é livremente filtrada pelo glomérulo renal e, então reabsorvida e metabolizada no tubo renal proximal, não ocorrendo secreção renal ou extra renal. Logo a determinação de cistatina C sérica reflete exclusivamente a filtração glomerular e seu aumento no soro significa uma redução dessa taxa de filtração (53).

Embora os primeiros estudos sobre a cistatina C datem de 1985, após várias tentativas de padronização, somente em 1994 foi introduzida uma técnica adequada para a medida automática de cistatina C. Esta foi devido ao desenvolvimento simultâneo de duas técnicas de imunofluorescência acrescentada em partículas de látex (PETIA). Estes dois ensaios que usaram o mesmo anticorpo e o mesmo calibrador, porém diferentes partículas deram resultados extremamente concordantes. Este foi logo seguido pelo desenvolvimento de um ensaio nefelométrico acrescentado em partículas (PENIA), usando os sistemas nefelométricos de Berhing. PENIA e PETIA formam a base de quatro técnicas comercialmente disponíveis para determinar cistatina C. (50;51).

A maioria das avaliações clínicas é realizada utilizando estas técnicas automatizadas de imunonefelometria e imunoturbidimetria, ambas muito rápidas e sensíveis que podem e devem ser incluídas nas rotinas dos laboratórios clínicos que atendem todos os tipos de pacientes, sobretudo crianças. A dosagem de cistatina C pode ser feita tanto no soro quanto no plasma, com volumes bastante reduzidos (25 microlitros). Este exame não sofre interferência do pigmento amarelo encontrado em soros de pacientes muito ictericos, no entanto a cistatina C pode sofrer alterações em

vigência de lipemia e hemólise intensa (14). A PENIA (particle enhanced nephelometric immunoassay) é feita no aparelho BNII, da Siemens. Necessita de 80 microlitros de amostra de plasma, o tempo de duração do ensaio é de 6 minutos e tem coeficientes de variação intra e inter ensaio de 1,8 e 1,1 %, respectivamente (44;51).

Dharnidharka et al registraram que o ensaio imunonefelométrico é superior ao ensaio turbidimétrico para a análise de cistatina C, à partir de uma meta-análise, onde foi observado o coeficiente de correlação dos estudos que usaram o ensaio imunonefelométrico (14 estudos), versus outras técnicas (21 estudos) (54).

Os valores de referência pelo PENIA são um pouco mais baixos que os do PETIA, mas ainda não há um consenso. Por causa dos diferentes métodos analíticos, calibração, antisoros e distribuição de idades, tornam-se difícil fazer comparações entre os resultados de diferentes estudos. Uma vantagem do PETIA da DAKO, é que ele pode ser realizado em qualquer espectrofotômetro automatizado, ou analisador clínico, enquanto o PENIA somente foi desenvolvido para os analisadores do seu mesmo fabricante. Existe concordância entre vários autores de que os valores de referência podem ser comuns para homens e mulheres, embora alguns autores descrevam valores mais elevados no sexo masculino (44;50).

É sugerida uma diferenciação entre idades, mas ainda também não há um consenso entre ponto de corte (50 ou 65 anos de idade), já que a cistatina C tem a sua concentração aumentada de acordo com a idade, enquanto a FG cai, paralelamente. Estudos prévios sugerem que o volume renal diminui de 20 a 30% na quarta década e até 40% na oitava década de vida (44).

Galteau et al (55) propuseram um baixo intervalo de referência (0,63 – 1,03 mg/mL) para indivíduos acima de 60 anos de idade. Finney et al (46) em um estudo de 398 indivíduos de 65 a 101 anos de idade sugeriu consideravelmente maiores limites de referência: (0,93 – 2,68 mg/L) para o grupo de 60 a 79 anos de idade e 1,07 – 3,35 mg/L para o grupo de 80 anos de idade (56).

Segundo dados do Censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) em janeiro de 2009, existiam no Brasil 626 unidades de diálise cadastradas. O número de pacientes estimado em diálise foi de 77.589, e o de pacientes inscritos em fila de espera para transplante era de 30.419, havendo uma deflexão na curva ascendente do número de pacientes em relação ao ano de 2008, mas observando-se uma tendência crescente do número de pacientes na última década (57;58).

Dados sobre os pacientes em terapia renal substitutiva (TRS) devem permitir uso mais racional dos recursos econômicos devotados a essa terapêutica de alto custo e ajudar a identificar intervenções para serem implementadas visando a melhoria da sobrevida, redução do risco, controle de comorbidades e melhora da qualidade de vida dos pacientes (57).

Alguns estudos em pacientes com transplantes estáveis têm indicado que a cistatina C distingue um anormal nível de filtração glomerular, mais sensivelmente que a creatinina em população de transplantados. Outros estudos tem examinado a alteração de cistatina C em períodos de pós transplante imediato, entretanto nenhum tem investigado o papel da cistatina C em predizer a sobrevida do enxerto (56).

Por oferecer maior sobrevida, melhor qualidade de vida e com menor custo que o tratamento dialítico, o transplante renal tornou-se a melhor opção terapêutica para a maioria dos pacientes urêmicos crônicos.

Diante dos relatos acima citados, por meio da realização do presente estudo, será investigado o perfil da cistatina C, interleucina 2, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa em receptores de transplante renal, em três momentos distintos: no pré transplante , com um mês e com seis meses após o transplante.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Analisar o perfil da cistatina C, interleucina 2, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa em receptores de transplante renal



### **3.2 Objetivos Específicos**

- a) Verificar o comportamento da cistatina C, interleucina 2, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa no pré transplante, com 30 e 180 dias do pós transplante,
- b) Avaliar correlação dos níveis das concentrações de cistatina C, creatinina, interleucina 2, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa com a presença de disfunção renal.
- c) Analisar o comportamento da cistatina C, creatinina, interleucina 2, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa em pacientes que receberam indução e os que não receberam após o transplante renal.
- d) Investigar a correlação dos níveis das concentrações de cistatina C, interleucina 2, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa com os parâmetros clínicos antes do transplante.
- e) Verificar o comportamento da interleucina 2, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa com a creatinina e cistatina C 180 dias do pós transplante.
- f) Analisar a correlação da interleucina 2, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa entre si nos diferentes momentos da coleta

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Tipo e período do estudo**

O estudo realizado apresenta um caráter descritivo, analítico e prospectivo sendo realizado no período de 01 de janeiro de 2007 a 30 de junho de 2008

### **4.2 População em estudo**

A população em estudo foi composta pelos pacientes que foram submetidos a transplante renal na unidade de transplante do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA), que desenvolve serviços altamente especializados à população e dá suporte técnico necessário ao sistema de saúde pública, onde é referência estadual para os procedimentos de alta complexidade. O primeiro transplante renal com doador vivo foi realizado em 18 de março de 2000 e com doador falecido a partir do ano de 2005.

O HUUFMA dispõe de 515 leitos, sendo 22 leitos destinados à unidade de transplante renal, realizando transplantes com doador vivo e falecido. O serviço de transplante renal está em funcionamento há 11 anos, trabalhando com uma equipe multidisciplinar especializada, com cobertura de 24 horas, e já realizou até o ano de 2010, 309 transplantes, dos quais 234 com doador vivo e 75 com doador falecido. Em média, o referido serviço realiza aproximadamente 30 transplantes por ano com doador vivo.

Foram incluídos neste estudo pacientes que realizaram transplante renal no período de 01 de janeiro a 31 de dezembro de 2007, com faixa etária compreendida entre 18 e 60 anos, transplantados com rim de doador vivo e que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

#### **4.3 Amostra em estudo**

Neste estudo, apenas 24 pacientes preencheram os critérios de inclusão.

#### **4.4 Coleta de dados**

Os pacientes internados para o transplante foram previamente preparados pela equipe médica com avaliações de: sorologias, função hepática, função renal, função cardíaca, exames de imagem, compatibilidade HLA e *crossmatch*. Após esta análise, sendo considerado sem restrições, foi feito agendamento para o transplante renal. Foram utilizados os seguintes esquemas tríplice de imunossupressão: 1- Inibidor de calcineurina (Tacrolimus), Micofenolato de Mofetil e Prednisona; 2- Inibidor de calcineurina (Ciclosporina), Azatioprina e Prednisona.

Após a internação dos pacientes para a realização dos transplantes e avaliação dos critérios de inclusão, foi iniciado o protocolo de coleta. A partir do levantamento foram identificados os pacientes para a realização da coleta que foi iniciada em janeiro de 2007 e teve seu término em junho de 2008. Os pacientes incluídos tiveram suas medidas laboratoriais avaliadas em três momentos distintos: o primeiro no ato da internação, os seguintes com 30 e 180 dias após o transplante. Concomitantemente foi encaminhado ofício solicitando autorização à Diretoria da unidade hospitalar e à equipe médica envolvida.

A coleta dos dados demográficos (idade, sexo e etnia) e clínicos (peso, peso seco, altura, pressão diastólica, pressão sistólica, doença de base, hemoglobina, albumina, fósforo e creatinina) foi realizada através da análise de prontuário dos pacientes.

A coleta de sangue foi realizada de maneira individual na unidade de transplante, por técnicos especializados, sendo coletadas, identificadas, devidamente acondicionadas e transportadas para a realização das análises no laboratório do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA) e no Laboratório Genese Produtos Diagnosticos LTDA, na cidade de São Paulo.

#### **4.5 Processamento e análise bioquímica das amostras**

A cistatina C foi mensurada em amostras de soro por técnica de nefelometria, utilizando-se o equipamento BN ProSpec do laboratório Siemens e insumos da mesma procedência do equipamento, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de soro foram obtidas à partir da coagulação e centrifugação do sangue total à 2500 rpm, durante 15 minutos. Foram utilizadas amostras sem turbidez, considerando que as mesmas prejudicam o ensaio, por tratar-se de fator interferente para a nefelometria. O método de imunonefelometria utiliza partículas de poliestireno carregadas com anticorpo de coelho específico contra a cistatina C humana, que, na presença de amostras de soro contendo cistatina C sofrem aglutinação, gerando luminescência. A intensidade da luz dispersa no equipamento depende da concentração da proteína cistatina C na amostra; a concentração analítica da amostra pode ser determinada por comparações com diluições de um padrão de concentração

conhecida. O controle de qualidade é dado pelos controles do material do calibrador, cuja fonte é um purificado de cistatina C humana (*control cystatin C*). A curva de calibração apresenta intervalos de 0,8 a 7,1 mg/dL. O intervalo de referência é de 0,53 a 0,95 mg/L.

A determinação dos níveis séricos de IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$  foi mensurada em amostras de soro utilizando-se os ensaios imuno enzimáticos humanos TiterZime (EIA), fundamentados na metodologia “sanduíche” convencional de dois-sítios, onde o mix de microesferas é incubado com padrões e amostras em formato de placa de 96 poços, seguidos da adição do anticorpo de detecção biotilado, sendo o seu resultado final amplificado através de incubação com o conjugado repórter estreptavidina-ficoeritrina. Em seguida, as microesferas foram lidas no equipamento Luminex 100 através de sistema duplo de lasers que incide sobre as microesferas, à medida que estas fluem através do fluxo celular. Um feixe de laser detecta a microesfera (o código de cor específico para o ensaio) e o outro laser quantifica o sinal de repórter em cada microesfera. Os valores dos coeficientes de variação intraensaios foram respectivamente, de 0,02% a 27,5% para IL-2, de 0,01% a 2,88% para IL-6 e de 0,00% a 5,15% para TNF-  $\alpha$ . Para a IL-2, o valor de referência normal é até 2,0 pg/mL, para IL-6 até 6,01 pg/mL e para TNF- $\alpha$  até 8,43 pg/mL, fornecidos pelo fabricante. As amostras de soro foram obtidas a partir da coagulação e centrifugação do sangue total à 2500 rpm, durante 15 minutos, em seguida congeladas a -70°C, e enviadas congeladas em gelo seco para o laboratório.

#### **4.6 Análise estatística**

As variáveis quantitativas foram apresentadas por meio de média e desvio padrão (média  $\pm$  desvio padrão) ou mediana e as qualitativas por frequências e porcentagens. Foi realizado o teste de Shapiro Wilk para verificar a normalidade das variáveis quantitativas em estudo.

Para comparar os marcadores em estudo nos diferentes momentos utilizou-se o teste de Friedman, visto que as variáveis não apresentaram distribuição normal. Também foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman para verificar quais marcadores estavam correlacionados com a cistatina C.

O nível de significância adotado foi de 5%. A análise de dados foi realizada no STATA 9.0.

#### **4.7 Aspectos Éticos**

O Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão concedeu a aprovação ao protocolo do estudo (Anexo 1). Os pacientes elegíveis receberam informação escrita e oral a respeito dos objetivos do projeto de pesquisa, bem como do uso do seu sangue neste estudo e todos forneceram o consentimento assinado.

### **5. RESULTADOS**

No período de 01 de janeiro à 31 de dezembro de 2007 foram transplantados 26 pacientes com doador vivo, sendo 02 menores de 18 anos e 06 pacientes com doador cadáver, totalizando 32 transplantes realizados, entretanto apenas 24 pacientes atenderam aos critérios de inclusão deste estudo. Um paciente foi excluído do estudo visto que o mesmo evoluiu para óbito na fase inicial do período do pós transplante, sendo o nosso  $n=23$  pacientes.

Dos 23 pacientes transplantados, 19 foram submetidos ao esquema de imunossupressão compreendendo INC (Tacrolimus), Micofenolato de Mofetil e Prednisona e 04 pacientes ao esquema INC (Ciclosporina), Azatioprina e Prednisona. 08 pacientes receberam indução, sendo 6 com anticorpo monoclonal (Basiliximab) e 2 com anticorpo policlonal (Timoglobulina), e 15 não receberam indução.

Os pacientes que foram submetidos à biópsia apresentaram disfunção do enxerto, observada pela elevação dos níveis de creatinina ( 6 pacientes ) ou níveis de proteinúria ( 2 pacientes ).

A média de idade dos pacientes foi de 34,3 anos ( $\pm 11,7$ ), havendo predominância do sexo feminino (52%) e da etnia não branca (61%). As médias de peso, peso seco, altura, pressão diastólica e sistólica, hemoglobina, albumina, fósforo e creatinina encontradas no pré transplante foram de 55,2Kg ( $\pm 14,0$ ), 54,7Kg ( $\pm 13,3$ ),

158 cm ( $\pm 0,1$ ), 133 mmHg ( $\pm 21,6$ ), 88 mmHg ( $\pm 15,6$ ), 11,7 g/dL ( $\pm 1,9$ ), 4,1 mg/dL ( $\pm 0,5$ ), 6,2 mg/dL ( $\pm 1,7$ ) e 8,9 mg/dL ( $\pm 4,1$ ) respectivamente, havendo um predomínio de doenças não glomerulares como doença de base. (Tabela 1).

Tabela 1 – Características demográficas e clínicas da população estudada (n=23) no momento da internação. São Luis, MA, 2008.

Varáveis	Valores
Idade (anos) média $\pm$ dp	34,3 $\pm$ 11,7
Sexo (masc/fem) n %	11; 12 (48; 52)
Etnia (branco/não branco) n %	09; 14 (39; 61)
Peso (Kg) média $\pm$ dp	55,2 $\pm$ 14
Peso seco (Kg) média $\pm$ dp	54,7 $\pm$ 13,3
Altura (cm) média $\pm$ dp	158 $\pm$ 0,1
Pressão Diastólica (mmHg) média $\pm$ dp	133 $\pm$ 21,6
Pressão Sistólica (mmHg) média $\pm$ dp	88 $\pm$ 15,6
Hemoglobina (g/dL) média $\pm$ dp	11,7 $\pm$ 1,9
Albumina (mg/dL) média $\pm$ dp	4,1 $\pm$ 0,5
Fósforo (mg/dL) média $\pm$ dp	6,2 $\pm$ 1,7
Creatinina (mg/dL) média $\pm$ dp	8,9 $\pm$ 4,1
Doença de Base (Glomerulares/Não Glomerulares) n %	11; 12 (48; 52)

Através do teste de Spearman, analisou-se a correlação da idade com os demais marcadores, observando-se que não houve correlação estatisticamente significativa. (Tabela 2).

Tabela 2 – Coeficiente de correlação de Spearman dos biomarcadores com a idade nos diferentes momentos de coleta. São Luis, MA, 2008.

Momentos da coleta	Biomarcadores		
	IL- 2	IL- 6	TNF- $\alpha$
Internação	-0,0138	-0,1200	-0,1234
30 dias	-0,1184	-0,1184	0,2463
180 dias	0,0356	0,2625	0,3303

Através do teste de Spearman, analisamos a correlação no momento da internação, dos biomarcadores com a hemoglobina, albumina e fósforo, não sendo encontrada correlação estatisticamente significativa (Tabela 3).

Tabela 3 – Coeficiente de correlação de Spearman dos biomarcadores com parâmetros clínicos. São Luis, MA, 2008

Marcadores na internação	Parâmetros clínicos		
	Hemoglobina	Albumina	Fosforo
Creatinina	0.1063	-0.0229	0.0949
Cistatina-C	0.2276	0.1599	-0.0408
IL- 2	-0.1326	0.0287	0.0316
IL- 6	-0.1804	0.1937	0.2256
Tnf- $\alpha$	-0.1907	-0.0812	-0.0062

Ao compararmos os biomarcadores nos diferentes momentos de coleta dos pacientes transplantados, observou-se que os valores plasmáticos da creatinina e cistatina C apresentaram diferença estatisticamente significativa entre o momento da internação e 30 dias do pós transplante ( $p < 0,0001$ ), e também entre o momento da internação e 180 dias do pós transplante ( $p < 0,0001$ ). Por outro lado, a interleucina 2 apresentou diferença estatisticamente significativa somente entre 30 e 180 dias do pós transplante ( $p = 0,0418$ ) e o TNF- $\alpha$  entre o momento da internação e 30 dias do pós transplante ( $p = 0,0001$ ), não havendo diferença estatisticamente significativa para a IL-6 (Tabela 4).

Tabela 4 - Médias e desvios padrão dos biomarcadores nos diferentes momentos de coleta. São Luis, MA, 2008

Biomarcadores	Indução			
	Internação	30 dias	180 dias	p- valor
Creatinina	8,97( $\pm 4,1$ )	1,5( $\pm 1,2$ )	1,6( $\pm 0,7$ )	$< 0,0001^{*a}$
Cistatina C	6,59( $\pm 1,4$ )	1,6( $\pm 0,85$ )	1,39( $\pm 0,72$ )	$< 0,0001^{*a}$
Interleucina 2	13,47( $\pm 29,1$ )	8,7( $\pm 19,0$ )	4,93( $\pm 7,8$ )	0,0418 <sup>*b</sup>
Interleucina 6	29,87( $\pm 51,7$ )	24,50( $\pm 50,7$ )	50,61( $\pm 130,8$ )	0,7457
TNF- $\alpha$	13,4( $\pm 7,2$ )	4,96( $\pm 3,5$ )	10,35( $\pm 13,1$ )	0,0001 <sup>*c</sup>

\* Significante ao nível de significância de 5%  
<sup>a</sup> Diferença entre internação e 30 dias do pós-TR e internação e 180 dias do pós-TR  
<sup>b</sup> Diferença entre 30 dias e 180 dias pós-TR  
<sup>c</sup> Diferença entre internação e 30 dias pós-TR

Através do teste de Spearman, analisamos a correlação da cistatina C com os demais marcadores, onde observou-se uma correlação negativa estatisticamente significativa da Cistatina C com o TNF- $\alpha$  na internação ( $r = -0,44$ ) e da cistatina C com a IL-6 com 180 dias do pós-transplante ( $r = 0,38$ ) ( Tabela e Figura 3).

Tabela 5 – Coeficiente de correlação de Spearman dos biomarcadores com cistatina C nos diferentes momentos de coleta. São Luis, MA, 2008

Momentos da coleta	Marcadores		
	IL-2	IL-6	TNF- $\alpha$
Internação	-0,1707	-0,1795	-0,4405*
30 dias	-0,1624	0,2791	-0,0486
180 dias	-0,1458	-0,3889*	0,2629

\* Significante ao nível de significância de 5%

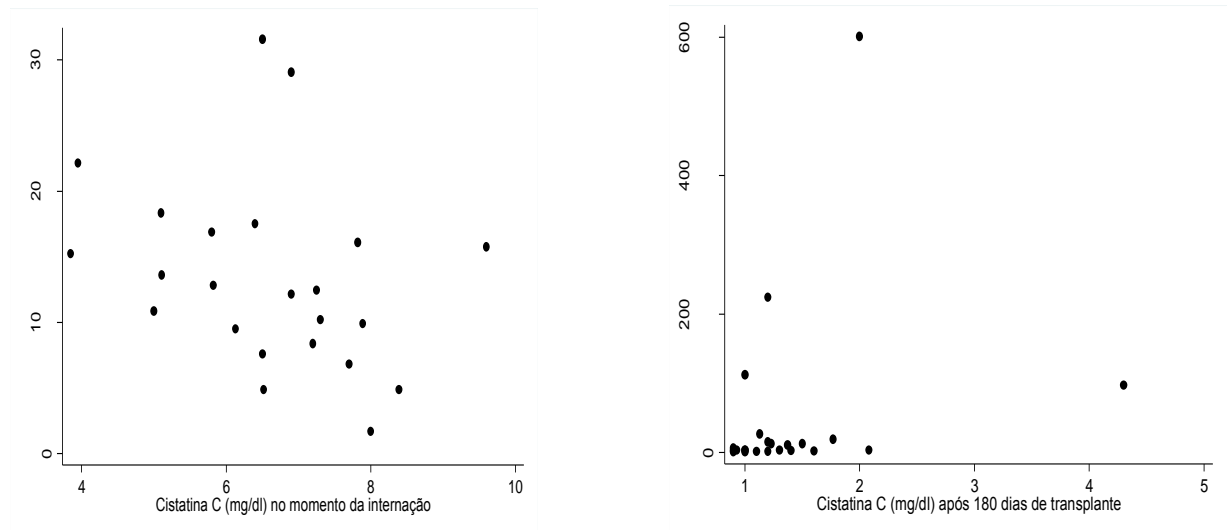


Figura 3 - Teste de correlação de Spearman entre TNF- $\alpha$  e a Cistatina C no momento da internação e Interleucina 6 e Cistatina C seis meses do pós-transplante

Seguidamente, analisamos a correlação da creatinina com os demais biomarcadores, também pelo teste de Spearman, observando-se que não houve correlação estatisticamente significativa da creatinina com os mesmos na internação, com 30 e 180 dias do pós transplante (Tabela 6)



Tabela 6 – Coeficiente de correlação de Spearman dos biomarcadores com creatinina nos diferentes momentos de coleta. São Luis, MA, 2008

Momentos da coleta	Marcadores		
	IL-2	IL-6	TNF- $\alpha$
Internação	-0,0316	0,2462	-0,2634
30 dias	-0,0150	0,1549	0,0085
180 dias	0,0269	-0,0092	0,0945

Entre os pacientes biopsiados e os não biopsiados após o transplante renal, foram comparadas as média das concentrações plasmáticas dos biomarcadores na internação, com 30 e 180 dias do pós-transplante, observando-se somente diferença estatisticamente significativa para os valores séricos de creatinina e cistatina C com 30 ( $p=0,0040$  vs  $p=0,0417$ ) e 180 ( $p=0,0077$  vs  $p=0,0137$ ) dias do pós-transplante (Tabela 8 e Tabela ). Por outro lado os valores séricos da creatinina, cistatina C, IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$ , no pré-transplante, não demonstraram diferença estatisticamente significativa quando se comparou os 8 pacientes biopsiados e os 15 não biopsiados no pós transplante ( Tabela 7 ).

Tabela 7 – Médias e desvios padrão dos marcadores no pré transplante em pacientes biopsiados e não biopsiados após o transplante renal. São Luis, MA, 2008

Biomarcadores	Biópsia		
	Sim (n=08)	Não (n=15)	$p$ - valor
Creatinina	10,26( $\pm 4,9$ )	8,29( $\pm 3,6$ )	0,3329
Cistatina C	6,43( $\pm 1,4$ )	6,68( $\pm 1,4$ )	0,7468
Interleucina 2	15,37( $\pm 31,0$ )	12,45( $\pm 28,9$ )	0,8417
Interleucina 6	41,30( $\pm 66,7$ )	23,76( $\pm 43,2$ )	0,8212
TNF- $\alpha$	15,48( $\pm 10,1$ )	12,29( $\pm 5,17$ )	0,6985

Tabela 8 – Médias e desvios padrão dos marcadores 30 dias após o transplante em pacientes biopsiados e não biopsiados. São Luis, MA, 2008

Biomarcadores	Biópsia		<i>p</i> - valor
	Sim (n=08)	Não (n=15)	
Creatinina	2,29(±4,9)	1,12(±0,3)	0,0040*
Cistatina C	2,11(±1,2)	1,32(±0,3)	0,0417*
Interleucina 2	15,68(±32,1)	4,97(±2,4)	0,5444
Interleucina 6	34,72(±63,9)	19,05(±43,7)	0,6055
TNF-α	5,96(±4,5)	4,41(±2,8)	0,8399

\* Significante ao nível de significância de 5%

Tabela 9 – Médias e desvios padrão dos marcadores em 180 dias após o transplante em pacientes biopsiados e não biopsiados. São Luis, MA, 2008

Biomarcadores	Biópsia		<i>p</i> - valor
	Sim (n=08)	Não (n=15)	
Creatinina	2,1(±0,9)	1,3(±0,3)	0,0077*
Cistatina C	1,83(±1,0)	1,15(±0,2)	0,0137*
Interleucina 2	8,42(±13,0)	3,07(±0,3)	0,5212
Interleucina 6	91,21(±208,5)	28,95(±60,8)	0,9484
TNF-α	16,05(±21,0)	7,30(±4,5)	0,8461

\* Significante ao nível de significância de 5%

Quando comparadas as médias das concentrações plasmáticas dos biomarcadores na internação, com 30 e 180 dias do pós transplante com os grupos de pacientes que receberam indução e os que não receberam após o transplante, não foi observada diferença estatisticamente significativa em nenhum dos momentos (Tabela 10, Tabela 11, Tabela 12).

Tabela 10 - Médias e desvios padrão dos marcadores no momento da internação para o transplante em pacientes que receberam indução e os que não receberam após o transplante renal. São Luis, MA, 2008

Biomarcadores	Indução		<i>p</i> - valor
	Sim (n=08)	Não (n=15)	
Creatinina	10,4(±4,9)	8,2(±3,5)	0,4014
Cistatina C	6,2(±1,1)	6,7(±1,5)	0,3327
Interleucina 2	15,7(±31,0)	12,2(±29,0)	0,9469
Interleucina 6	33,1(±63,4)	28,1(±46,7)	0,6984
TNF-α	13,3(±7,5)	13,4(±7,3)	0,7714

Tabela 11 - Médias e desvios padrão dos marcadores 30 dias após o transplante em pacientes que receberam indução e os que não receberam. São Luis, MA, 2008

Biomarcadores	Indução		p - valor
	Sim (n=08)	Não (n=15)	
Creatinina	2,1(±1,9)	1,2(±0,3)	0,2310
Cistatina C	2,0(±1,2)	1,3(±0,3)	0,2446
Interleucina 2	17,0(±31,5)	4,2(±2,5)	0,1384
Interleucina 6	32,7(±64,5)	20,1(±43,6)	0,8464
TNF- $\alpha$	6,5(±4,8)	4,0(±2,2)	0,3288

Tabela 12 - Médias e desvios padrão dos marcadores 180 dias após o transplante em pacientes que receberam indução e os que não receberam. São Luis, MA, 2008

Biomarcadores	Indução		p - valor
	Sim (n=08)	Não (n=15)	
Creatinina	1,9(±0,9)	1,3(±0,3)	0,0976
Cistatina C	1,7(±1,1)	1,2(±0,3)	0,3471
Interleucina 2	8,8(±12,7)	2,8(±0,8)	0,3183
Interleucina 6	17,7(±32,6)	68,1(±159,4)	0,8460
TNF- $\alpha$	9,6(±12,0)	10,7(±14,0)	0,4002

Ao compararmos as médias e desvios padrão das concentrações plasmáticas dos biomarcadores com 180 dias após o transplante com os grupos de pacientes que tiveram a concentração plasmática de creatinina  $\leq 1,5$  mg/dL e  $> 1,5$  mg/dL (Tabela 13) , além da concentração plasmática de Cistatina C  $\leq 0,95$  e Cistatina C  $> 0,95$  mg/dL, não observou-se diferença estatisticamente significativa (Tabela 14).

Tabela 13 – Médias e desvios padrão dos marcadores com 180 dias após o transplante em pacientes com creatinina  $\leq 1,5$  mg/dL e  $> 1,5$  mg/dL. São Luis, MA, 2008

Marcadores	Creatinina		
	Creat $\leq 1,5$ mg/dL	Creat $> 1,5$ mg/dL	<i>p</i> -valor
	N=15	N=08	
Interleucina 2	3.7 ( $\pm 2.6$ )	7.1 ( $\pm 12.9$ )	0.6178
Interleucina 6	28.3 ( $\pm 61.0$ )	92.3 ( $\pm 208.0$ )	0.4967
TNF- $\alpha$	7.4 ( $\pm 4.6$ )	15.8 ( $\pm 21.1$ )	0.8970

Tabela 14 – Médias e desvios padrão dos marcadores com 180 dias após o transplante em pacientes com Cistatina C  $\leq 0,95$  mg/dL e  $> 0,95$ . São Luis, MA, 2008

Marcadores	Cistatina C		
	Cis-C $\leq 0,95$ mg/dL	Cis-C $> 0,95$ mg/dL	<i>p</i> valor
	N=04	N=19	
Interleucina 2	3.2 ( $\pm 0.09$ )	5.2 ( $\pm 8.5$ )	0.1791
Interleucina 6	3.1 ( $\pm 2.2$ )	60.6 ( $\pm 142.5$ )	0.1796
TNF- $\alpha$	5.3 ( $\pm 1.4$ )	11.4 ( $\pm 14.2$ )	0.4398

Ao analisarmos a correlação dos biomarcadores (IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) entre si, na internação, com 30 e 180 dias do pós transplante, observou-se correlação estatisticamente significativa entre a IL-6 e TNF- $\alpha$ , na internação e com 180 dias do pós transplante ( $r = 0.4586$  e  $r = 0,7683$  respectivamente) (Tabela 15)

Tabela 15 – Coeficiente de correlação de Spearman entre os biomarcadores IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$  nos diferentes tempos da coleta. São Luis, MA, 2008.

Marcadores	Internação			30 dias pós-TR			180 dias pós-TR		
	IL-2	IL-6	TNF- $\alpha$	IL-2	IL-6	TNF- $\alpha$	IL-2	IL-6	TNF- $\alpha$
IL-2 Inter			0.3266						
IL-6 Inter	0.0815								
TNF- $\alpha$ Inter		0.4586*							
IL 2 30 d						0.1474			
IL-6 30 d				0.3504					
TNF- $\alpha$ 30 d					0.2728				
IL 2 180 d									0.2319
IL-6 180 d							0.1543		
TNF- $\alpha$ 180 d									0.7683*

\* Significante ao nível de significância de 5%

## 6. DISCUSSÃO

Os pacientes avaliados neste estudo apresentaram uma média de idade de 34,3 anos ( $\pm$  11,7), concordando com a literatura (14;42;59;60).

Ao analisarmos a correlação da idade com a IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$ , observou-se que não houve correlação com nenhum destes marcadores durante o período deste estudo, resultados contrários ao trabalho de Bohler et al. (61), que avaliou os cofatores que potencialmente influenciam a expressão de biomarcadores imunológicos, explorando a proliferação de células T, ativação de células T (expressão CD25 e CD17) e produção de citocinas pelos linfócitos (IL-2 e TNF- $\alpha$ ) em voluntários saudáveis, pacientes em diálise e pacientes transplantados renais estáveis tratados com terapia imunossupressora padrão. Neste estudo foi observado uma correlação positiva da idade com a expressão de TNF- $\alpha$  em todas as três populações; já na expressão de IL-2 ocorreu correlação positiva com a idade apenas em voluntários saudáveis e pacientes transplantados renais, apontando que a idade exerce diversos efeitos sobre o sistema imune adaptativo, o qual pode modular imunogenicidade de órgãos do doador, quanto a capacidade do receptor para rejeição de órgãos.

Bohler et al. (61), também evidenciou uma diminuição das funções da célula T em pacientes transplantados renais quando comparados com voluntários saudáveis e pacientes em diálise, bem como um aumento da expressão de IL-2 em pacientes em diálise quando comparados com voluntários saudáveis. Da mesma forma, um estudo realizado por Fijter et al (62), demonstrou que rins de doadores idosos exercem um aumento na imunogenicidade associada com uma maior susceptibilidade para perda do enxerto devido a rejeição do transplante e da nefropatia crônica do enxerto.

Segundo registros de Rostaing et al. (63), a membrana de diálise pode eventualmente estimular células T e diferentes membranas de diálise tem diferentes capacidades para estimular expressão de IL-2. Por outro lado, van Riemsdijk-Van overbeeke et al. (64), encontraram que o aumento da expressão de IL-2 e a expressão do receptor de IL-2 sobre as células T, pode não ser afetada. No presente estudo encontramos níveis elevados de IL-2 após a diálise, concordando com os registros de Rostaing et al. (63).

A indução de citocinas pró inflamatória IL-2 durante a diálise pode ser desfavorável no curso precoce depois do transplante renal, porque a elevação da expressão dos níveis de IL-2 em células T pode sensibilizar o sistema imune do receptor em direção ao enxerto. Futuros estudos de monitoramento são necessários para determinar se pacientes com aumento nos níveis de expressão de IL-2 estão em maior risco de experimentar episódios de rejeição (61).

Apesar de não haver realizado um grupo controle com pacientes saudáveis em nosso estudo, os pacientes provenientes da terapia de HD, no pré- transplante apresentavam níveis séricos de IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$  elevados. Estes dados são semelhantes aos estudos de Rysz et al. (65), quando relacionados aos níveis séricos de IL-6 e TNF- $\alpha$ , mas discordam dos achados deste autor quando se referem à IL-2. Rysz et al. (65) avaliaram pacientes em terapia dialítica regular em diferentes tempos (20, 60 e 240 minutos) e em sessão única com o objetivo de comparar os níveis séricos de um painel de citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ) com PCR, tendo como parâmetro pacientes saudáveis. Eles observaram que a concentração de PCR foi maior nos pacientes em HD, quando comparado com controles saudáveis, e que as concentrações de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  estavam

aumentadas, enquanto que os níveis séricos de IL-2 não sofreram alterações durante a sessão de HD.

Pacientes com transplante renal estável com terapia imune padrão tem significativamente menor proliferação de células T, ativação de células T e expressão de IL-2 e TNF- $\alpha$  em células T quando comparados com voluntários saudáveis e pacientes em diálise, uma vez que os inibidores de calcineurina são conhecidos por inibir eficientemente a produção de citocinas e inibidores de monofosfato desidrogenase de eosina são conhecidos por inibir de forma muito eficientemente a proliferação de linfócitos e ambas as drogas de ativação de células T (61).

No presente estudo observou-se uma concentração sérica aumentada de creatinina, cistatina C, IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$  no pré transplante, havendo uma diminuição considerada da creatinina, cistatina C, IL-2, e um aumento da concentração sérica de IL-6 e TNF- $\alpha$  no pós transplante. Chama a atenção o fato da diminuição gradativa dos níveis de IL-2 com 30 e 180 dias do pós transplante, o que não acontece com as outras citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$ , que tiveram seus índices diminuídos 30 dias após o transplante, com normalização apenas do TNF- $\alpha$ , havendo elevação dos mesmos com 180 dias do pós transplante, indicando que IL-6 e TNF- $\alpha$  são marcadores inflamatórios que no pós transplante inicial e a partir de seis meses do pós transplante apresentam comportamentos diferentes. No que se refere ao comportamento das citocinas nos pacientes transplantados renais, os resultados da literatura são controversos. Nossos resultados mostraram que existem similaridades e também diferenças. O motivo para estas discordâncias talvez se deva a diferenças no tipo de paciente estudado, gênero, idade, uso de imunossuppressores, resposta imune alterada com episódios de rejeição ou alguma infecção corrente, sendo necessária uma maior investigação destes marcadores inflamatórios no monitoramento do enxerto.

Nossos resultados são parcialmente semelhantes aos obtidos por Simmons et al. (41). Semelhante no pré transplante para as concentrações de IL-6, TNF- $\alpha$  e quando comparados aos níveis séricos reduzidos de TNF- $\alpha$  após 30 dias do pós transplante, mas diferente para a concentração sérica de IL-6 no pós transplante. Simmons et al. (41) avaliaram 19 pacientes submetidos a transplante renal de doador

vivo em diferentes momentos: 1 semana antes do transplante, 1 semana do pós-transplante e 2 meses do pós-transplante. Foram dosados os seguintes biomarcadores de inflamação e estresse oxidativo: PCR, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , proteínas associadas a conteúdo de carbonyl e F<sub>2</sub> isoprostanes. No pré-transplante, Simmons et al. (41) observaram que os níveis das proteínas pró-inflamatórias IL-6, TNF- $\alpha$ , e PCR, bem como os marcadores de estresse oxidativo de proteínas plasmáticas, carbonyl e F<sub>2</sub> isoprostanes, foram significativamente mais elevados em comparação ao controle. Também foi constatado um declínio rápido e significativo em todos estes biomarcadores após o transplante, sendo mantido por 2 meses, o que reflete a restauração da função renal com diminuição da inflamação crônica e do estresse oxidativo associado com uremia.

Cueto-Manzano et al. (42) compararam os níveis séricos de PCR, IL-6 e TNF- $\alpha$  em 37 pacientes antes e após o transplante renal. Os níveis de PCR tenderam a ser maiores em receptores do que em doadores, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa, existindo uma redução significativa da concentração de PCR em pacientes imediatamente após o transplante. No pré-transplante, os níveis séricos de TNF- $\alpha$  e IL-6 foram significativamente maiores em receptores do que em doadores. Após uma redução inicial em 6 meses do pós-transplante, TNF- $\alpha$  e IL-6 aumentaram ainda mais nos receptores em 12 e 18 meses. Em contraste com os resultados apresentados por Cueto-Manzano et al. (42), o presente estudo não encontrou redução de TNF- $\alpha$  e IL-6 nos receptores, mas sim um aumento desses marcadores a partir de 6 meses do pós transplante.

Cueto-Manzano et al.(42) também encontrou uma correlação positiva para IL-6 e TNF- $\alpha$  no pré transplante, com 12 meses e 18 meses após o transplante. Quando correlacionamos a IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$  entre si, observou-se uma correlação positiva da IL-6 e TNF- $\alpha$  no pré transplante e com 6 meses do pós transplante. Nossos resultados são semelhantes no pré transplante, mas diferentes com 6 meses do pós transplante, quando comparados ao estudo de Cueto Manzano et al.(42). A semelhança no comportamento destas citocinas no pré transplante, com 6, 12 e 18 meses do pós transplante, possivelmente aconteça em decorrência da resposta inflamatória para TNF- $\alpha$  ser mediada diretamente através da estimulação de outras citocinas pró inflamatórias (27).



Comparando as médias da cistatina C, nos diferentes momentos de coleta, observou-se uma diminuição significativa entre a internação e 30 dias do pós transplante ( $p < 0,0001$ ), e entre a internação e 180 dias do pós transplante ( $p < 0,0001$ ). Os dados estão de acordo com a literatura (48;66;67), sendo este fato semelhante para a creatinina. Importante enfatizar que no sexto mês do pós transplante a média de valores para a creatinina tende à elevação (1,6 mg/dL) quando comparada a 30 dias do pós transplante (1,5 mg/dL), ao passo que na cistatina ocorre o inverso (1,6 mg/dL com 30 dias do pós transplante para 1,39 mg/dL com 180 dias do pós transplante). Em estudo realizado por Harada et al. (3), um dos fatores de risco relacionado à perda do enxerto é a função renal no sexto mês do pós transplante, sendo avaliado pela creatinina e utilizando como critério o valor da creatinina  $> 1,5$  mg/dL.

Neste estudo, a redução dos níveis séricos de cistatina C e creatinina com 30 dias do pós transplante demonstra que a cistatina C não sofre interferência em decorrência da diminuição das doses de esteróides neste período, podendo indicar uma alteração na função renal, concordando com o estudo de Geramizadeh et al. (68) que estudaram 60 receptores de transplante renal, no pós transplante imediato, e observaram que a cistatina C é bem correlacionada com o clearance de creatinina depois de cinco dias do pós transplante, e afetada por doses de esteróides durante os cinco dias após o transplante, resultando em altos níveis de cistatina C enquanto a creatinina sérica decresce, sugerindo que durante a primeira semana após o transplante, a creatinina sérica é ainda um bom marcador para avaliar a função renal. Na verdade, o nível de cistatina C é dependente da alta dose de esteróide na primeira semana após o transplante renal e deve ser usado como um marcador de função renal mais tarde.

Singh et al. (69) encontraram uma associação moderada da Cistatina C com a PCR e o fibrinogênio, que não são independentes do clearance de creatinina. Embora não utilizando um padrão-ouro da função renal, seu estudo sugere que a cistatina C capta uma associação da função renal ligeiramente prejudicada com o aumento da inflamação.

Em nosso estudo os marcadores inflamatórios não foram avaliados ao mesmo tempo no período de episódios de disfunção do enxerto de 6 pacientes que apresentaram aumento do nível de creatinina e de 2 com aumento do nível de proteinúria, sendo os mesmos encaminhados para realização de biópsia. Houve resultado confirmatório de apenas um paciente com episódio de rejeição, não ocorrendo diferença dos marcadores quando correlacionados aos esquemas de imunossupressão e indução com Basiliximab e Timoglobulina dos pacientes biopsiados e não biopsiados. Estes dados são semelhantes aos encontrados no estudo de Cueto-Manzano et al. (42). Onde foi observado que nenhum dos marcadores foi significativamente diferente em pacientes que tiveram episódios de rejeição aguda ou nefropatia crônica quando comparados com os pacientes sem esses acontecimentos e que marcadores inflamatórios não foram diferentes quanto ao uso da ciclosporina ou tacrolimus, nem com a indução com daclizumab.

Um estudo conduzido por Karczewski et al. (70) analisou 44 pacientes transplantados renais com e sem rejeição, nos quais foram avaliadas as concentrações séricas de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em amostras coletadas um dia antes e 2, 7, 14 e 30 dias após o transplante. Destes, 11 pacientes desenvolveram episódios de rejeição aguda, sendo observado um maior nível sérico de IFN- $\gamma$  e IL-10 no pré transplante, o que foi associado aos episódios de rejeição aguda. Além disso, não houve diferença em níveis plasmáticos de IL-2, IL-4, IL-5 ou TNF- $\alpha$  entre os dois grupos.

Semelhante ao estudo de Karczewski et al. (70), realizado por um período de 3 meses do pós transplante, nossos resultados demonstraram que, nos pacientes que foram submetidos à biópsia e os que não foram submetidos à biópsia do enxerto, não houve diferença nos níveis séricos de IL-2 e TNF- $\alpha$  no pré transplante e com 30 dias do pós transplante. No entanto, somente 4% (1/23) dos nossos pacientes apresentaram rejeição do enxerto, enquanto o trabalho de Karczewski et al. (70) mostrou uma prevalência de 25% (11/44).

Ozdemir et al. (59) estudaram, em 141 pacientes no pós-transplante renal, aspectos demográficos, clínicos e dados laboratoriais por um período de 5 anos. Os pacientes foram classificados em três grupos a partir da concentração sérica de PCR

em normal, alta intermitente e consistentemente alta. Foi observada respectivamente uma sobrevida do enxerto de 90%, 72,6% e 11,1%. Além disso, a análise de regressão de Cox revelou que a rejeição aguda, a idade avançada do destinatário, e as concentrações séricas consistentemente elevadas de PCR estavam associadas a um risco elevado de perda do enxerto renal.

No estudo de Ozdemir et al. (59) as elevações intermitentes no nível sérico de PCR não foram associadas a um risco aumentado de perda do enxerto. Entretanto, concentrações consistentemente altas de PCR no pós-transplante mostraram um alto valor preditivo negativo para a sobrevida do enxerto. Segundo Ozdemir et al (59) um processo inflamatório no período de 5 anos do pós-transplante, necessitaria de esforços suplementares para controlar a inflamação e prolongar a sobrevida do enxerto. Tais considerações sugerem a investigação em longo prazo de outros marcadores inflamatórios que também consistentemente elevados poderiam comprometer a sobrevida do enxerto renal.

Kukasa et al. (71), pesquisando as alterações inflamatórias de curto prazo que incidiram sobre os rins em um modelo animal singênico de transplante renal, observou que a extensão de infiltração leucocítica alcança seu máximo 24 horas após o transplante e tem correspondência com os níveis de selectina E e P, e que após esse período, a extensão da ativação imunológica diminui gradualmente, mas as alterações histológicas no rim podem ainda ser observadas.

A introdução de novos agentes imunossupressores, particularmente os inibidores da calcineurina (INC), proporcionou expressiva diminuição da incidência de RA, que, dos anteriores 50%, diminuiu para cerca de 10% nos últimos 10 anos, com manutenção desse índice nos últimos quatro e cinco anos. A RA do enxerto renal é evento comum no pós-transplante recente e tardio, e a biópsia renal é o procedimento padrão ouro para o diagnóstico das condições que podem afetar o enxerto. A RA caracteriza-se por endotelite/artrite e inflamação tubulointersticial. A adoção da biópsia renal para o diagnóstico e o seguimento dos episódios de rejeição levou à descrição da histopatologia da RA e ao surgimento de diferentes abordagens diagnósticas (15).

Desde a introdução da classificação de Banff (que tem por objetivo padronizar as diversas lesões estruturais do rim transplantado e estabelecer de modo uniforme e reprodutível para clínicos e patologistas avaliarem os diferentes graus de severidade das rejeições e de outras lesões) para as biópsias renais, as categorias diagnósticas vêm sendo constantemente alteradas. Na última conferência do Banff, em 2007, as principais alterações introduzidas foram a incorporação da entidade “rejeição humoral crônica”, o uso da terminologia “rejeição mediada por células T” e a recomendação de não utilização do termo “nefropatia crônica do transplante”, de modo que as categorias diagnósticas propostas, além da normalidade, são basicamente cinco: rejeição mediada por anticorpos; alterações *borderline*; rejeição mediada por células T; fibrose intersticial e atrofia tubular, sem evidências de etiologia específica e outros (hipertensão, toxicidade a drogas, obstrução crônica, pielonefrite bacteriana, infecção viral) (1;15).

Em nosso estudo, oito dos vinte e três pacientes transplantados, foram submetidos a biópsias, sendo que dois pacientes tiveram o resultado de biópsia normal, três pacientes com nefrotoxicidade medicamentosa aguda, um paciente com rejeição celular e dois pacientes com reincidiva de doença de base. Dezenove pacientes utilizaram como esquema de imunossupressão ICN (Tacrolimus), Micofenolato de Mofetil e Prednisona e quatro pacientes fizeram uso do esquema ICN (Ciclosporina), Azatioprina e prednisona.

Variações inter-individuais ocorrem por sensibilidade a diferentes drogas imunossupressoras como se manifesta por qualquer rejeição ou toxicidade em pacientes com concentração sanguínea da droga dentro do intervalo terapêutico. As citocinas tem o potencial de influenciar diversas respostas imunes e inflamatórias no enxerto. A diferença na produção de citocinas entre indivíduos é intensificada na presença de desligamento do antígeno leucocitário humano (HLA) (72).

Experimentos com alotransplantes têm mostrado que, após a morte cerebral experimental, os índices de rejeição aguda tiveram grande aumento nos receptores de rins provenientes de doadores com morte cerebral. Efeitos semelhantes foram observados em outros órgãos, tais como pulmão e coração. Quando os aloenxertos renais são tratados com ciclosporina para prevenir rejeição aguda, a função renal de

longo prazo é adversamente afetada pela morte cerebral, comparada com transplantes singênicos. Assim, o estado da morte cerebral pode também promover o desenvolvimento de disfunção renal crônica de transplante (24).

Polimorfismos de gens de citocinas têm sido extensivamente explorados no transplante, porque são pensados como possíveis explicações da heterogeneidade e dos resultados do enxerto, sendo auxiliares na individualização da imunossupressão. As variações individuais de polimorfismos de genes de citocinas afetam a suscetibilidade à rejeição do enxerto (14). Pawlik et al (27) demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa na distribuição de genótipos de IL-2 e TNF- $\alpha$  entre pacientes com função estável do enxerto e rejeição crônica do enxerto. Os resultados do estudo sugeriram que a baixa produção de IL 6 geneticamente determinada pode ser um fator de risco no desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto.

Considerando os resultados encontrados neste estudo, entendemos que os marcadores inflamatórios IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$ , comportar-se-iam como uma opção no monitoramento do enxerto renal em longo prazo. Devem-se levar em consideração as limitações apresentadas do estudo, tendo em vista o número reduzido de pacientes estudados, como também, que a observação da Cistatina C, IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$  ocorreu em um curto prazo (180 dias). E, portanto para conclusões definitivas, novos estudos deverão ser realizados.

## 7. CONCLUSÃO

Estudos que possam indicar marcadores de excelência com possibilidades de prever precocemente uma disfunção renal, detectando o início de uma infiltração leucocitária renal tem sido alvo de constantes pesquisas, considerando-se não estar bem definido aquele que seria o melhor marcador.

O presente estudo não demonstrou correlações significativas entre os níveis séricos de cistatina C, IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$  em pacientes transplantados renais em seguimento de curto prazo. Além disso, os níveis séricos de cistatina C foram muito semelhantes aos de creatinina, em contraste com os outros marcadores inflamatórios estudados em pacientes biopsiados e não biopsiados.

Quando comparadas a IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$ , a cistatina C e a creatinina parecem ser bons preditores de disfunção precoce do enxerto em pacientes transplantados e podem ser usadas para estabelecer ações que previnam a perda funcional do enxerto.

Este estudo demonstrou que existe um impacto do transplante renal sobre as concentrações dos marcadores inflamatórios estudados.

## REFERÊNCIAS

- (1) Dias ECA, Camara NOS, Filho APS, Manfro RC. Monitorização molecular da rejeição de transplantes renais. *J Bras Nefrol* 2005; XXVII(2).
- (2) Pagliuso RG, Goloni-Bertollo E, Filho M, Pavarino-Bertelli E. Estresse oxidativo e disfunção crônica do enxerto renal. *Arq Ciênc Saúde* 2006; 13(4):223-227.
- (3) Harada KM, Mandia-Sampaio EL, Sandes-Freitas TV, Felipe CR, Park SI, Pinheiro-Machado PG et al. Risk factors associated with graft loss and patient survival after kidney transplantation. *Transplant Proc* 2009; 41(9):3667-3670.
- (4) Bastos MG. Identificação da doença renal crônica na comunidade. *J Bras Nefrol* 2008; 30(4):232-186.
- (5) Dummer CD, Thome FS, Veronese FV. [Chronic renal disease, inflammation and atherosclerosis: new concepts about an old problem]. *Rev Assoc Med Bras* 2007; 53(5):446-450
- (6) Suassuna PG, Bastos MG. Intermittent doses of statin in hemodialysis patients with spontaneous low LDL cholesterol levels. *Arq Bras Cardiol* 2008; 90(2):104-111.
- (7) Stenvinkel P. Inflammation in end-stage renal disease: the hidden enemy. *Nephrology (Carlton)* 2006; 11(1):36-41.
- (8) Pereira A, Rezende N, Junior A, Teixeira M, Silva A. Citocinas e quimiocinas no transplante renal. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 2009; 31(4):286-296.
- (9) Butani L, Johnson J, Troppmann C, McVicar J, Perez RV. Assessment of pretransplant inflammation in pediatric renal allograft recipients. *Transpl Int* 2005; 18(8):949-953
- (10) Peter J. Transplantation--a medical miracle of the 20th century. *N Engl J Med* 2004; 351(26):2678-2680.
- (11) Zatz R, Romão JE, Jr., Noronha IL. Nephrology in Latin America, with special emphasis on Brazil. *Kidney Int Suppl* 2003;(83):S131-S134.
- (12) Silva RMM, Freitas VM, Paula GMM, Vieira LM, Carvalho MGC, Dusse LMS. Avaliação da Proteína C Reativa (PCR) em Pacientes Transplantados Renais. *NewsLab* 2005; 72:106-112.
- (13) Ianhez LE. Manejo Clínico do Transplante Renal. IN: RIELLA, Miguel Carlos. *Princípios de Nefrologia*. 1996: 657-671.
- (14) Manchanda PK, Mittal RD. Analysis of cytokine gene polymorphisms in recipient's matched with living donors on acute rejection after renal transplantation. *Mol Cell Biochem* 2008; 311(1-2):57-65.

- (15) Sementilli A., David DR, Malheiros D, Visona I, Pegas KL, Franco M et al. Patologia do transplante renal: achados morfológicos principais e como laudar as biópsias. *J Bras Pat Med Lab* 2008; 44(4):293-304.
- (16) Newstead CG, Lamb WR, Brenchley PE, Short CD. Serum and urine IL-6 and TNF-alpha in renal transplant recipients with graft dysfunction. *Transplantation* 1993; 56(4):831-835.
- (17) Waiser J, Budde K, Katalinic A, Kuerzdorfer M, Riess R, Neumayer HH. Interleukin-6 expression after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12(4):753-759.
- (18) Lauzurica R, Pastor MC, Bayes B, Hernandez JM, Bonet J, Dolade M et al. Pretransplant inflammation: a risk factor for delayed graft function? *J Nephrol* 2008; 21(2):221-228.
- (19) Janeway AC, Travers P, Walport M, Capra JD, trad.Machado DC, Canal CW et al. *Imunobiologia: O sistema imunológico na saúde e na doença*. In: Porto Alegre.Artes Médicas Sul, editor. 2000: 509-519.
- (20) Walsh PT, Strom TB, Turka LA. Routes to transplant tolerance versus rejection; the role of cytokines. *Immunity* 2004; 20(2):121-131.
- (21) Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331(6):365-376.
- (22) Rush DN, Jeffery JR, Gough J. Sequential protocol biopsies in renal transplant patients. Clinico-pathological correlations using the Banff schema. *Transplantation* 1995; 59(4):511-514.
- (23) Mota A. [Acute rejection in cadaveric renal transplantation under cyclosporine based therapy. Analysis of the risk factors and its influence on chronic dysfunction]. *Acta Med Port* 2004; 17(1):8-14.
- (24) Bos EM, Leuvenink HG, van Goor H, Ploeg RJ. Kidney grafts from brain dead donors: Inferior quality or opportunity for improvement? *Kidney Int* 2007; 72(7):797-805
- (25) Djoba Siawaya JF, Roberts T, Babb C, Black G, Golakai HJ, Stanley K et al. An evaluation of commercial fluorescent bead-based luminex cytokine assays. *PLoS One* 2008; 3(7):e2535-186.
- (26) Leitão TG, Nezu C, Oliveira IB, Noronha IL. Revisão/Atualização em Transplante Renal: Mecanismos efetores da resposta imune na rejeição aguda ao aloenxerto renal. *JBN* 1998; 20(4):496-500.
- (27) Pawlik A, Domanski L, Rozanski J, Florczak M, Wrzesniewska J, Dutkiewicz G et al. The cytokine gene polymorphisms in patients with chronic kidney graft rejection. *Transpl Immunol* 2005; 14(1):49-52.
- (28) Vincenti F, Kirkman R, Light S, Bumgardner G, Pescovitz M, Halloran P et al. Interleukin-2-receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in



- renal transplantation. Daclizumab Triple Therapy Study Group. *N Engl J Med* 1998; 338(3):161-165.
- (29) Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 1990; 8:253-278.
- (30) Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 1997; 2:d12-d26
- (31) Gehrke J, Pereira RZ. Associação do fator de necrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ) com a obesidade. *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento* 2007; 1:1.
- (32) Qi C, Pekala PH. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in adipocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 223(2):128-135.
- (33) Beutler B, Mahoney J, Le Trang N, Pekala P, Cerami A. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med* 1985; 161(5):984-995
- (34) Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 1985; 230(4726):630-632.
- (35) Magro MCS, Vattimo MFF. Avaliação da função renal: creatinina e outros biomarcadores. *Rev bras ter intensiva* 2007; 19(2).
- (36) Devarajan P. Emerging biomarkers of acute kidney injury. *Contrib Nephrol* 2007; 156:203-212
- (37) Ho E, Fard A, Maisel A. Evolving use of biomarkers for kidney injury in acute care settings. *Curr Opin Crit Care* 2010; 16(5):399-407.
- (38) Silverstein DM. Inflammation after renal transplantation: Role in the development of graft dysfunction and potential therapies. *Journal of organ dysfunction* 2009; 5(4):233-241.
- (39) Abedini S, Holme I, Marz W, Weihrauch G, Fellstrom B, Jardine A et al. Inflammation in renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4(7):1246-1254
- (40) Shlipak MG, Katz R, Cushman M, Sarnak MJ, Stehman-Breen C, Psaty BM et al. Cystatin-C and inflammatory markers in the ambulatory elderly. *Am J Med* 2005; 118(12):1416.
- (41) Simmons EM, Langone A, Sezer MT, Vella JP, Recupero P, Morrow JD et al. Effect of renal transplantation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in end-stage renal disease patients. *Transplantation* 2005; 79(8):914-919.
- (42) Cueto-Manzano AM, Morales-Buenrostro LE, Gonzalez-Espinoza L, Gonzalez-Tableros N, Martin-Del-Campo F, Correa-Rotter R et al. Markers of inflammation before and after renal transplantation. *Transplantation* 2005; 80(1):47-51

- (43) Bonventre JV. Pathophysiology of acute kidney injury: roles of potential inhibitors of inflammation. *Contrib Nephrol* 2007; 156:39-46
- (44) Prates AB, Amaral FB, Vacaro MZ, Camargo JL, Silveir SP. Avaliação da Filtração Glomerular através da medida da Cistatina C sérica. *J Bras Nefrol* 2007; XXIX.
- (45) Lofberg H, Grubb AO. Quantitation of gamma-trace in human biological fluids: indications for production in the central nervous system. *Scand J Clin Lab Invest* 1979; 39(7):619-626.
- (46) Finney H, Newman DJ, Price CP. Adult reference ranges for serum cystatin C, creatinine and predicted creatinine clearance. *Ann Clin Biochem* 2000; 37 ( Pt 1):49-59.
- (47) Laterza OF, Price CP, Scott MG. Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate? *Clin Chem* 2002; 48(5):699-707.
- (48) Christensson A, Ekberg J, Grubb A, Ekberg H, Lindstrom V, Lilja H. Serum cystatin C is a more sensitive and more accurate marker of glomerular filtration rate than enzymatic measurements of creatinine in renal transplantation. *Nephron Physiol* 2003; 94(2):19-27
- (49) Herget-Rosenthal S, Feldkamp T, Volbracht L, Kribben A. Measurement of urinary cystatin C by particle-enhanced nephelometric immunoassay: precision, interferences, stability and reference range. *Ann Clin Biochem* 2004; 41(Pt 2):111-118.
- (50) Newman DJ. Cistatina C como marcador de la velocidad de Filtración Glomerular. *Acta Bioquim Clín Latinoam* 2003; 37(1).
- (51) Okay TS. [Cystatin C: A new marker for children kidney function] *Rev Assoc Med Bras* 2002; 48(2):112-113.
- (52) Zahran A, El Hussein A, Shoker A. Can cystatin C replace creatinine to estimate glomerular filtration rate? A literature review. *Am J Nephrol* 2007; 27(2):197-205.
- (53) Leach TD, Kitiyakara C, Price CP, Stevens JM, Newman DJ. Prognostic significance of serum cystatin c concentrations in renal transplant recipients: 5-year follow-up. *Transplant Proc* 2002; 34(4):1152-1158.
- (54) Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2002; 40(2):221-226
- (55) Galteau MM, Guyon M, Gueguen R, Siest G. Determination of serum cystatin C: biological variation and reference values. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39(9):850-857.

- (56) Payn MM, Webb MC, Lawrence D, Lamb EJ. Serum Cystatin C as a Marker of Kidney Dysfunction in an Elderly Population. *Clinical Chemistry* 2002; 48(7):1138-1140.
- (57) Sesso R, Lopes AA, Thomé FS, Bevilacqua JL, Junior JER, Lugon J. Relatório do censo brasileiro de diálise. *J Bras Nefrol* 2008; 30(4):233-238.
- (58) Sesso RCC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Burdmann EA. Censo Brasileiro de Diálise, 2009. *J Bras Nefrol* 2010; 32(4).
- (59) Ozdemir NF, Elsurer R, Ibis A, Arat Z, Haberal M. Serum C-reactive protein surge in renal transplant recipients: link with allograft survival. *Transplant Proc* 2007; 39(4):934-937.
- (60) Akbas SH, Yavuz A, Tuncer M, Ruhi C, Gurkan A, Cetinkaya R et al. Serum cystatin C as an index of renal function in kidney transplant patients. *Transplant Proc* 2004; 36(1):99-101
- (61) Bohler T, Canivet C, Nguyen PN, Galvani S, Thomsen M, Durand D et al. Cytokines correlate with age in healthy volunteers, dialysis patients and kidney-transplant patients. *Cytokine* 2009; 45(3):169-173
- (62) de Fijter JW, Mallat MJ, Doxiadis II, Ringers J, Rosendaal FR, Claas FH et al. Increased immunogenicity and cause of graft loss of old donor kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(7):1538-1546
- (63) Rostaing L, Peres C, Tkaczuk J, Charlet JP, Bories P, Durand D et al. Ex vivo flow cytometry determination of intracytoplasmic expression of IL-2, IL-6, IFN-gamma, and TNF-alpha in monocytes and T lymphocytes, in chronic hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2000; 20(1):18-26.
- (64) van Riemsdijk-van Overbeeke IC, Baan CC, Knoop CJ, Loonen EH, Zietse R, Weimar W. Quantitative flow cytometry shows activation of the TNF-alpha system but not of the IL-2 system at the single cell level in renal replacement therapy. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(7):1430-1435.
- (65) Rysz J, Banach M, Cialkowska-Rysz A, Stolarek R, Barylski M, Drozd J et al. Blood serum levels of IL-2, IL-6, IL-8, TNF-alpha and IL-1beta in patients on maintenance hemodialysis. *Cell Mol Immunol* 2006; 3(2):151-154.
- (66) Kocak H, Oner-Iyidogan Y, Gurdol F, Kocak T, Nane I, Genc S. Cystatin-C and creatinine as indices of glomerular filtration rate in the immediate follow-up of renal transplant patients. *Clin Exp Med* 2005; 5(1):14-19.
- (67) Le Bricon T, Thervet E, Froissart M, Benlakehal M, Bousquet B, Legendre C et al. Plasma cystatin C is superior to 24-h creatinine clearance and plasma creatinine for estimation of glomerular filtration rate 3 months after kidney transplantation. *Clin Chem* 2000; 46(8 Pt 1):1206-1207.

- (68) Geramizadeh B, Azarpira N, Ayatollahi M, Rais-Jalali GA, Aghdai M, Yaghoobi R et al. Value of serum cystatin C as a marker of renal function in the early post kidney transplant period. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2009; 20(6):1015-1017.
- (69) Singh D, Whooley MA, Ix JH, Ali S, Shlipak MG. Association of cystatin C and estimated GFR with inflammatory biomarkers: the Heart and Soul Study. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(4):1087-1092.
- (70) Karczewski J, Karczewski M, Glyda M, Wiktorowicz K. Role of TH1/TH2 cytokines in kidney allograft rejection. *Transplant Proc* 2008; 40(10):3390-3392.
- (71) Kusaka M, Pratschke J, Wilhelm MJ, Ziai F, Zandi-Nejad K, Mackenzie HS et al. Activation of inflammatory mediators in rat renal isografts by donor brain death. *Transplantation* 2000; 69(3):405-410.
- (72) Manchanda PK, Kumar A, Sharma RK, Goel H, Mittal RD. Association of pro/anti-inflammatory cytokine gene variants in renal transplant patients with allograft outcome and cyclosporine immunosuppressant levels. *Biologics* 2008; 2(4):875-884.

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO**

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa que irá investigar através de exames de sangue e urina, realizados no período de sua internação para a realização de transplante de rim e seis meses após o transplante, com a finalidade de verificação da eficácia da CISTATINA C, como um marcador de função renal em pacientes transplantados. Esta pesquisa ajudará a saber mais sobre a CISTATINA C como marcador de função renal em transplantados renais, considerando-se os esquemas tríplexes de imunossupressão com os medicamentos utilizados.

**Título da Pesquisa:** Eficácia da Cistatina C como marcador de função renal em pacientes transplantados no Hospital Universitário em São Luís –MA

#### **Justificativa / Objetivos**

Estudos em pacientes com transplantes estáveis tem indicado que a Cistatina C distingue um anormal nível de filtração glomerular, mais sensivelmente que a creatinina. Será investigada a importância de um monitoramento por Cistatina C, em pacientes aptos ao transplante e transplantados em períodos alternados, como no pré-transplante, estendendo-se até seis meses do pós transplante e desta forma avaliar a eficácia da Cistatina C em relação aos marcadores tradicionais (creatinina sérica, clearance de creatinina e taxa de filtração glomerular), considerando-se quatro esquemas de imunossupressão utilizados.

#### **Participação do voluntário**

Você se quiser participar dessa pesquisa, será realizada uma avaliação pré-transplante à partir de seu prontuário, onde serão analisadas pelo médico as sorologias, função hepática, função renal, função cardíaca, exames de imagem, compatibilidade HLA e crossmatch. No ato de sua internação para a realização do transplante e após o transplante, serão coletadas amostras de sangue e urina em seis momentos distintos, sendo a primeira coleta na internação e as outras no 4º, 15º, 30º, 60º e 180º dias.

Você vai ter o direito de:

1. Participar dessa pesquisa se quiser
2. Terá a garantia de sigilo, o que assegura a privacidade das informações
3. Você não vai ter nenhum outro material a coletar, além de sangue e urina, que será realizada por equipe treinada para esta finalidade

4. Apesar dessa pesquisa incluir coleta de sangue (o que poderia causar algum desconforto e urina, tais procedimentos já fazem parte da rotina dos pacientes transplantados, para serem avaliados os riscos de rejeição do enxerto
5. O resultado das análises será encaminhado para o seu médico e você receberá explicações a respeito destes
6. Você não vai gastar nada com essa pesquisa, por que o material será coletado durante a sua permanência no hospital e quando você vier fazer a avaliação de controle
7. Esta pesquisa vai ajudar você, porque nós vamos realizar exames importantes na avaliação do índice de filtração glomerular do rim que você recebeu
8. A sua ajuda nessa pesquisa será muito importante para as pessoas detectarem mais precocemente quando estiverem com o seu rim comprometido
9. Você não será exposto a situações de vexames, tendo toda a liberdade de recusar sua participação nesta pesquisa, bem como retirar seu consentimento a qualquer momento, sem penalidade ou prejuízo
10. Você pode fazer qualquer pergunta que tiver vontade.

Pesquisador responsável: José de Ribamar Oliveira Lima

Profissão: Farmacêutico-Bioquímico

Endereço: Residencial Turquês, nº 29, Anil

Telefone: 32441348 / 99766025

e-mail: [Ribamarjr@hotmail.com](mailto:Ribamarjr@hotmail.com)

Comitê de Ética em Pesquisa

Coordenador: Wildoberto Gurgel

Endereço: Rua Barão de Itapary, 227, Centro

Telefone: 2109-1223

São Luís - MA, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

Assinatura e carimbo do pesquisador responsável

---

Assinatura do participante ou responsável

## ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
COMITÊ ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer N° **322/06**

Pesquisador (a) Responsável: **Luiz Alberto Simeoni**

Equipe executora: **José de Ribamar Oliveira Lima**

Tipo de Pesquisa: **Doutorado**

Registro do CEP: **202/06** Processo N° **33104-673/2006**

Instituição onde será desenvolvido: **Hospital Universitário Presidente Dutra- Unidade de Transplante**

Grupo: **III**

Situação: **APROVADO**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão analisou na sessão do dia **20.10.2006** o processo N° **33104-673/2006**, referente ao projeto de pesquisa: **“Eficácia da cistatina C como marcador de função renal, em pacientes transplantados no Hospital Universitário Presidente Dutra em São Luis-MA”**, tendo como pesquisador responsável **Luiz Alberto Simeoni**, cujo objetivo geral é **“Analisar se a concentração de cistatina C serica pode funcionar como marcador eficaz do índice de filtração Glomerular em pacientes submetidos a transplante renal no Hospital Universitário de São Luis do Maranhão”**. Na metodologia: trata-se de um estudo descritivo, prospectivo. Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, somos de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO**, pois o mesmo atende aos requisitos fundamentais da Resolução 196/96 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Lembramos a V.S<sup>a</sup> que o sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalidade alguma e sem prejuízo ao seu cuidado, e deve receber uma cópia do TCLE, na íntegra, por ele assinado. O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata. O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à ANVISA, quando for o caso, junto com seu posicionamento. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em 20/10/2007 e ao término do estudo, gravado em CD ROM..

São Luis, 20 de outubro de 2006.

  
**Wildoberto Batista Gurgel**  
Coordenador do CEP

Ethica homini habitat est

Comitê de Ética em Pesquisa  
do Hospital Universitário da UFMA  
aprovado em reunião de:

20/10/06.

**Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão**

Rua Barão de Itapary, 227 Centro C.E.P. 65. 020-070 São Luis – Maranhão Tel: (98) 3219-1223  
E-mail huufma@huufma.br

**ANEXO B - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA BRASÍLIA MÉDICA:****CYSTATIN C: A MARKER OF RENAL FUNCTION IN TRANSPLANT PATIENTS****CISTATINA C: UM MARCADOR DE FUNÇÃO RENAL EM PACIENTES TRANSPLANTADOS****José de Ribamar Oliveira Lima<sup>1</sup>; Teresa Cristina Alves Ferreira<sup>2</sup>; Maria Inês Gomes de Oliveira<sup>3</sup>; Natalino Salgado Filho<sup>4</sup>;**

1Doutorando em Ciências da Saúde pela Universidade de Brasília

2Doutoranda em Nefrologia pela Universidade Federal de Juiz de Fora

3Mestranda em Ciências da Saúde pela Universidade Federal do Maranhão

4Doutor em Nefrologia pela UNIFESP

Correspondência: José de Ribamar Oliveira Lima

Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão – Serviço de Nefrologia

Rua Barão de Itapary, nº 227, Centro – 65020070, São Luís, MA, Brasil,

Telefone 5598-21091284

Fax 55982109-1194

E-mail: [ribamarjr@hotmail.com](mailto:ribamarjr@hotmail.com)



## ABSTRACT

Assessment of renal function in patients submitted to kidney transplantation is of great importance in clinical practice, and the glomerular filtration rate (GFR) is used as an indicator for this purpose. Measurement of serum creatinine is the most widely used method for the estimation of GFR. However, the disadvantages of this method are physiological and analytical influences (e.g., muscle mass, gender, certain antibiotics, bilirubin, ketones) with the assay and inadequate sensitivity for the early detection of small declines in GFR. Cystatin C is a nonglycosylated low molecular weight (13 kDa) protein of the superfamily of cysteine proteinase inhibitors, which is constantly produced by all nucleated cells. Due to its low molecular weight, cystatin C is freely filtered by the renal glomeruli and then almost completely reabsorbed and metabolized in the proximal tubules without interference from other low molecular weight proteins, thus permitting its use as a good marker of glomerular filtration. We present here a review of studies published so far regarding the use of cystatin C as a promising marker for the assessment of glomerular filtration in renal transplant patients.

Key words: Cystatin C, kidney transplantation, Glomerular filtration, Marker

## RESUMO

A avaliação da função renal em pacientes submetidos à transplante renal é de grande importância na prática clínica, sendo utilizada para este fim como indicador a medida da taxa de filtração glomerular (TFG). A determinação da creatinina sérica é o procedimento mais utilizado para esta avaliação, porém apresenta inconvenientes tais como, interferências na dosagem e não possuir sensibilidade adequada para detectar precocemente pequenos declínios na velocidade de filtração glomerular. A cistatina C é uma proteína não glicosilada de baixo peso molecular (13KDa), produzida constantemente em todas as células nucleadas, pertencente à superfamília das proteínas inibidoras da cisteína proteinase, livremente filtrada pelos glomérulos renais devido ao seu baixo peso molecular, sendo a seguir quase que totalmente reabsorvida e metabolizada nos túbulos proximais, não sofrendo influência de outras proteínas de baixo peso molecular, o que permite sua utilização como um bom marcador da filtração glomerular. Esta revisão aborda o uso da cistatina C como marcador promissor de avaliação da filtração glomerular em pacientes transplantados renais, a partir de estudos até o momento realizados nesta população

Palavras-chave: Cistatina C, Transplante renal, Filtração glomerular, Marcador

## INTRODUCTION

The developed world is suffering from an epidemic of a broad spectrum of kidney diseases which has only been begun to be understood. The aging of the population is accompanied by a parallel increase in degenerative chronic diseases, including chronic kidney disease (CKD). In this respect, renal failure affects only a minority of the total population with kidney disease, but is the most visible.<sup>1,2</sup>

CKD is defined as the presence of true kidney damage and/or a glomerular filtration rate (GFR) of 60 mL/min/1.73m<sup>2</sup> or less for at least 3 months, irrespective of the underlying etiology of kidney damage.<sup>1,3</sup> Estimation of glomerular filtration (GF) is an excellent method to assess renal function, and since a reduction in GFR precedes the occurrence of symptoms related to renal failure. Thus, monitoring changes in GF permits to estimate the rhythm of renal function loss. In addition, the clinical application of GF estimation permits to predict the risks of complications of CKD, as well as adequate dose adjustment in the case of drugs excreted through the kidneys by GF.<sup>4</sup>

Renal function is generally evaluated by the quantification of a glomerular marker that should be eliminated or cleared from the organism by the mechanism of GF. In routine laboratory assessment, urea, serum creatine and creatinine clearance are used as the main markers of renal function. Urea and creatinine are the most extensively used and studied endogenous markers for the clinical assessment of GF. However, the production of these markers is influenced by a series of factors, such as muscle mass and protein ingestion; in addition, interferences with the creatinine assay have been reported.<sup>3,5,6</sup>

GF cannot be directly estimated. However, if a substance presents a stable plasma concentration, is freely filtered by the renal glomeruli, and is not secreted,

reabsorbed, metabolized or synthesized by the kidney, its filtered concentration is equal to the amount excreted in urine. An ideal endogenous marker of GFR should have a constant production rate, be eliminated from the circulation by GF only, be filtered freely by the glomeruli, and should not be secreted or reabsorbed by the distal or proximal renal tubules. Measurements of creatinine clearance in 24-hour urine samples and of serum creatinine have been the methods most widely used over the past years for the estimation of GF; however, these methods present practical limitations.<sup>7,8</sup>

Various exogenous substances can also be used to estimate GF. The gold standard for the assessment of renal function is GFR estimated from the renal clearance of exogenous markers such as inulin or a labeled radioisotope (e.g., Cr-EDTA). Inulin, considered to be the gold standard, and Cr-EDTA are markers of GF whose pharmacokinetic characteristics are close to ideal. However, several practical considerations have restricted the clinical application of these markers, such as their intravenous administration, assays that require complex reagents and/or equipment, and high costs.<sup>5</sup> Therefore, these methods are only appropriate in highly specialized experimental studies or clinical trials since they are time consuming, expensive, require special equipment, and have potentially significant side effects. Furthermore, both inulin and iothalamate contrast can cause severe complications such as anaphylactic reactions.<sup>9</sup>

Urea was the first endogenous substance used for the assessment of renal function, whose concentration was measured in serum. Urea is the main nitrogenated product of protein catabolism in humans, accounting for more than 75% of excreted non-protein nitrogen. The intense tubular processing of urea may lead this marker of renal function to underestimate GF capacity. Urea presents few of the characteristics

of an ideal marker, with its production being variable and widely dependent on protein ingestion. Although 25% of the urea produced is metabolized in the intestine, the resulting ammonia is reconverted into urea. Thus, most urea is finally excreted by the kidneys. Due to its small molecular weight, urea is freely filtered by the glomeruli. However, urea can be reabsorbed and the amount of tubular resorption is variable.<sup>3,5,10</sup>

Although creatinine is the marker most frequently employed for the assessment of GF, its use is associated with a number of problems, particularly in children. The production of creatinine is related to muscle mass. As a consequence, serum creatinine levels may vary with growth irrespective of changes in GFR. In addition, tubular secretion of creatinine proportionally increases with decreasing GFR. Therefore, measurement of creatinine clearance may result in the overestimation of GFR. The use of serum creatinine for the assessment of GF is limited because this variable is affected by GF-independent factors such as age, gender, race, body surface area, diet, drugs, and differences in laboratory methods, as well as 24-hour urine collection due to sampling errors and daily variations in creatinine excretion.<sup>7,5,11,12</sup> Therefore, the National Kidney Foundation (NKF) has published guidelines for laboratories recommending the information of GFR based on serum creatinine, age, gender and race, and eliminating the use of 24-hour urine collection for the estimation of GFR. According to the NKF, the measurement of creatinine alone is not the most accurate method to estimate the degree of renal function and equations taking into account factors other than serum creatinine are necessary.<sup>3,12,13</sup>

Serum creatinine is commonly used as a marker of GF. However, it does not precisely reflect GF, especially in renal transplant recipients. In addition, physical activity, muscle mass, protein passage and tubular secretion influence the

concentration of serum creatinine. Similarly, the Cockcroft-Gault formula based on creatinine does not resolve this disadvantage and, therefore, alternative approaches have been tested to increase the accuracy of GFR estimation. Recently, the so-called Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) population study has established a formula based on four parameters, which was found to be an excellent equation for the estimation of GFR. Therefore, the NKF has proposed this equation for the classification of CKD.<sup>14</sup> However, these equations were mainly developed and tested in CKD patients under conservative treatment, with few studies determining the validity of these equations in other groups of patients such as renal transplant recipients.<sup>15,16</sup>

Serum cystatin C has recently been introduced as a new marker for the estimation of GFR and has shown a higher diagnostic value than serum creatinine in the detection of a reduced GFR.

### History of cystatin C

Cystatin C was discovered in 1961 as gamma-trace in an electrophoretic band of cerebrospinal fluid and was also identified in urine in the same year. The first immunoassay for the quantification of cystatin C was developed by Lofberg and Grubb in 1979. This assay was a lengthy competitive immunoradiometric assay with a detection limit of 30 µg/L, which was more than sufficient to detect cystatin C in serum of healthy subjects and to permit studies of cystatin C reference values. In 1985, the strong inverse correlation of serum cystatin C with glomerular function was demonstrated for the first time.<sup>3,17,18</sup>

### Physiology

Cystatin C is a member of the superfamily of cysteine protease inhibitors and is considered to be the most important physiological inhibitor of endogenous cysteine proteases. Cystatin C is a low molecular weight (13 kDa) protein constantly produced by nucleated cells, which is freely filtered by the glomeruli and reabsorbed and catabolized, but not secreted, by renal tubules. In the presence of normal renal function, tubular resorption and catabolism of cystatin C are almost complete and the protein is only detected in small amounts in urine. In healthy subjects, urinary cystatin C measured by radial immunodiffusion is less than 0.30 mg/L. Increased urinary cystatin C levels were noted especially in renal disorders such as tubular damage associated with Chinese herbs, HIV-induced nephropathy and acute interstitial nephritis. Cystatin C does not suffer interference from other low molecular weight proteins such as retinol-binding protein and beta(2)-microglobulin, which are also used for the assessment of GF capacity during severe malnutrition and inflammatory and infectious processes.<sup>3,8,19,20,21,22</sup>

#### Methods for the measurement of cystatin C

Although the first studies regarding cystatin C date back to 1985, an adequate technique for the automatic measurement of cystatin C was only introduced in 1994 after various attempts at standardization. This assay was the result of the simultaneous development of two immunofluorescence techniques using latex particles (PETIA, particle-enhanced turbidimetric immunoassay). These two assays, which used the same antibody and calibrator but different particles, yielded extremely concordant results. This assay was soon followed by the development of a particle-enhanced nephelometric immunoassay (PENIA) using the Behring nephelometric

systems. PENIA and PETIA provided the basis for four commercially available techniques for the determination of cystatin C.<sup>8,22</sup>

Most clinical assessments are performed using these two automated immunonephelometric and immunoturbidimetric assays, which are both very rapid and sensitive and can and should be included in the routine of clinical laboratories that attend all types of patients, especially children. Cystatin C can be measured in small volumes (25  $\mu$ L) of either serum or plasma. This test does not suffer interference from the yellow pigment found in sera of highly jaundiced patients. However, cystatin C is influenced by intense lipemia and hemolysis.<sup>22</sup> PENIA is performed with the Siemens BN II nephelometer, which requires 80  $\mu$ L of a plasma sample. The duration of the assay is 6 minutes and the intra- and interassay coefficients of variation are 1.8 and 1.1%, respectively.<sup>3</sup> In a meta-analysis, Dharnidharka et al<sup>23</sup> found that the immunonephelometric assay is superior to the turbidimetric assay for the analysis of cystatin C, with the observation of higher correlation coefficients in studies using the immunonephelometric assay (14 studies) compared to other techniques (21 studies).

PENIA produces slightly lower reference values than PETIA, but there is still no consensus. Comparisons between the results of different studies are difficult because of the use of different analytical methods, calibration, antisera and variations in patient age. One advantage of the Dako PETIA is that the assay can be performed with any automated spectrophotometer or clinical analyzer, whereas PENIA was only developed for analyzers from the same manufacturer. There is agreement between various authors that reference values can be the same for men and women, although some investigators have described higher reference values for males.<sup>3,8</sup>

A differentiation between ages has been suggested, but there is still no consensus for a cut-off (50 or 65 years) since cystatin C concentration increases with



age, whereas GF decreases in parallel. Previous studies have reported that renal volume decreases from 20 to 30% in the fourth decade of life to 40% in the eighth decade.<sup>3</sup> Galteau et al proposed a low reference range (0.63 to 1.03 mg/L) for subjects older than 60 years. Finney et al, studying 398 subjects ranging in age from 65 to 101 years, suggested markedly higher reference limits (0.93 to 2.68 mg/L) for the group aged 60 to 79 years, and a range of 1.07 to 3.35 mg/L for the group aged 80 years<sup>24</sup>.

### Cystatin C concentration and renal function in transplant patients

In renal transplant patients, early detection of impaired kidney function is critical so that efforts to prevent further deterioration of graft function or rejection can be instituted. Because serum creatinine has a smaller intra-individual variability than cystatin C, it is postulated that serum creatinine will more reliably detect small changes in GFR and therefore will be better able to identify those at risk of acute transplant rejection<sup>25</sup>.

From their preliminary study of renal transplant patients, Le Bricon et al. however found that cystatin C was more sensitive than serum creatinine for detecting decreases in GFR and delayed graft function, with the potential for more timely intervention<sup>26</sup>. Follow-up studies have found GFR over-estimation of 30% and 40% by plasma creatinine and 24-hour creatinine clearance respectively.<sup>77</sup> Even though cystatin C underestimated GFR by 14% it was still more sensitive in detecting impaired renal function (GFR cut-off <80 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>) than serum creatinine and creatinine clearance, with no false-negative results<sup>27</sup>.

Krieser et al<sup>11</sup> studied 19 pediatric renal transplant recipients (15 boys and 4 girls) ranging in age from 8.35 to 19.06 years (median of 13.52 years) over a period of

18 months. <sup>99m</sup>Tc-DPTA GFR measurement were simultaneously compared with measurements of cystatin C and serum creatinine. The correlation coefficients for the relationship of creatinine to <sup>99m</sup>Tc-DPTA GFR and of cystatin C to <sup>99m</sup>Tc-DPTA GFR were 0.64 and 0.58, respectively. The authors concluded that there was no significant difference between serum cystatin C and serum creatinine and that, due to the higher cost of cystatin C measurement compared to creatinine, the former offers no advantage in the monitoring of renal function in pediatric renal transplant recipients. Visvardis et al<sup>28</sup> evaluated 18 transplant patients ranging in age from 31 to 67 years with stable renal function in the 6th postoperative month and without changes in the immunosuppressor regimen. Cystatin C, creatinine and GF estimated by creatinine clearance, the Cockcroft-Gault formula and the MDRD equation were measured. Cystatin C was significantly correlated with creatinine clearance ( $r = -0.768$ ), Cockcroft-Gault ( $r = 0.854$ ), serum creatinine ( $r = 0.629$ ) and MDRD ( $r = 0.604$ ). According to Leach et al<sup>29</sup> who studied 21 renal transplant recipients (16 men and 5 women) ranging in age from 21 to 71 years (mean of 51 years) over a period of 5 years, serum cystatin C is a promising marker of GFR during renal transplant follow-up, with this marker more rapidly detecting immediate post-transplant complications than serum creatinine. However, the authors pointed out the small number of patients included, with further studies being necessary to confirm whether cystatin C levels predict graft complications and their relationship with other factors.

The study by Akbas et al<sup>30</sup> evaluated 75 stable renal transplant patients with a mean age of  $34 \pm 10.23$  years. Serum cystatin C, beta(2)-microglobulin and creatinine concentrations were determined in individual blood samples and creatinine clearance was measured in 24-hour urine samples. Cystatin C and beta(2)-microglobulin were significantly correlated with creatinine ( $r = 0.648$ ,  $P < 0.05$  and  $r = 0.578$ ,  $P < 0.05$ ,

respectively). Inverse creatinine was superior to cystatin C and beta(2)-microglobulin when renal function equations were used ( $r = 0.95$ ,  $P < 0.05$ , according to MDRD;  $r = 0.87$ ,  $P = 0.05$ , according to Cockcroft-Gault). The authors concluded that serum creatinine is a more effective marker than serum cystatin C for the assessment of renal function. Koçak et al<sup>31</sup> evaluated the impact of cystatin C, creatinine, C-reactive protein and amyloid A as markers of the degree of renal function on the third and seventh day after transplantation in 35 renal transplant recipients (21 men and 14 women). Serum cystatin C and creatinine levels on the third and seventh post-transplant days were lower than pretransplant values ( $P \leq 0.001$ ). However, no significant differences in cystatin C or creatinine levels were observed between the third and seventh day after transplantation. The creatinine/cystatin C ratio was reduced on the third day of the post-transplant period and continued to decline on the seventh day. This ratio was high in only one patient who presented an acute rejection episode. The study showed that cystatin C was superior to creatinine on the third day of the post-transplant period. However, no apparent difference in cystatin C distribution was observed at the end of the first week, with a sensitivity of 0.489 estimated by a nonparametric curve.

In a cohort study, Christensson et al<sup>20</sup> evaluated the diagnostic accuracy of serum cystatin C measurements compared to enzymatic creatinine measurements as serum markers of GFR (established from iohexol clearance) in 125 stable renal transplant patients and patients in the early postoperative phase with stable graft function. Serum cystatin C showed a significantly closer correlation with iohexol clearance ( $r = 0.89$  or 79% covariance) than serum creatinine ( $r = 0.81$  or 66% covariance) ( $P = 0.033$ ).

White et al<sup>32</sup> estimated GFR in 117 adult renal transplant recipients. GFR was measured by <sup>99m</sup>Tc-DTPA and the bias, precision and accuracy of each equation were determined. Mean <sup>99m</sup>Tc using four equations (Filler, Le Bricon, Larson, and Hoek) that are based on serum cystatin C concentration and seven equations that are based on serum creatinine -DTPA GFR was  $58 \pm 23$  mL/min/1.73m<sup>2</sup>. The Filler and Le Bricon equations based on cystatin C presented the smallest variation (1.7 and 3.8 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, respectively) and the highest precision (11.4 and 11.8 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>) and accuracy (87 and 89% in 30% of GFR measurements). The cystatin C-based equations continued to be accurate even when GFR was >60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>. The creatinine-based equations were not as accurate, with only 53 to 80% of estimates in 30% of GFR measurements. The authors concluded that cystatin C-based equations are more accurate in predicting GFR in renal transplant recipients than traditional creatinine-based equations and that further studies are necessary to determine whether cystatin C-based estimates of GFR will be sufficiently accurate to monitor long-term graft function.

Le Bricon et al<sup>26</sup> evaluated renal function in 30 adult renal transplant recipients and 56 healthy controls using cystatin C. Cystatin C was determined daily starting on the day of surgery and for 3 weeks after surgery by an immunonephelometric assay. The results showed that plasma cystatin concentration was significantly reduced during the first week (-44% vs -29% for creatinine). Cystatin C was correlated with plasma creatinine ( $r = 0.741$ ,  $P < 0.001$ ) and the reciprocal of creatinine clearance estimated by the Cockcroft-Gault formula ( $r = 0.882$ ,  $P < 0.001$ ). In all three cases of acute renal failure, the increase in plasma cystatin C levels was more prominent than creatinemia, with the authors concluding that cystatin C is an alternative and an

accurate marker of graft function in renal transplant recipients which is more sensitive than creatinine in the detection of acute reduction in GFR.

To overcome the disadvantages of serum creatinine, two strategies have been proposed to identify patients with reduced GFR. On the one hand, the MDRD equation is now recommended for the classification of the stage of CKD and, on the other, cystatin C has been investigated in numerous studies and has shown a higher sensitivity than creatinine in the detection of a reduction in GFR. Poge et al<sup>21</sup> compared the two strategies in patients after transplantation. A total of 105 consecutive renal transplant recipients were submitted to Tc99m-DTPA clearance measurement. Simultaneously, MDRD estimates were calculated and serum cystatin C levels were determined. The linear regression curve was analyzed at different decision points from 20 to 70 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>. The study concluded that the MDRD equation is equivalent to cystatin C measurement in renal transplant recipients. Since the feasibility of MDRD is superior to that of cystatin C, the authors recommended the use of the MDRD equation for the estimation of GFR. However, cystatin C may serve as a confirmation test of overestimated MDRD in patients with good graft function because of its superior accuracy in these patients. Zahran et al<sup>12</sup> compared the performance of serum cystatin C and cystatin C-based GFR versus serum creatinine and creatinine-based GFR between 14 studies on renal transplant patients, with 70% of the studies showing superiority of cystatin C over serum creatinine.

#### Final comment

Most studies analyzed in this review showed that serum quantification of cystatin C is a satisfactory and promising method for the evaluation of renal function in

renal transplant patients, especially during the immediate post-transplant period. Cystatin C was found to be superior when compared to serum creatinine, presenting a higher sensitivity in the detection of an acute reduction in GF and thus permitting the early identification of alterations in graft function. In addition, cystatin C is a useful tool for the detection of eventual immunological and non-immunological processes in the transplant population. However, controlled prospective studies involving a larger number of renal transplant patients are necessary to confirm this indication.

Thanks to

Dr. Luis Alberto Simeoni, professor at the University of Brasilia, for reviewing the manuscript.

## REFERENCES

- 1- Shilipak MG. Cystatin C as a marker of glomerular filtration rate in chronic kidney disease: Influence of body composition. *Nature Clinical Practice Nephrology* 3 (4) : 188 – 189 April 2007
- 2- Arias IM, Pobes A, Baños M. Cistatina C. Nuevo marcador de función renal. *Nefrologia* 25: 217-220 (2005 )
- 3- Prates AB, Amaral FB, Vacaro MZ, Camargo JL, Silveir SP. Avaliação da filtração glomerular através da medida da cistatina C sérica. *J Bras Nefrol* volume XXIX – nº 1 março de 2007
- 4- Hojs R, Antolinc B, Gorenjak M, Puklavec L. Serum cystatin C – A new marker of glomerular filtration rate. *Zdrav Vestn*, 73: 171–5 (2004)

- 5- Martins TR, Picheti MTF, Alcântara VM, Scartezini M, Picheth G. Cistatina C: um novo marcador para filtração glomerular comparada ao clearance de creatinina e a creatinina sérica. RBAC. Vol. 35(4): 207 – 213 (2003)
- 6- Risch L, Blumberg A, Huber A, Huber AR. Rapid and accurate assessment of glomerular filtration rate in patients with renal transplants using serum cystatin C. Nephrol Dial Transplant (1999) 14; 1991-1996
- 7- Pecoits-Filho R. Diagnóstico de doença renal crônica: Avaliação da função renal. J Bras Nefrol Volume XXVI - nº 3 - Supl. 1 - Agosto de 2004
- 8- Newman DJ. Cistatina C como marcador de la velocidad de Filtración Glomerular. Acta Bioquim Clín Latinoam 37 (1) : 63-70 (2003)
- 9- Roos JF, Doust J, Tett SE, Kirkpatrick CMJ. Diagnostic accuracy of cystatin C compared to serum creatinine for the estimation of renal dysfunction in adults and children. A meta-analysis. Clinical Biochemistry 40 : 383–391 ( 2007 )
- 10- Riella MC, Pecoits-Filho R. Insuficiência Renal crônica : fisiopatologia da uremia . In: Miguel Riella , editor, Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólíticos. 4th edn. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan 2003. p.661-690
- 11- Krieser DMZ, Rosenberg AR, Kainer G, Naidoo D. The relationship between serum creatinine, serum cystatin C and glomerular filtration rate in pediatric renal transplant recipients: A pilot study. Pediatr Transplantation 6: 357–360 (2002)
- 12- Gantzer ML, Newark, DB. Cystatin C: analysis and utility in monitoring GFR, Laboratory Medicine Vol. 34, No. 2, February 2003
- 13- National Kidney Foundation. K/DOQI. Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Am J Kid Dis. 2002;39:S1-S266.

- 14- Poge U, Gerhardt T, Wagner B, Palmedoc H, Klehra H, Sauerbruchaand T, Woitasa RP. Prediction of glomerular filtration rate in renal transplant recipients: cystatin C or Modification of Diet in Renal Disease equation? Clin Transplant 20: 200–205 (2006 )
- 15- Gaspari F et al. Performance of different prediction equations for estimating renal function in kidney transplantation. American Journal of Transplantation, v.4, n.11, p. 1826-35, nov. 2004.
- 16- Zambrano AE et al. Evaluation of the equations to estimate the glomerular filtration rate in kidney transplant recipients. Transplantation Proceedings, v.39, n. 7, p. 2210-3, set. 2007
- 17- Laterza OF, Price CP, Scott1 MG. Cystatin C: An improved estimator of glomerular filtration rate? Clinical Chemistry 48:5 699–707 (2002)
- 18- Finney H, Newman DJ, Gruber Wmerle P, and Price CP. Initial evaluation of cystatin C measurement by particle-enhanced immunonephelometry on the Behring nephelometer systems (BNA, BN II) Clinical Chemistry, 43:6 1016–1022 (1997).
- 19- Herget-rosenthal S, Feldkamp T, Volbracht L, Kribben A. Measurement of urinary cystatin C by particle-enhanced nephelometric immunoassay: precision, interferences, stability and reference range. Ann Clin Biochem; 41: 111-118 (2004)
- 20- Christensson A, Ekberg J, Grubb A, Ekberg H, Lindstrom V, Lilja H. Serum cystatin C is a more sensitive and more accurate marker of glomerular filtration rate than enzymatic measurements of creatinine in renal transplantation. Nephron Physiol 2003; 94:p 19-p-27.
- 21- Zahran A, El-husseini A, Shoker, A. Can cystatin C replace creatinine to estimate glomerular filtration rate? A literature review. Am J Nephrol 27: 197 – 205 ( 2007)
- 22- Okay TS. Cistatina C: um novo marcador de função renal em crianças. Rev Assoc Med Brás. 48(2): 93-117 (2002 )



- 23- Dharnidharka VR, Know C, Stevens G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 40, n°02, 221-226 (2002)
- 24- Payn MM, Webb MC, Lawrence D, Lamb EJ. Serum cystatin C as a marker of kidney dysfunction in an elderly population. *Clinical Chemistry* 48, No. 7, 1138 – 1140 ( 2002)
- 25- Chew JSC, Saleem M, Florkowski CM, George PM. Cystatin C – A paradigm of evidence based laboratory medicine. *Clin Biochem* 2008; 29; 48-62
- 26- Bricon TL, Thervet E, Benlakehal M, Bousquet B, Legendre C, Erlich D. Changes in plasma cystatin C after renal transplantation and acute rejection in adults. *Clinical Chemistry* 45: 2243–2249 (1999)
- 27- Bricon TL, Thervet E, Froissart M, Benlakehal M, Bousquet B, Legendre C. Plasma cystatin C is superior to 24-h creatinine clearance and plasma creatinine for estimation of glomerular filtration rate 3 months after kidney transplantation. *Clin Chem* 2000;46:1206-7.
- 28- Visvardis G, Griveas I, Zilidou R, Papadopoulou D, Mitsopoulos E, Kiriklidou P, Manou E, Ginikopoulou E, Meimaridou D, Pavitlou A, Sakellariou. Glomerular filtration rate estimation in renal transplant patients based on serum cystatin-C levels: Comparison with other markers of glomerular filtration rate. *Transplantation Proceedings* 36 : 1757-1759 (2004)
- 29- Leach TD, Kitiyakara C, Price P, Stevens JM, Newman DJ. Prognostic significance of serum cystatin C concentrations in renal transplant recipients: 5-year follow-up. *Transplantation Proceedings*, 34, 1152–1158 (2002).
- 30-Akbas SH, Yavuz A, Tuncer M, Ruhi C. Gurkan A, Cetinkaya R, Demirbas A, Gultekin M, Akaydin M, and Ersoy F.. Serum cystatin C as an index of renal function in kidney transplant patients. *Transplantation Proceedings*, 36, 99-101 (2004)

31- Koçak H, Oner-iyidogan Y, Gurdol F, Koçak T, Nane I, Gene S. Cystatin-C and creatinine as indices of glomerular filtration rate in the immediate follow-up of renal transplant patients. *Clin Exp Med* 5: 14-19 (2005)

32- White C, Akbari A, Hussain N, Dinh L, Filler G, Lepage N, Knoll GA. Estimating glomerular filtration rate in kidney transplantation: A comparison between serum creatinine and cystatin C-based methods. *J Am Soc Nephrol* 16: 3763–3770 (2005)

**ANEXO C – APROVAÇÃO DE ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA**

Dr. José Ribamar,

**Conforme artigo** Cystatin C and inflammatory markers in kidney transplant recipients aprovado para publicação na Revista da Associação Médica Brasileira solicitamos que a titulação esteja em português

No aguardo,

Denília Dias

Secretária

**José Ribamar Lima<sup>1\*</sup>, João Victor Salgado<sup>2</sup>, Teresa Cristina Ferreira<sup>3</sup>, Maria Inês Oliveira<sup>4</sup>, Alcione Miranda dos Santos<sup>5</sup>, Natalino Salgado Filho<sup>6</sup>, Francisco de Assis Neves<sup>7</sup>**

1- Master in Health Sciences - Clinical Chemistry Service, University Hospital, Federal University of Maranhão, São Luis and University of Brasilia, Federal District, Brazil.

2- Master in Health Sciences - Clinical Chemistry Service, University Hospital, Federal University of Maranhão, São Luis, Brazil

3- Master in Health Sciences - Division of Nephrology and Renal Transplantation, University Hospital, Federal University of Maranhão, São Luis, Brazil.

4- specialist - Division of Nephrology and Renal Transplantation, University Hospital, Federal University of Maranhão, São Luis, Brazil

5- PhD - Department of Public Health, Federal University of Maranhão, São Luis, Brazil.

6- PhD – Divisão de Nefrologia e transplante renal, University Hospital, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, MA

7- PhD – Universidade Federal de Brasília, Brasília, DF

**ANEXO D – ARTIGO APROVADO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA  
ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA**

**CISTATINA C E MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM RECEPTORES DE  
TRANSPLANTE RENAL**

**CYSTATIN C AND INFLAMMATORY MARKERS IN KIDNEY TRANSPLANT  
RECIPIENTS**

**José Ribamar Lima:** Master in Health Sciences - Clinical Chemistry Service, University Hospital, Federal University of Maranhão, São Luis and University of Brasília, Federal District, Brazil.

**João Victor Salgado:** Master in Health Sciences - Clinical Chemistry Service, University Hospital, Federal University of Maranhão, São Luis, Brazil

**Teresa Cristina Ferreira:** Master in Health Sciences - Division of Nephrology and Renal Transplantation, University Hospital, Federal University of Maranhão, São Luis, Brazil.

**Maria Inês Oliveira:** specialist - Division of Nephrology and Renal Transplantation, University Hospital, Federal University of Maranhão, São Luis, Brazil.

**Alcione Miranda dos Santos:** PhD - Department of Public Health, Federal University of Maranhão, São Luis, Brazil.

**Natalino Salgado Filho:** PhD - Division of Nephrology and Renal Transplantation, University Hospital, Federal University of Maranhão, São Luis, Brazil.

## Resumo

**OBJETIVO:** O transplante renal é a melhor opção para pacientes renais crônicos em estágio terminal. Este estudo avaliou o perfil da cistatina C (CysC), interleucina 2 (IL-2), IL-6, e fator de necrose tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ) como marcadores inflamatórios em 23 transplantados renais de doador vivo. **MÉTODOS:** Estudo descritivo, analítico e prospectivo conduzido entre 01 de janeiro (2007) e 30 de junho (2008) em 23 transplantados renais de doador vivo. Os biomarcadores foram avaliados no pré-, com 30 e 180 dias do pós-transplante. **RESULTADOS:** A média de idade foi de 34.3 anos ( $\pm 11.7$ ), 52% do sexo feminino e 61% de negros. Diferença significativa foi encontrada na CysC e creatinina no pré- e com 30 dias do pós-transplante ( $p < 0.0001$ ) e no pré- e com 180 dias do pós-transplante ( $p < 0.0001$ ). Houve uma diferença significativa na IL-2, entre 30 and 180 dias do pós-transplante ( $p = 0.0418$ ) e no TNF-  $\alpha$  entre o pré- e com 30 dias do pós-transplante ( $p = 0.0001$ ). Foi observada uma correlação negativa entre CysC e TNF-  $\alpha$  no pré-transplante, e entre CysC e IL-6 com 180 dias do pós-transplante. Em pacientes biopsiados houve uma diferença significativa na creatinina e na CysC com 30 e 180 dias do pós-transplante. **CONCLUSÕES:** Em seguimento a curto prazo, não houve correlação significativa entre os níveis de CysC, IL-2, IL-6 e TNF-  $\alpha$  em transplantados renais. Em pacientes biopsiados e não biopsiados, os níveis de CysC foram muito similares aos da creatinina, ao contrário de outros marcadores inflamatórios. Demais estudos são importantes para avaliar o perfil destes marcadores a longo prazo.

**Palavras-chave:** Cistatina C; Creatinina; Marcadores Biológicos; Rejeição de Enxerto; Transplante de Rim

## Abstract

**BACKGROUND:** Kidney transplantation is the best option for patients with end-stage renal disease. This study evaluated the profile of cystatin C (CysC), interleukin 2 (IL-2), IL-6, and tumor necrosis factor alpha (TNF-  $\alpha$ ) as inflammatory markers in 23 living donor kidney transplant recipients. **METHODS:** A descriptive, analytical and prospective study was conducted between January 1, 2007 and June 30, 2008 on 23 living donor kidney transplant recipients. The biomarkers were evaluated before and 30 and 180 days after transplantation. **RESULTS:** The mean age of the patients was 34.3 years ( $\pm 11.7$ ), females (52%) and blacks (61%). Significant difference was found in cystatin C and creatinine before and 30 days after transplantation ( $p < 0.0001$ ) and before and 180 days after transplantation ( $p < 0.0001$ ). There was a significant difference in IL-2 between 30 and 180 days post-transplant ( $p = 0.0418$ ) and in TNF-  $\alpha$  between pre-transplant and 30 days post-transplant ( $p = 0.0001$ ). A negative correlation was observed between cystatin C and TNF-  $\alpha$  at pre-transplant and between cystatin C and IL-6 at 180 days post-transplant. Comparison of biopsied and non-biopsied patients showed a significant difference in creatinine and cystatin C at 30 and 180 days post-transplant in biopsied patients. **CONCLUSION:** Our results showed no significant correlations between CysC, IL-2, IL-6 and TNF-  $\alpha$  levels in kidney transplant recipients at short-term follow-up. Moreover, CysC levels were very similar to creatinine levels in contrast to other inflammatory markers studied in biopsied and non-biopsied patients. Further studies are important to evaluate the long-term profile of these markers.

**Keywords:** Cystatin C; Creatinine; Biological Markers; Graft Rejection; Kidney Transplantation

## INTRODUCTION

A kidney transplant is the best therapeutic and rehabilitation option for patients with end-stage renal disease (ESRD) since it provides a better quality of life and life expectancy to the patient when than dialysis. However, chronic graft dysfunction is an important cause of renal graft loss and the treatment of this condition is nonspecific in view of its multifactorial etiology. In this setting, for the management of kidney transplant recipients, it is essential to avoid or delay the progression of chronic graft dysfunction by means of its prevention and an early diagnosis.<sup>1</sup>

Ischemia-reperfusion injury, which occurs during the removal and implantation of the renal graft, involves immunological and non-immunological mechanisms associated with inflammation, whose mediators include complement, procoagulant factors, cytokines, and fibrinolytic agents.<sup>2</sup> Acute inflammation is the response of tissue to injury and is characterized by an increase in blood flow and vascular permeability as a result of the accumulation of fluids, leukocytes and inflammatory mediators such as cytokines. During the chronic phase, inflammation is characterized by the development of a humoral and cellular immune response.<sup>3</sup>

Acute renal graft rejection is a common event during the early and late post-transplant period and a kidney biopsy is the gold standard for its diagnosis. Acute rejection is characterized by endothelitis/arteritis and tubulointerstitial inflammation.<sup>4</sup> Evidence suggests that persistent inflammation and oxidative stress (the formation of reactive oxygen species) start early during the process of renal function decline. Recently there has been interest in the potential value of pretransplant inflammatory markers as predictors of acute rejection and graft loss in adult kidney transplant patients.<sup>5,6</sup>

Inflammation directly associated with atherosclerosis may influence graft loss and cardiovascular disease. Several studies have demonstrated that inflammatory markers such as interleukin 2 (IL-2), IL-6 and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) are associated with episodes of acute rejection. However, these markers have not always been useful in distinguishing between rejection and infection or tubular damage. In addition, cystatin C, which is known to be a sensitive marker of small reductions in renal function,<sup>7</sup> has shown linear associations with inflammatory markers, also suggesting adverse physiopathological consequences.<sup>8-10</sup>

More detailed studies investigating markers that could be used for the early and noninvasive evaluation of renal damage are necessary. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the short-term profile of cystatin C, IL-2, IL-6 and TNF- $\alpha$  in kidney transplant recipients and the potential role of them as predictors of early renal graft dysfunction.

## **MATERIALS AND METHODS**

A descriptive, analytical and prospective study was conducted between January 1, 2007 and June 30, 2008 on 23 kidney transplant patients seen at the transplant unit of the University Hospital of Federal University of Maranhão (HUUFMA). Patients ranging in age from 18 to 60 years who received a kidney transplant from a living donor and who signed the free informed consent form were included in the study. The hospitalized patients were prepared for transplantation by the medical team, with the evaluation of serology, hepatic, renal and cardiac function, imaging exams, HLA compatibility, and crossmatching. The following triple immunosuppression schemes were used: 1) tacrolimus, mycophenolate mofetil, and prednisone; 2) cyclosporin, azathioprine, and prednisone.

After the selection procedures and admission of the patients for transplantation, data collection was started by signing the free informed consent form and subsequent application of a clinical-laboratory questionnaire. The biomarkers studied were measured before and 30 and 180 days after kidney transplantation. Blood was collected individually at the transplant unit by specialized technicians and the samples were identified, properly stored, and sent for laboratory analysis. The biomarkers were compared between patients submitted to graft biopsy and those not submitted to this procedure.

Cystatin C was measured in serum samples by nephelometry using the BN II ProSpec equipment and reagents (Siemens) according to manufacturer instructions. Serum samples were obtained by coagulation and centrifugation of whole blood at 3500 rpm for 15 min. Serum levels of IL-2, IL-6 and TNF- $\alpha$  were measured using human TiterZyme enzyme immunoassay (EIA) kits. The reference values provided by the manufacturer were adopted: 2.0 pg/mL for IL-2, up to 6.01 pg/mL for IL-6, and up to 8.43 pg/mL for TNF- $\alpha$ .



The quantitative variables are reported as the mean and standard deviation or median, and qualitative variables are expressed as frequency and percentage. The Shapiro-Wilk test was used to determine whether the quantitative variables showed a normal distribution. Since the variables were not normally distributed, Friedman's test was used to compare the markers between the different time points. Spearman's correlation coefficient was calculated to determine which markers were correlated with cystatin C. A level of significance of 5% was adopted. Statistical analysis was performed using the STATA 9.0 program. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Universidade Federal do Maranhão (protocol 322/6).

## RESULTS

The mean age of the patients was 34.3 years ( $\pm$  11.7). There was a predominance of females (52%) and blacks (61%). The mean weight and height of the patients, diastolic and systolic blood pressure and hemoglobin, albumin, phosphorus and creatinine levels, as well as underlying diseases, are shown in Table 1.

Comparison of the biomarkers between the different sampling times showed a significant difference in plasma creatinine and cystatin C between admission and 30 days post-transplant ( $p < 0.0001$ ), and between admission and 180 days post-transplant ( $p < 0.0001$ ). On the other hand, a significant difference in IL-2 was only observed between 30 and 180 days post-transplant ( $p = 0.0418$ ) and in TNF- $\alpha$  between admission and 30 days post-transplant ( $p = 0.0001$ ), whereas there was no significant difference in IL-6 (Table 2).

Analysis of the correlation between cystatin C and the other markers by Spearman's test showed a significant negative correlation between cystatin C and TNF- $\alpha$  at admission ( $r = -0.44$ ) and between cystatin C and IL-6 at 180 days post-transplant ( $r = -0.38$ ).

A graft biopsy was obtained from eight of the 23 patients because of elevated serum levels of creatinine in six and elevated proteinuria in two. A normal result was obtained in two patients, three presented acute drug nephrotoxicity, recurrence of the underlying disease was observed in two, and one patient had a confirmatory result of cell rejection. The immunosuppression scheme used was tacrolimus, mycophenolate

mofetil and prednisone in 19 patients, and cyclosporin, azathioprine and prednisone in four.

The mean plasma concentrations of the biomarkers were compared at admission and 30 and 180 days post-transplant between biopsied ( $n = 8$ ) and non-biopsied ( $n = 15$ ) patients. A significant difference was only observed for serum creatinine and cystatin C at 30 days post-transplant ( $p = 0.0040$  vs  $p = 0.0417$ ) and 180 days post-transplant ( $p = 0.0077$  vs  $p = 0.0137$ ) (Table 3). No significant differences were observed in pretransplant serum levels of cystatin C, IL-2, IL-6 or TNF- $\alpha$  between biopsied ( $n=8$ ) and non-biopsied patients ( $n=15$ ).

## DISCUSSION

The a mean age of the patients studied was 34.3 years ( $\pm 11.7$ ), in agreement with the literature.<sup>9,11-13</sup> Bohler et al.<sup>14</sup> investigated cofactors that potentially influence the expression of immunological biomarkers, exploring the proliferation and activation of T cells (expression of CD25 and CD17) and the production of cytokines by lymphocytes (IL-2 and TNF- $\alpha$ ) in healthy volunteers, dialysis patients and stable kidney transplant patients receiving standard immunosuppressive therapy. The authors observed a positive correlation between age and TNF- $\alpha$  expression in all three populations. In contrast, the expression of IL-2 was positively correlated with age only in healthy volunteers and kidney transplant patients, indicating that age exerts diverse effects on the adaptive immune system, which modulates the immunogenicity of donor organs in terms of the capacity of the recipient to reject the organ. The same authors also demonstrated a reduction of T cell function in kidney transplant patients when compared to healthy volunteers and dialysis patients, as well as an increase of IL-2 expression in dialysis patients when compared to healthy volunteers. Similarly, Fijter et al.<sup>15</sup> showed that kidneys from elderly donors provoke an increase in immunogenicity associated with a higher susceptibility to graft loss due to rejection of the transplant and chronic graft nephropathy.

According to Rostaing et al.,<sup>16</sup> the dialysis membrane may eventually stimulate T cells and different dialysis membranes have different abilities to stimulate the expression of IL-2. In contrast, van Riemsdijk-Van Overbeeke et al.<sup>17</sup> found that the expression of IL-2 and IL-2 receptor on T cells is unaffected in dialysis patients.

However, elevated IL-2 levels after dialysis were observed in the present study, in agreement with the findings of Rostaing et al.<sup>16</sup> The induction of the proinflammatory cytokine IL-2 during dialysis might be unfavorable for the short-term outcome after kidney transplantation since it sensitizes the recipient's immune system to the graft.<sup>14</sup>

In the present study, patients originating from hemodialysis presented elevated serum levels of IL-2, IL-6 and TNF- $\alpha$ . These results agree with Rysz et al.,<sup>18</sup> in terms of serum IL-6 and TNF- $\alpha$  levels but not IL-2. Rysz et al.<sup>18</sup> studied patients on regular hemodialysis therapy at different times (20, 60 and 240 min) of a single session in order to compare the serum levels of a panel of inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$ ) with C-reactive protein (CRP) using healthy subjects as controls. The authors observed a higher CRP concentration in hemodialysis patients when compared to healthy controls. The concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  were increased, whereas serum IL-2 levels remained unchanged during the hemodialysis session.

In the present study, the concentration of all biomarkers was increased during the pretransplant period and decreased markedly after transplantation. This fact indicates that a kidney transplant has an important impact on these markers, which is more pronounced in the case of some markers and less pronounced in the case of others. One interesting finding was the gradual decline in IL-2 levels at 30 and 180 days post-transplant, which was not observed for IL-6 and TNF- $\alpha$  whose levels were found to be reduced at 30 days and increased at 180 days post-transplant.

The present results showed a nonsignificant reduction in serum IL-6 levels, with levels above normal, at 30 days post-transplant and higher levels at 6 months post-transplant. These findings disagree with Simmons et al.,<sup>19</sup> but are similar when compared to the reduced serum levels of TNF- $\alpha$  at 30 days post-transplant. Simmons et al.<sup>19</sup> studied 19 patients undergoing living donor kidney transplantation at different time points: 1 week before transplantation and 1 week and 2 months after transplantation. The following biomarkers of inflammation and oxidative stress were assayed: CRP, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , protein-associated carbonyl content, and F<sub>2</sub> isoprostanes. The authors observed that pretransplant levels of the proinflammatory proteins IL-6, TNF- $\alpha$  and CRP, as well as the oxidative stress markers plasma protein carbonyl and F<sub>2</sub> isoprostanes, were significantly elevated when compared to control. In addition, there was a rapid and significant decline in all of these biomarkers after

transplantation that persisted for 2 months, indicating the restoration of renal function characterized by a reduction of chronic inflammation and oxidative stress associated with uremia.

Cueto-Manzano et al.<sup>9</sup> compared serum levels of CRP, IL-6 and TNF- $\alpha$  in 37 patients before and after kidney transplantation. CRP levels tended to be higher in recipients than in donors but this difference was not statistically significant, with the observation of a significant reduction of CRP concentration in recipients immediately after transplantation. Pretransplant serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 were significantly higher in recipients than in donors. After an initial reduction at 6 months post-transplant, TNF- $\alpha$  and IL-6 levels increased even further in recipients at 12 and 18 months. In contrast to the results reported by Cueto-Manzano et al.,<sup>9</sup> the present study found no reduction of TNF- $\alpha$  or IL-6 levels in recipients but rather an increase of these markers at 6 months post-transplant.

Comparison of serum creatinine and cystatin C levels between the different sampling times showed a significant reduction in the two markers between admission and 30 days post-transplant ( $p < 0.0001$ ) and between admission and 180 days post-transplant ( $p < 0.0001$ ), in agreement with the literature.<sup>20-22</sup> This similarity in the creatinine and cystatin C profiles calls attention because mean creatinine levels tend to increase (1.6 mg/dL) in the sixth post-transplant month when compared to 30 days post-transplant (1.5 mg/dL), whereas the opposite is observed for cystatin C (1.6 mg/dL at 30 days post-transplant and 1.39 mg/dL at 180 days). In the study of Harada et al.<sup>23</sup>, one of the risk factors associated with graft loss was renal function in the sixth post-transplant month evaluated based on creatinine using a level  $> 1.5$  mg/dL as the criterion cut-off. In a immediate post-transplant Geramizadeh et al.<sup>24</sup> studying sixty renal transplant recipients showed that during the first 5 days, following transplantation there are a progressive decline in a serum creatinine levels, but there is no decrease of serum cystatin, probably affected by the steroid dose, suggesting that during the first week, after transplantation, serum creatinine is still a good marker to assess the renal function and the level of serum cystatin is dependent on high steroid dose in the first week post renal transplantation and should be used as a marker of renal function afterwards,

Karczewski et al.<sup>10</sup>, studying 44 kidney transplant patients with and without rejection, evaluated serum concentrations of IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$

in samples collected one day before and 2, 7, 14 and 30 days after transplantation. Eleven of these patients developed episodes of acute rejection, which were associated with higher pretransplant serum levels of IFN- $\gamma$  and IL-10. No significant difference in plasma levels of IL-2, IL-4, IL-5 or TNF- $\alpha$  were observed between the two groups.

Similar to the study of Karczewski et al.,<sup>10</sup> no significant difference in serum IL-2 or TNF- $\alpha$  levels was observed at admission and at 30 days post-transplant between biopsied and non-biopsied patients. However, only 4% (1/23) of the patients presented graft rejection, whereas this prevalence was 25% (11/44) in the study of Karczewski et al.<sup>10</sup>

Ozdemir et al.<sup>12</sup> also studied the demographic, clinical and laboratory data of 141 kidney transplant recipients over a period of 5 years. The patients were divided into three groups based on serum CRP concentration: normal, intermittently high and consistently high. Renal graft survival rates were 90%, 72.6% and 11.1% in these groups, respectively. In addition, Cox regression analysis revealed that acute rejection, advanced recipient age and consistently high serum concentrations of CRP were associated with an elevated risk of renal graft loss. Intermittent elevations in serum CRP levels were not associated with an increased risk of graft loss. The authors concluded that consistently high post-transplant concentrations of CRP have a high negative predictive value for graft survival. According to the authors, kidney transplant recipients presenting an ongoing inflammatory process during the 5-year post-transplant period require additional efforts to control inflammation and to prolong graft survival. These considerations suggest the long-term investigation of other inflammatory markers which, if also consistently elevated, may compromise renal graft survival.

Recent studies demonstrate that novel kidney markers such as cystatin C, interleukin-18, kidney injury molecule 1, and neutrophil gelatinase-associated lipocalin serve as more accurate markers for acute kidney injury as compared with the more traditional marker, creatinine. Each individual kidney marker possesses its own strengths and weaknesses in determining the onset and severity of acute kidney injury. However, in combination, a panel of kidney markers may serve as powerful tools in diagnosing kidney injury with high accuracy<sup>25</sup>.

Some limitations of the present study should be mentioned. The inclusion criteria did not permit to obtain a larger sample of patients. Serum samples were not

obtained from donors at transplantation. Inflammation markers (cystatin C, IL-2, IL-6, and TNF- $\alpha$ ) were investigated over a short period of time (180 days) and not during episodes of graft dysfunction.

## CONCLUSIONS

Numerous studies are investigating markers of early renal graft dysfunction that would be able to detect the onset of renal leukocyte infiltration since the best marker has yet to be defined. The current study showed no significant correlations between CysC, IL-2, IL-6 and TNF- $\alpha$  serum levels in kidney transplant recipients at short-term follow-up. Moreover, CysC levels were very similar to creatinine levels in contrast to other inflammatory markers studied in biopsied and non-biopsied patients. When compared to the other inflammatory biomarkers, serum creatinine and cystatin C seem to be good predictors of early graft dysfunction in transplant patients and can be used to establish actions that prevent functional loss of the graft. Our results showed an impact of kidney transplant on the concentrations of the inflammatory markers studied, with IL-2, IL-6 and TNF- $\alpha$  representing an option for the long-term monitoring of renal grafts. However, further studies evaluating pre- and post-transplant inflammatory markers are necessary to confirm the findings of the present study.

## REFERENCES

1. Pagliuso RG, Goloni-Bertolo EM, Filho MA, Pavarino-Bertelli EC. Estresse oxidativo e disfunção crônica do enxerto renal. *Arq Ciênc Saúde* 2006;13(4):223-227.
2. Silverstein DM. Inflammation after renal transplantation: Role in the development of graft dysfunction and potential therapies. *Journal of Organ Dysfunction*. 2009;5(4):233-241.
3. Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci*. 1997 Jan 1;2:d12-26.
4. Sementilli A, David DR, Malheiros D, Visona I, Pegas KL, Franco M, et al. Patologia do transplante renal: achados morfológicos principais e como laudar as biópsias. *J Bras Pat Med Lab* 2008;44(4):293-304.

5. Stenvinkel P. Inflammation in end-stage renal disease: the hidden enemy. *Nephrology (Carlton)*. 2006 Feb;11(1):36-41.
6. Butani L, Johnson J, Troppmann C, McVicar J, Perez RV. Assessment of pretransplant inflammation in pediatric renal allograft recipients. *Transpl Int*. 2005 Aug;18(8):949-953.
7. Salgado JV, Neves FA, Bastos MG, França AK, Brito DJ, Santos EM, et al. Monitoring renal function: measured and estimated glomerular filtration rates - a review. *Braz J Med Biol Res*. Jun 2010;43(6):528-536.
8. Shlipak MG, Katz R, Cushman M, Sarnak MJ, Stehman-Breen C, Psaty BM, et al. Cystatin C and inflammatory markers in the ambulatory elderly. *Am J Med*. 2005 Dec; 118(12):1416.
9. Cueto-Manzano AM, Morales-Buenrostro LE, González-Espinoza L, González-Tableros N, Martín-del-Campo F, Correa-Rotter R, et al. Markers of inflammation before and after renal transplantation. *Transplantation*. 2005 Jul 15;80(1):47-51.
10. Karczewski J, Karczewski M, Glyda M, Wiktorowicz K. Role of TH1/TH2 cytokines in kidney allograft rejection. *Transplant Proc*. 2008 Dec;40(10):3390-2.
11. Manchanda PK, Mittal RD. Analysis of cytokine gene polymorphisms in recipient's matched with living donors on acute rejection after renal transplantation. *Mol Cell Biochem*. 2008 Apr;311(1-2):57-65.
12. Ozdemir NF, Elsurer R, Ibis A, Arat Z, Haberal M. Serum C-reactive protein surge in renal transplant recipients: link with allograft survival. *Transplant Proc*. 2007 May;39(4):934-7.
13. Akbas SH, Yavuz A, Tuncer M, Ruhi C, Gurkan A, Cetinkaya R, et al. Serum cystatin C as an index of renal function in kidney transplant patients. *Transplant Proc*. 2004 Jan-Feb;36(1):99-101.
14. Bohler T, Canivet C, Nguyen PN, Galvani S, Thomsen M, Durand D, et al. Cytokines correlate with age in healthy volunteers, dialysis patients and kidney-transplant patients. *Cytokine*. 2009 Mar;45(3):169-73.
15. de Fijter JW, Mallat MJ, Doxiadis II, Ringers J, Rosendaal FR, Claas FH, et al. Increased immunogenicity and cause of graft loss of old donor kidneys. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Jul;12(7):1538-46.
16. Rostaing L, Peres C, Tkaczuk J, Charlet JP, Bories P, Durand D, et al. Ex vivo flow cytometry determination of intracytoplasmic expression of IL-2, IL-6, IFN-

- gamma, and TNF-alpha in monocytes and T lymphocytes, in chronic hemodialysis patients. *Am J Nephrol.* 2000 Jan-Feb;20(1):18-26.
17. van Riemsdijk-Van Overbeeke IC, Baan CC, Knoop CJ, Loonen EH, Zietse R, Weimar W. Quantitative flow cytometry shows activation of the TNF-alpha system but not of the IL-2 system at the single cell level in renal replacement therapy. *Nephrol Dial Transplant.* 2001 Jul;16(7):1430-5.
  18. Rysz J, Banach M, Cialkowska-Rysz A, Stolarek R, Barylski M, Drozd J, et al. Blood serum levels of IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in patients on maintenance hemodialysis. *Cell Mol Immunol.* 2006 Apr;3(2):151-4.
  19. Simmons EM, Langone A, Sezer MT, Vella JP, Recupero P, Morrow JD, et al. Effect of renal transplantation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in end-stage renal disease patients. *Transplantation.* 2005 Apr 27;79(8):914-9.
  20. Koçak H, Oner-Iyidogan Y, Gurdol F, Koçak T, Nane I, Genç S. Cystatin-C and creatinine as indices of glomerular filtration rate in the immediate follow-up of renal transplant patients. *Clin Exp Med.* 2005 May;5(1):14-9.
  21. Le Bricon T, Thervet E, Froissart M, Benlakehal M, Bousquet B, Legendre C, et al. Plasma cystatin C is superior to 24-h creatinine clearance and plasma creatinine for estimation of glomerular filtration rate 3 months after kidney transplantation. *Clin Chem.* 2000 Aug;46(8 Pt 1):1206-7.
  22. Christensson A, Ekberg J, Grubb A, Ekberg H, Lindstrom V, Lilja H. Serum cystatin C is a more sensitive and more accurate marker of glomerular filtration rate than enzymatic measurements of creatinine in renal transplantation. *Nephron Physiol.* 2003;94(2):p 19-27.
  23. Harada KM, Sampaio ELM, Freitas TVS, Felipe CR, Park SI, Machado PGP, et al. Fatores de risco associados à perda do enxerto e óbito após o transplante renal. *J Bras Nefrol.* 2008;30(3):213-20.
  24. Geramizadeh B, Azarpira N, Ayatollahi M, Rais-Jalali GA, Aghdai M, Yaghoobi R, Banihashemi M, Malekpour Z, Malek-Hosseini SA. Value of serum cystatin C as a marker of renal function in the early post kidney transplant period. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2009 Nov;20(6):1015-7
  25. Ho E; Fard A; Maisel A. Evolving use of biomarkers for kidney injury in acute care settings. *Current Opinion in Critical Care.*16(5):399-407, October 2010.



**TABLE 1 - Demographic and clinical characteristics at admission of the kidney transplant population studied (n =23).**

Variable	
Age (years)	34.3 ± 11.7
Gender	
Male/female (%)	12/11 (52/48)
Race	
Non-white/white (%)	14/9(61/39)
Weight (kg)	55.2 ± 14
Height (cm)	158 ± 0.1
Diastolic pressure (mmHg)	133 ± 21.6
Systolic pressure (mmHg)	88 ± 15.6
Hemoglobin (g/dL)	11.7 ± 1.9
Albumin (mg/dL)	4.1 ± 0.5
Phosphorus (mg/dL)	6.2 ± 1.7
Creatinine (mg/dL)	8.9 ± 4.1
Underlying disease	
Non-glomerular/glomerular (%)	12/11 (52/48)

**TABLE 2 - Mean and standard deviation of the biomarkers at admission and 30 and 180 days after transplantation.**

Biomarkers	Sampling time			
	Admission	30 days	180 days	<i>p</i>
Creatinine (mg/dL)	8.97 ± 4.1	1.5 ± 1.2	1.6 ± 0.7	<0.0001 <sup>a</sup>
Cystatin C (mg/dL)	6.59 ± 1.4	1.6 ± 0.85	1.39 ± 0.72	<0.0001 <sup>a</sup>
IL-2 (pg/mL)	13.47 ± 29.1	8.7 ± 19.0	4.93 ± 7.8	0.0418 <sup>b</sup>
IL- 6 (pg/mL)	29.87 ± 51.7	24.50 ± 50.7	50.61 ± 130.8	0.7457
TNF-α (pg/mL)	13.4 ± 7.2	4.96 ± 3.5	10.35 ± 13.1	0.0001 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Significant difference (at the 5% level) between admission and 30 days post-transplant and between admission and 180 days post-transplant. <sup>b</sup> Significant difference (at the 5% level) between 30 and 180 days post-transplant. <sup>c</sup> Significant difference (at the 5% level) between admission and 30 days post-transplant.

**TABLE 3 - Mean and standard deviation of the biomarkers in biopsied (n=8) and non-biopsied patients (n=15) 30 and 180 days after transplantation.**

	30 days after transplantation			180 days after transplantation		
	Biopsied	Non-biopsied	<i>p</i>	Biopsied	Non-biopsied	<i>p</i>
Creatinine	2.29 ± 4.9	1.12 ± 0.3	0.0040*	2.1 ± 0.9	1.3 ± 0.3	0.0077*
Cystatin C	2.11 ± 1.2	1.32 ± 0.3	0.0417*	1.83 ± 1.0	1.15 ± 0.2	0.0137*
IL-2	15.68 ± 32.1	4.97 ± 2.4	0.5444	8.42 ± 13.0	3.07 ± 0.3	0.5212
IL-6	34.72 ± 63.9	19.05 ± 43.7	0.6055	91.21 ± 208.5	28.95 ± 60.8	0.9484
TNF-α	5.96 ± 4.5	4.41 ± 2.8	0.8399	16.05 ± 21.0	7.30 ± 4.5	0.8461

\* Significant at the 5% level.