

UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS PARA AGRUPAR DIFERENTES
PACIENTES RENAIS CRÔNICOS: UMA ABORDAGEM PRÁTICA PARA
ESTABELEECER DIFERENTES GRUPOS DE PACIENTES**

VINÍCIUS BORTOLOTI PÉTERLE

VILA VELHA, ES
NOVEMBRO / 2017

UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS PARA AGRUPAR DIFERENTES
PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS: UMA ABORDAGEM PRÁTICA PARA
ESTABELEECER DIFERENTES GRUPOS DE PACIENTES**

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré requisito do Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

VINÍCIUS BORTOLOTI PÉTERLE

VILA VELHA, ES
NOVEMBRO / 2017

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

P478d

Péterle, Vinicius Bortoloti.

Dados clínicos e laboratoriais para agrupar diferentes pacientes renais crônicos: uma abordagem prática para estabelecer diferentes grupos de pacientes / Vinicius Bortoloti Péterle – 2017.

45f.: il.

Orientador: Carlos Eduardo Tadokoro.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2017.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Hemodiálise – Tratamento. I. Tadokoro, Carlos Eduardo. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

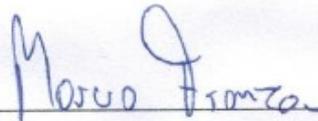
VINÍCIUS BORTOLOTI PÉTERLE

**DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS PARA AGRUPAR DIFERENTES PACIENTES
RENAIS CRÔNICOS: UMA ABORDAGEM PRÁTICA PARA ESTABELEECER
DIFERENTES GRUPOS DE PACIENTES**

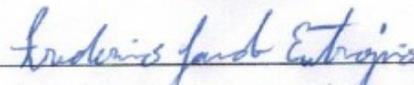
Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré requisito do Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 20 de Novembro de 2017

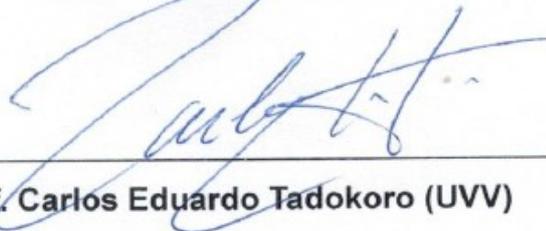
Banca Examinadora



Prof. Márcio Fronza (UVV)



Prof. Frederico Jacob Eutrópio (ICCA)



Prof. Carlos Eduardo Tadokoro (UVV)
(Orientador)

“A vida sem a ciência é uma espécie de morte”

Socrates

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço a Deus pela oportunidade de trabalho e aos meus pais José e Martha por possibilitarem a minha vida ao mundo e auxiliarem no meu crescimento e desenvolvimento como ser humano.

Ao Prof. Carlos E. Tadokoro, pela compreensão, paciência e pelos ricos conhecimentos partilhados gentilmente.

À Jéssica e à Fernanda pelo inestimável auxílio nas tarefas de laboratório.

Ao Dr Fred pelo valioso auxílio na realização das análises estatísticas.

À Clínica Capixaba do Rim pelo apoio à realização dos procedimentos e fornecimento de dados.

À cada um dos pacientes que gentilmente cederam amostras para a realização dos estudos.

Ao corpo docente do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas que, cada um a sua maneira me ajudou a enxergar um horizonte mais amplo de todas as coisas.

À FAPES pelo apoio financeiro em parte do experimento.

À minha sogra Rejane pelo auxílio nos momentos de ausência para executar as atividades de pesquisa.

Ao Francisco pela alegria e luz que trouxe em nossas vidas.

À Fezinha, maior incentivadora, que me apoiou de forma irrestrita nessa empreitada através de seu carinho, paciência e, acima de tudo, amor.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. O estado inflamatório sistêmico persistente na DRC.....	13
1.2. Alteração na homeostase dos linfócitos T CD4 na DRC terminal	15
2. JUSTIFICATIVAS	18
2.1. Impacto sócio-econômico da DRC em estágio terminal	18
2.2. Colaboração científica do projeto.....	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo geral	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1. Seleção e alocação dos pacientes	21
4.2. Coleta e preparo das amostras de sangue	21
4.3. Dados clínicos e análise estatística	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1. Classificação imunológica dos portadores de DRC dialítica	24
5.2. Validação da classificação dos pacientes em DRC dialítica em grupos imunológicos distintos.....	26
5.3. Anarquia imunológica no Grupo 3	27
5.3. Fatores clínicos/laboratoriais podem ser utilizados para definir pacientes dentro dos grupos previamente estabelecidos.....	28
5.4. Alterações de Kt/V, PTH e influência do tabagismo nos grupos de pacientes testados	31
6. CONCLUSÃO	34
7. REFERÊNCIAS	36
8. ANEXOS	40
ANEXO 1: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	40
ANEXO 2: Questionário padronizado utilizado no estudo	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTO – Associação brasileira de transplante de órgãos
AICD – Morte celular induzida por ativação
ANOVA – Análise de variância
BAFF - B Cell Activating Factor of tumor necrosis Family
BID – Agonista do domínio de morte induzida BH3
BIN – Proteína de interação Myc box dependente tipo 1
BCL2 – Proteína do linfoma de células B tipo 2
CD – Cluster differentiation
DPA – Diálise peritoneal automatizada
DRC – Doença renal crônica
FACS – Citometria de fluxo de células ativadas pela fluoresceína
FAV – Fístula artério-venosa
FLIP – Proteína inibitória FLICE like
HD – Hemodiálise
HbsAg – Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
IL – Interleucina
IFN – Interferon
IG - Imunoglobulina
JNK – Quinase 8 ativada por mitógeno
MIS - Malnutrition inflammation status
NFkB – Fator nuclear kappa B
PTH – Paratormônio
TCM – Célula T CD4 central de memória
TCR – Receptor de célula T CD4
TEM – Célula T CD4 efetora de memória
TEMRA – Célula T CD4 sem expressão de CD 28
TFG – Taxa de filtração glomerular
TLR – Toll like receptor
TNF – Fator de necrose tumoral
TRS – Terapia renal substitutiva
ROS – Espécies reativas derivadas do oxigênio
spKT/V – Single pool KT/V

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Visão esquemática do efeito da uremia como causa de estado inflamatório crônico por atuação nos constituintes da imunidade inata. Observe a característica da DRC em promover alterações que retroalimentam a promoção da lesão 16
- Figura 2** Efeito da hemodiálise nas células T CD4 de pacientes com DRC. Pacientes em terapia dialítica foram divididos em 4 grupos de acordo com o período que se encontram em hemodiálise 28
- Figura 3** Análise multivariada para correlação de fatores clínicos/hematológicos com grupos de pacientes com DRC 31
- Figura 4** Alterações nas avaliações de Kt/V, PTH, e índice de tabagismo 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Oferta de órgãos x Transplantes realizados em 2016 no Brasil	20
Tabela 2 Divisão de pacientes pelo tempo em diálise e contagem de leucócitos	23
Tabela 3 Descrição geral das variáveis estudadas na população estudada e nos grupos analisados	27
Tabela 4 Correlação dos fatores clínicos/hematológicos para cada grupo de pacientes	32

RESUMO

PETERLE, Vinícius Bortoloti, M Sc., Universidade de Vila Velha – ES, novembro de 2017.

Dados clínicos e laboratoriais para agrupar diferentes pacientes renais crônicos: uma abordagem prática para estabelecer diferentes grupos de pacientes.

Orientador: Carlos Eduardo Tadokoro

A doença renal crônica (DRC) é um ponto comum de diversos processos patológicos, sua evolução é insidiosa, e caracteriza-se pela perda progressiva e irreversível da função dos rins, o que acarreta em acúmulo progressivo de toxinas urêmicas que leva estes indivíduos, principalmente em DRC estágio terminal, a apresentarem uma série de alterações em seu comportamento fisiológico, incluindo um estado de persistente de supressão imunológica. Desta forma, uma melhor caracterização e divisão dos pacientes portadores de DRC em diferentes grupos de comprometimento imunológico poderia auxiliar em uma oferta mais ajustada e individualizada de tratamento. Este estudo tem foco específico nesta questão e utiliza dois parâmetros para dividir os pacientes em DRC sob hemodiálise em 4 grupos com diferentes estados imunológicos. Estes indivíduos foram randomicamente selecionados e divididos de acordo com o tempo em tratamento dialítico e contagem de leucócitos em sangue periférico, a quantidade de linfócitos T CD4 e a taxa de apoptose destas células foram aferidos em cada grupo e os parâmetros clínicos e laboratoriais foram correlacionados por análise multivariada. Os resultados demonstraram que o grupo há mais tempo em HD e menor contagem leucocitária possui maior número de células T CD4 em apoptose quando comparado aos demais grupos, desta forma, pode-se afirmar que os dois parâmetros de divisão dos pacientes (leucometria e tempo em diálise) utilizados neste estudo podem ser utilizados para ajustar a estratificar diferentes graus de imunossupressão nos grupos específicos de pacientes em DRC em HD. Dentre as variáveis clínicas analisadas, PTH, sp KT/V e tabagismo apresentaram diferenças significativas nos grupos analisados, indicando possível interação destes fatores com o estado imunológico nestes pacientes.

PALAVRAS CHAVE: hemodiálise; análise multivariada; imunossupressão; apoptose de células T CD4; tabagismo.

ABSTRACT

PETERLE, Vinícius Bortoloti, M Sc., Universidade de Vila Velha – ES, november. 2017.
Clinical and hematological data to group different Chronic Kidney Disease patients: a practical approach to establish different groups of patients.

Academic advisor: Carlos Eduardo Tadokoro

Chronic kidney disease (CKD) is a common pathway of several pathological processes, its evolution is insidious, and is characterized by progressive and irreversible loss of kidney function, which leads to a progressive accumulation of uremic toxins that lead these individuals, mainly in terminal stage CKD, to present a number of changes in their physiological behavior, including a persistent state of immune suppression. Thus, a better characterization and division of them in different groups of immune compromise could help in a more adjusted and individualized treatment offer. This study has a specific focus on this issue and uses two parameters to divide patients into CKD under hemodialysis in 4 groups with different immunological states. These individuals were randomly selected and divided according to time in dialytic treatment and peripheral blood leukocyte count, the amount of CD4 + T lymphocytes and the apoptosis rate of these cells were measured in each group and the clinical and laboratory parameters were correlated by multivariate analysis. The results showed that the group had a longer time in HD and a lower leukocyte count had a higher number of CD4 T cells in apoptosis when compared to the other groups. Thus, the two parameters of the groups division (leucocytes and time in dialysis) used in this study may be used to adjust to stratify different degrees of immunosuppression in the specific groups of patients in CKD in HD. The clinical variables PTH, sp KT / V and smoking presented significant differences in the analyzed groups, indicating possible interaction of these factors with the immunological status.

KEYWORDS: hemodialysis; multivariate analysis; immunosuppression; apoptosis; CD4 T cells; smoking.

1 INTRODUÇÃO

O conjunto de anormalidades estruturais ou funcionais do rim com implicações para a saúde do indivíduo é denominada doença renal. O seu início pode ser abrupto, ou insidioso, seguido de resolução plena ou persistência crônica, com espectro de manifestações a depender de características de cada etiologia e indivíduo (1). Por definição, entende-se por doença renal crônica (DRC) os casos em que as alterações acima descritas persistem por período superior a 3 meses (2). Atualmente as causas mais comuns de DRC são hipertensão arterial e diabetes mellitus (2).

A DRC é uma via comum caracterizada por substituição das estruturas especializadas do tecido renal por fibroblastos e matriz extracelular rica em colágeno, cursando com perda progressiva dos néfrons (unidade funcional do rim) e, por consequência, da função do órgão (1,2), expondo o indivíduo ao estado de uremia (3).

Uremia é o conjunto de manifestações clínicas não explicadas por alteração do volume hídrico corporal, do balanço iônico ou da falta das substâncias produzidas pelo rim, é a consequência do acúmulo de resíduos orgânicos que deixaram de ser excretados (3). Estes resíduos consistem, em sua maioria de pequenos fragmentos peptídeos de até 1 KD, oriundos do metabolismo proteico das células dos mamíferos e da própria microbiota intestinal destes indivíduos. (3)

Há correlação linear entre a perda de néfrons e acúmulo das toxinas urêmicas (1,3), mas, os sintomas iniciais de uremia são inespecíficos (por exemplo: mal estar e fadiga crônica) e geralmente se iniciam com redução da taxa de filtração glomerular (TFG) em torno de 60 ml/min/1,73m² (3). A queda progressiva do TFG torna mais intensos estes sintomas (3). Quando estes são intoleráveis, ou, o conjunto de alterações hidro-eletrolíticas são incompatíveis com a sobrevivência (DRC em estágio terminal), torna-se necessária a substituição da função renal, seja por métodos dialíticos, ou por transplante renal (3).

Os pacientes portadores de DRC em estágio terminal apresentam maior ocorrência de anemia, caquexia e doença aterosclerótica mais avançada (4), estes achados se associam diretamente à presença de marcadores de inflamação mais elevados nestes pacientes (4,5), além disso, há também indícios de deficiência imunológica, caracterizada por maior ocorrência de eventos infecciosos, (com maior gravidade), menor reatividade imunológica à vacinação e maior incidência de neoplasias

(4,5,7), ou seja, esta população mantém-se em um estado inflamatório sistêmico persistente ao longo do tempo, concomitante com imunossupressão.

Os achados acima possuem correspondência com os vários relatos na literatura em que observou o efeito deletério soro obtido a partir de pacientes urêmicos sobre vários aspectos da resposta imune (8). Nestes pacientes, geralmente há manutenção de um estado inflamatório sistêmico, caracterizado pela alteração dos níveis séricos dos reagentes de fase aguda (aumento da proteína C reativa, amilóide A, fibrinogênio e haptoglobina, e redução de transferrina e albumina no soro) e aumento da citocinemia, principalmente das citocinas IL1, IL6, TNF- α . (9,10), com simultâneo aumento dos produtos derivados do processo oxidativo em correlação direta com a redução da função renal (8).

Os métodos dialíticos, hemodiálise (HD) e diálise peritoneal (DP), oferecem a possibilidade dos indivíduos em DRC terminal de permanecerem vivos e com alívio dos sintomas urêmicos (10), entretanto, como as substâncias causadoras do estado de uremia possuem, geralmente, grande capacidade de ligação com proteínas plasmáticas e de difusão para o meio intracelular (11), o clareamento destas através destes métodos é limitada (10,11), ou seja, estes indivíduos ainda serão mantidos em um estado de “uremia residual” mesmo que adequadamente dialisados (3), que se agrava com o passar dos anos e com o acúmulo progressivo de substâncias de raio molecular superior aos poros das membranas de diálise (moléculas médias) (11). Além disso, o ajuste da prescrição destes métodos é baseada na cinética da uréia, molécula de pequeno raio molecular e alta difusão pelas membranas de diálise, (3) e não guarda correlação direta com os níveis das demais toxinas (10), ou seja, não há um método eficiente para aferir precisamente o efeito da diálise sobre todo o conjunto das toxinas urêmicas, embora, sejam eficazes em prever a mortalidade (10,11,12).

Assim, podemos inferir que durante o período em que o indivíduo portador de DRC em estágio terminal é mantido em suporte dialítico, devido ao estado de “uremia residual”, há progressiva deterioração imunológica, que se adiciona à deterioração já adquirida previamente à introdução da diálise durante a evolução da DRC.

1.1 O estado inflamatório sistêmico persistente na doença renal crônica.

No processo de DRC, independente do fator causal, os macrófagos mesangiais apresentam papel determinante na evolução da doença renal e no estabelecimento do estado sistêmico de inflamação (1), uma vez que serão as células indutoras processo de esclerose glomerular, e por conseguinte, de todo o néfron. Possivelmente a localização

em sítio de grande estresse hemodinâmico endotelial e a exposição a grande quantidade de antígenos (devido ao grande volume filtrado do plasma no glomérulo) são os fatores determinantes da maior susceptibilidade de ativação destas células apresentadoras de antígeno e consequente ativação inflamatória e indução da proliferação de fibroblastos, com subsequente perda do néfron e redução progressiva da filtração glomerular. (1)

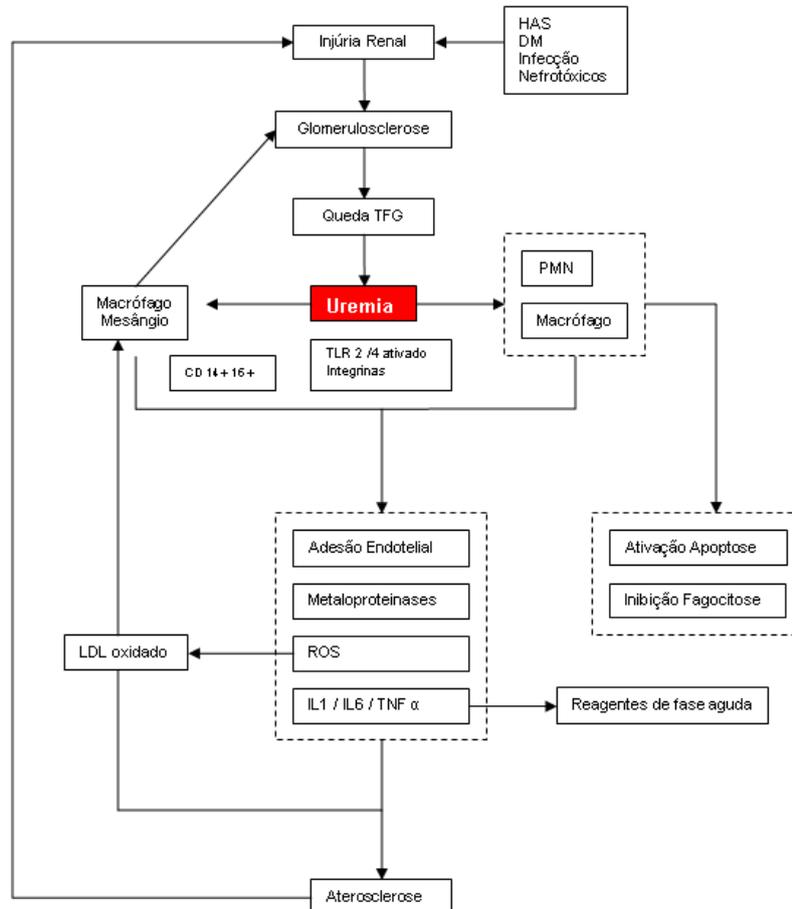


Figura 1: Visão esquemática do efeito da uremia como causa de estado inflamatório crônico por atuação nos constituintes da imunidade inata. Observe a característica da DRC em promover alterações que retroalimentam a promoção da lesão.

O acúmulo progressivo e persistente de toxinas urêmicas levará à ativação crônica das APC (monócitos, macrófagos, células polimorfonucleares e mesangiais) através da ativação dos Toll-like receptors (TLR) 2 e 4 (4); estas células cronicamente ativadas mantêm expressão de CD14 e CD16, integrinas e, do ponto de vista funcional, possuem maior tendência a apoptose, menor capacidade fagocítica, maior capacidade de adesão endotelial, maior liberação de metaloproteínas, aumento da produção de

espécies derivadas de oxigênio (ROS) e da liberação de IL-1, IL-6 e TNF- α , determinando um estado inflamatório crônico persistente. (9,10,11), e, no contexto das células mesangiais, contribuindo para a aceleração da queda do ritmo de filtração glomerular, conforme ilustrado na figura 1.

Outros fatores também atuam para ativação dos TLR, como a exposição crônica a fatores bacterianos da doença periodontal (muito freqüente nesta população) ou, quando o procedimento de hemodiálise é realizado via cateter endovenoso, por contato recorrente com o biofilme bacteriano nas linhas de diálise; além disso, a ocorrência de processos de peritonite bacteriana (diálise peritonial), contato com impurezas do dialisato, e no contexto de hemodiálise, o contato com o material da membrana de filtração (bioincompatibilidade), leva também a uma ativação crônica do complemento e estresse celular devido a alterações do citoesqueleto das células ao passarem pelo filtro do dialisador, contribuindo para amplificar o estado inflamatório. (13). Entretanto, a uremia é o principal fator de estresse inflamatório (14).

1.2 Alteração da homeostase dos linfócitos T CD4 na DRC terminal.

De uma forma geral a população de linfócitos T CD4 em linfonodos e sangue periférico de indivíduos portadores de DRC terminal apresenta-se reduzida (5,15), ocorre redução da relação CD4/CD8 e redução dos linfócitos T reguladores Foxp3+ (4,5,15), tais alterações se correlacionam com a perda progressiva da função renal, independente da etiologia (5,15).

A contagem de linfócitos T CD4 em sangue periférico apresenta-se reduzida em pacientes com DRC em estágio terminal devido a 3 fatores, redução do débito de células virgens do timo, diferenciação progressiva das células de memória periféricas em células efetoras, redução da capacidade proliferativa celular, relacionada ao encurtamento do telômero destas células, e aumento da taxa de apoptose. (5,15)

No estado de DRC terminal se observa redução dos níveis de IL7 e IL15 no timo (4,5) citocinas essenciais para a maturação de linfócitos TCD4 virgens no timo, o que acarreta na redução do débito destas células para a periferia (5). A redução dos níveis de IL7 também se relaciona com a redução da relação CD4/CD8 (4,5,15), o que aumenta o potencial citotóxico e inflamatório do sistema imune. (5,15)

A ativação prolongada crônica das APCs promovem maior grau de ativação e diferenciação dos linfócitos T CD4, através da ativação do gene NF κ B diretamente através da sinalização via complexo TCR / CD3 (7), ou por via indireta pela alta carga de TNF- alfa (1,3, 10), esta devido a ação direta dos receptores de TNF.

A ativação persistente das células T CD4 via TCR leva a diferenciação progressiva das células T CD4 da periferia de células de memória central (TCM), em de memória efetoras (TEM) e em de memória efetoras terminais (TEMRA) (5, 15, 16). As TEM possuem ciclo de vida mais curto, o que explica a redução da contagem de células na periferia, enquanto que as células TEMRA se apresentam em níveis insignificantes em indivíduos normais, porém, o mesmo não ocorre em indivíduos dialíticos (5, 15, 16), tais células, carecem de expressão de CD28, possuem maior atividade do NFkB e BCL2 (15, 16,17), isto é, são mais resistentes a apoptose, que em conjunto com a redução numérica das TCM e menor tempo de vida das TEM, torna as TEMRA mais frequentes (5,15). Caracteristicamente as células TEMRA secretam maiores quantidade de IFN gama, TNF alfa e granzima, o que lhes confere função citotóxica, agravando o processo inflamatório sistêmico e piorando o prognóstico cardiovascular. Este aumento da atividade replicativa, promove o encurtamento progressivo dos telômeros dos linfócitos T CD4 em pacientes portadores de DRC, limitando a taxa de replicação desta população (5,15).

O estímulo constante do TCR/CD3 leva ao aumento da ativação da ligação Fas – Fas ligante, por meio de maior expressão destes constituintes das células T CD4 ativadas (18,19). A ativação do complexo TCR CD3, e do Fas-Fasl, leva a maior consumo da proteína FLIP, deixando liberada a ativação da caspase 8 e culminando com redução dos níveis mitocôndriais de BCL2 em detrimento do aumento da BIN, ambos os processos, culminando em aumento da taxa de apoptose, caracterizando o processo de AICD. (18,19). Este processo em particular ocorre na resposta imune em situações fisiológicas e possui objetivo de limitar a expansão imunológica evitando a ocorrência de doenças auto-imunes por exemplo. (20)

Porém, as células T submetidas ao estado de uremia apresentam menor capacidade de síntese de IL-2, (7) sem esta citocina, a ativação do complexo TCR / CD3 leva a anergia e apoptose desta linhagem específica de linfócito T, ao invés de ativação celular. (5,7, 21, 22) A proliferação reduzida de novas linhagens no timo, associada a anergia de diversas linhagens na periferia colabora para redução da diversidade de receptores de células T disponíveis. (5, 23). Outro fenômeno que agrava este processo é o encurtamento do telômero das células T periférica em consequência do persistente estímulo proliferativo, sendo mais um elemento que dificultará a expansão clonal quando houver uma agressão “real” (21).

Dados experimentais revelam que a ativação constante de “*Toll Like Receptors*” nas APC leva a produção de níveis persistentemente elevados de TNF-alfa (23), níveis

progressivamente mais elevados desta citocinas atuando sobre os receptores de TNF I e II expressados pelos linfócitos T CD4 levam a estímulo simultâneo do processo de expansão clonal, via ativação de NFkB, e de apoptose via JNK por via mitocondrial (24,25, 26). As células T CD4 TEMRA são mais resistentes a apoptose via TNF alfa possivelmente se replicarão com maior intensidade em detrimento das demais células (virgens e de memória central) que sofrerão intenso processo de apoptose via TNF (7, 24, 25, 26). Além disso, a maior liberação de espécies reativas derivadas do oxigênio, cujo nível é elevado em consequência da ativação dos TLR, promove aumento de dano genético (7, 23, 24, 25, 26), contribuindo para maior taxa de apoptose dos leucócitos ativados, o que no longo prazo, poderão levar a redução da contagem periférica de linfócitos T CD4.

2 JUSTIFICATIVAS

2.1 Impacto socioeconômico da DRC terminal

Nas últimas décadas se observa um aumento da sobrevida média da população associado à maior prevalência de fatores de risco de doenças cardiovasculares, como obesidade, diabetes, dislipidemia, hipertensão arterial. Estas são provocadas pelo estilo de vida ocidental baseada em uma dieta rica em sódio e carboidratos, com baixo teor de fibras associado ao sedentarismo. Em conjunto, estes fatores aumentam de forma substancial a ocorrência da doença renal crônica em todo o mundo e, por consequência, o aumento do contingente de pessoas com indicação de terapia renal substitutiva (1,2).

No Brasil, conforme dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia estima-se que existiam 100.397 pacientes em diálise em 2013 (499 pacientes/milhão de habitantes); destes, 89% são submetidos à hemodiálise, sendo que os demais estão em diálise peritonial. A taxa de crescimento anual desta população é de 3% (14,7 paciente/milhão de habitantes) (27).

Além disso, a oferta de órgãos para transplantes (possibilidade para alta das terapias dialíticas e recuperação do estado de uremia) está aquém da demanda, conforme demonstrado na Tabela I. Assim, para um indivíduo portador de doença renal em estágio terminal resta a maior possibilidade de ser mantida por longo período em hemodiálise e exposto a maior mortalidade, em virtude das complicações da doença renal, do que receber o tratamento que realmente promoveria melhores resultados no longo prazo.

Tabela 1: Oferta de órgãos x Transplantes realizados em 2016 no Brasil

Necessidade anual estimada e nº de transplantes	Córnea	Rim	Fígado	Coração
Necessidade estimada	18.401	12.267	5.111	1.636
Transplantes realizados	14.534	5.492	1.880	357

Fonte – Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO)

Estima-se que nos EUA a população em diálise e com transplante renal funcionante correspondam a 1% da população; este contingente consome cerca de 5% de todo o gasto em saúde do país. Não há informações precisas em relação à realidade

brasileira, mas aplicando-se os dados americanos, observaríamos 0,7% da população entre dialíticos e transplantados, consumindo 3,5% do orçamento em saúde, isto é, um indivíduo gastando o equivalente a 5,15 pessoas do restante da população (2)

Do ponto de vista individual se observa uma mortalidade anual de aproximadamente 10% quando os pacientes são mantidos em diálise, sendo as principais causas de morbi-mortalidade relacionadas ao distúrbio inflamatório e imunológico conseqüente a uremia, além da perda da capacidade produtiva devido à doença ou ao próprio tratamento, sendo estes fatores preponderantes para o impacto no aumento de gastos quando se executa a análise coletiva (27).

2.2 Colaboração científica do projeto

A quantificação da atividade imune celular em indivíduos portadores de doença renal crônica em hemodiálise e sua correlação com características clínico-laboratoriais de forma a compreender quais são os grupos de maior risco imunológico é de interesse de toda a sociedade pelo custo representado por este grupo de indivíduos, além de ser uma contribuição para a melhora da qualidade de vida, assistência a saúde e, por consequência, aumentar a expectativa de vida destes pacientes.

Além disso, a possível correlação entre a quantificação da resposta imune celular e parâmetros clínico-laboratoriais pode contribuir para preencher uma lacuna em relação aos demais estudos de função do linfócito T CD4, pois, apesar de haver grande avanço na caracterização fenotípica destas células, os ensaios com objetivo de avaliar sua função, e por conseguinte, a atividade imunológica específica, são escassos e de pouca aplicabilidade na prática clínica (28). Nosso estudo pode contribuir na tentativa de estabelecer uma correlação acurada de parâmetros clínicos e laboratoriais de uso rotineiro na assistência médica com a dinâmica populacional dos linfócitos T CD4.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo principal do nosso estudo foi estabelecer um método de classificação imunológica dos indivíduos portadores de doença renal crônica em hemodiálise baseado no tempo de terapia dialítica e na contagem de leucócitos em sangue periférico, a partir da quantificação da taxa de apoptose de linfócitos T CD4 em amostras de sangue fresco.

3.2 Objetivos Específicos

A partir da classificação imunológica dos portadores de DRC dialítica, verificar por análise multivariada, a correlação destes grupos com características clínicas dos pacientes, de forma a definir quais os dados clínicos poderiam ser utilizados como indicadores de prognóstico imunológico, que por sua vez seriam de muita relevância para o tratamento e acompanhamento destes pacientes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção e alocação dos pacientes

Foram selecionados, aleatoriamente, 18 pacientes portadores de doença renal crônica em estágio terminal em hemodiálise de um centro de tratamento de Cariacica – ES; nenhum dos indivíduos selecionados apresentavam infecção aguda ou crônica, faziam uso atual de imunossupressores, ou eram portadores de neoplasia, ou de HIV, HBV ou HCV. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade de Vila Velha sob o protocolo 65896316.8.0000.5064.

Os indivíduos participantes foram divididos em 4 grupos conforme contagem de leucócitos e o tempo de terapia dialítica, sendo os pontos de corte: 4 anos em hemodíalise (1460 dias) e contagem de leucócitos em sangue periférico de 3000 por mm³ após lise de eritrócitos em câmara de Neubauer, ambos valores baseados na média geral do grupo estudado, conforme observado na tabela 2., tais valores foram definidos de forma arbitrária uma vez que não há estudo de com definições similares às utilizadas por nós. Cabe ainda ressaltar, que ambas as variáveis apresentaram distribuição gaussiana.

Tabela 2: Divisão de pacientes pelo tempo em diálise e contagem de leucócitos.

Grupos	Tempo em diálise**	Contagem de leucócitos
1 (< 4 anos / < 3000)	666 ± 605	2466 + 730
2 (< 4 anos / > 3000)	647 ± 380	4400 + 773
3 (> 4 anos / < 3000)	2589 ± 485	1957 + 262
4 (> 4 anos / > 3000)	1806 ± 179	4573 + 585

* Os valores do tempo em diálise e contagem de leucócitos estão expressos em Média ± DP

**O tempo em diálise foi medido em dias. Cada período de 365 dias foi considerado equivalente a 1 ano; portanto, 1460 dias corresponderiam à 4 anos de diálise.

4.2 Coleta e preparo das amostras de sangue

Em todos os pacientes foi coletado sangue total antes do início da diálise, após o preenchimento com sangue da linha venosa e após punção ou conexão com cateter de diálise. As amostras foram colhidas cuidadosamente para evitar “*shear stress*”, e armazenadas em frascos estéreis com EDTA, acondicionado em recipiente com gelo, porém sem contato direto, até a recepção e manipulação no laboratório. Este período entre coleta e início do processamento das amostras de sangue ocorreu dentro de um intervalo de 2 h. Não foram utilizadas amostras com intervalo entre coleta e

processamento maior que 2 h para normalizar fatores que poderiam comprometer a quantidade de células em apoptose.

Assim que as amostras chegaram ao laboratório de imunobiologia da Universidade Vila Velha, ES, elas foram colocadas em tampão de lise (NH_4Cl 8,26 g, NaHCO_3 1,19 g, 200 μL de EDTA à 0,5 M, e completar o volume com água destilada até o volume de 100 mL; ajustar o pH para 7.3, esterilizar a solução em filtro de 0,22 μm , e guardar a 4 °C até o uso; quando for utilizar, diluir 10x em água destilada estéril em temperatura ambiente) na proporção de 1:9 (vol:vol) e incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Ao final deste período, as amostras foram centrifugadas a 390 G, à 10 °C, e ressuspendidas em PBS (solução salina tamponada com fosfato). Uma nova centrifugação foi realizada (390 G, 10 °C) para remover qualquer resquício de tampão de lise. As células foram ressuspendidas em tampão de FACS e contadas em câmaras de Neubauer. 5×10^6 células foram marcadas com anticorpo anti-CD4 APC (BD Biosciences, USA), por 30 min à 4 °C e, em seguida, centrifugadas e ressuspendidas em tampão para marcação com anexina V (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,8 mM. Esterilizar em filtro de 0,22 μm). Cada amostra recebeu Annexin-V-PE (BD Biosciences, USA) e foram incubadas por 10 min à 4 °C. Ao final desta incubação as amostras foram lidas em um citômetro de fluxo (FACS Calibur, BD Biosciences, USA) onde foram calculadas as porcentagens de células T CD4 totais (CD4+) e de células T CD4 em apoptose (CD4+ / Annexin-V+). Os números finais de células T CD4 totais e em apoptose foram determinados pelo cálculo da porcentagem sobre o número de leucócitos do paciente.

4.3 Dados clínicos e análise estatística

As variáveis coletadas, sob preenchimento de formulário padrão com base em dados obtidos de prontuário e entrevista com cada paciente, foram: idade, sexo, etnia, índice de massa corporal (IMC), grau de inflamação por má-nutrição (MIS), histórico de diabetes mellitus ou hipertensão arterial sistêmica, níveis de hemoglobina (g/dL), cálcio corrigido pela albumina (mEq/L), albumina sérica (g/dL), fósforo (mEq/L), paratormônio (PTH) intacto (pg/dL), creatinemia (mg/dL), single pool (sp) KT / V (relação entre o volume depurado dividido pelo volume de distribuição corporal da uréia), nível sérico de anticorpos IgG anti HbsAg (UI/mL), uso de eritropoetina, histórico de tabagismo, e presença de diurese residual, contagem de linfócitos T CD4 em sangue periférico. O tabagismo e o uso de eritropoetina foram medidos por índices, onde atribuíram-se valores 0 (“não fumante” ou “não usuário”) ou 1 (“fumante” ou usuário) aos pacientes; feito isto,

foram calculadas as médias e erros padrões destes índices para cada grupo; quanto mais próximo de 1 é o índice, maior é a proporção de fumantes ou usuários de eritropoetina no grupo avaliado.

Para que estas variáveis pudessem ser comparadas simultaneamente e pudéssemos observar quais seriam as mais relevantes para cada grupo de pacientes, realizamos a análise multivariada que foi representada por vetores de relevância. Desta forma, o resultado final da análise multivariada é um modelo agrupado de vetores; quanto mais importante uma determinada característica for para um determinado grupo, maior e mais perto apontará este vetor para aquele grupo. Deste modo, uma tabela com a ordem de relevância de cada variável, para cada grupo de pacientes, foi descrita. Para construção deste modelo agrupado de vetores foi utilizado o software FITOPAC (Unicamp, SP) (29).

Os dados obtidos das análises de citometria de fluxo foram comparados pelo método de ANOVA, seguidos por correção de Tukey. Alguns dos dados clínicos dos pacientes foram testados frente a valores de referência já previamente estabelecidos como dentro de valores padrões normais da população. Estes foram os valores de referência utilizados para compararmos com as médias dos grupos de pacientes: Kt/V (1,2), Fósforo (4,5 mg/dL), PTH (55 pg/mL), MIS (10,0), Albumina (3,7 g/dL), anti-HbsAg (10 mUI/mL), Cálcio total/corrigido (10,2 mg/dL), e índice de massa corpórea (21.8). Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Classificação imunológica dos portadores de DRC dialítica

Os dados gerais observados no estudo estão demonstrados na tabela 3. Analisando a população estudada (n=18), percebemos que trata-se de um grupo de grande variação de faixa etária, indo de 24 a 77 anos, com tendência a manutenção de hiperfosfatemia, com boa adequação dialítica média, se observarmos o sp Kt/V médio acima de 1,2 (12). Observa-se que apesar da seleção dos participantes ter sido aleatória, houve prevalência baixa de diabetes, que não corresponde à característica da população brasileira (27). Contudo, isso pode representar uma vantagem para nosso estudo por excluir um importante fator de estresse imunológico que poderia interferir e dificultar a análise dos resultados, porém, os dados observados por nós, não podem ser diretamente utilizados em para os pacientes com *diabetes mellitus*.

A taxa média geral de linfócitos T CD4 de 597 células por mm³ de sangue periférico é compatível com o observado em outros estudos com metodologia similar (16, 28, 30, 31), e também é significativamente menor do que o nível médio de referência em adultos saudáveis brasileiros (900 células por mm³) (32), apesar de estar dentro da faixa de variação normal (477 a 1140 células por mm³) (32), em 11 % destes pacientes a contagem foi inferior a 200 por mm³, valor que em portadores do vírus HIV se associa a incidência elevada de doenças oportunistas e definição de síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) (33,34), assim, podemos afirmar que há diferentes níveis de estado imunológico neste grupo de pacientes.

A taxa média de células T CD4 apoptóticas identificadas pela anexina V foi de 8% no geral (tabela 3), abaixo dos 15% observado em outras análises (16, 28, 30, 31), porém, quando observamos esta taxa nos subgrupos de nosso estudo, observamos que a taxa de apoptose não foi uniforme, nos grupos 1, 2 e 4 as taxas foram respectivamente de 5,86; 4,65 e 4,75%, contra 14,13% no grupo 3 (tabela 3). Portanto, a diferença entre os nossos resultados em relação aos outros estudos pode estar ser devida a diferença na composição da população de doentes renais crônicos dialíticas nos diversos estudos, os quais, assim como o nosso, são em centros únicos e com amostras pequenas, favorecendo a ocorrência destas diferenças.

Tabela 3: Descrição geral das variáveis estudadas na população estudada e nos grupos analisados.

V	Geral		Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Diabetes	3,56		30,00		30,00		33,00		33,00	
IAS	34,44		25,00		20,00		1,00		1,00	
Eritropoetina	72,22		1,00		20,00		1,00		1,00	
Tabagismo	38,88		00,00		30,00		00,00		00,00	
Diurese Residual	27,78		50,00		30,00		33,00		00,00	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Dias HD	492,00	392,00	566,00	504,61	547,00	390,43	2.589,33	484,56	305,67	78,63
idade	51,00	5,50	44,25	3,66	54,80	2,09	40,50	2,28	50,33	5,28
MC	23,00	4,17	22,88	2,45	24,24	4,45	21,63	5,07	25,37	4,25
MS	3,00	4,42	3,75	3,74	3,60	2,30	0,00	4,20	0,33	3,86
lb	0,00	,22	1,43	,32	0,20	,00	3,30	3,57	1,13	3,78
Calcio	0,00	3,83	3,78	3,80	3,74	3,26	3,86	,25	0,59	3,77
Fósforo	5,00	,59	3,25	,33	3,94	3,97	3,97	2,48	3,87	3,84
PTH	322,00	329,39	382,75	305,98	234,40	02,21	701,20	355,15	330,33	344,95
Albumina	4,00	3,34	3,78	3,53	3,20	3,24	3,72	3,33	3,47	3,23
Creatinina	1,00	3,25	0,75	3,90	1,84	3,21	2,70	,94	1,37	2,84
GV	,51	3,35	,29	3,39	,55	3,12	,71	3,45	,35	3,06
Anti Hbs	14,00	74,02	53,18	02,70	223,46	296,89	37,98	36,16	32,30	29,16
Leucócitos	3185,00	312,77	2.465,50	729,92	4.400,00	772,92	3.957,00	261,57	4.573,33	385,26
CD4 %	27,00	21,25	7,50	7,50	2,77	2,33	32,91	7,16	0,76	3,77
CD4	561,00	403,75	357,73	14,36	354,56	322,69	029,64	68,37	304,63	303,50
Apoptose CD4 %	3,00	7,24	3,86	3,40	4,65	,32	4,13	3,52	4,75	2,48
CD4 Líquido	397,00	360,84	443,92	332,21	333,29	308,94	386,15	79,37	475,90	273,37

Os grupos 1 e 3 tiveram leucometria significativamente mais baixa quando comparados aos grupos 2 e 3 (Figura 2 - abaixo). Entretanto, quando avaliamos as porcentagens de células T CD4 (Figura 2), seus números totais (Figura 2) e em apoptose (Figura 2), verificamos que estes valores foram sempre maiores no grupo 3, apesar desta diferença não ter sido observada na porcentagem de células T CD4 em apoptose (Figura 2), entretanto, neste grupo podemos observar grande variação do percentual de células apoptóticas.

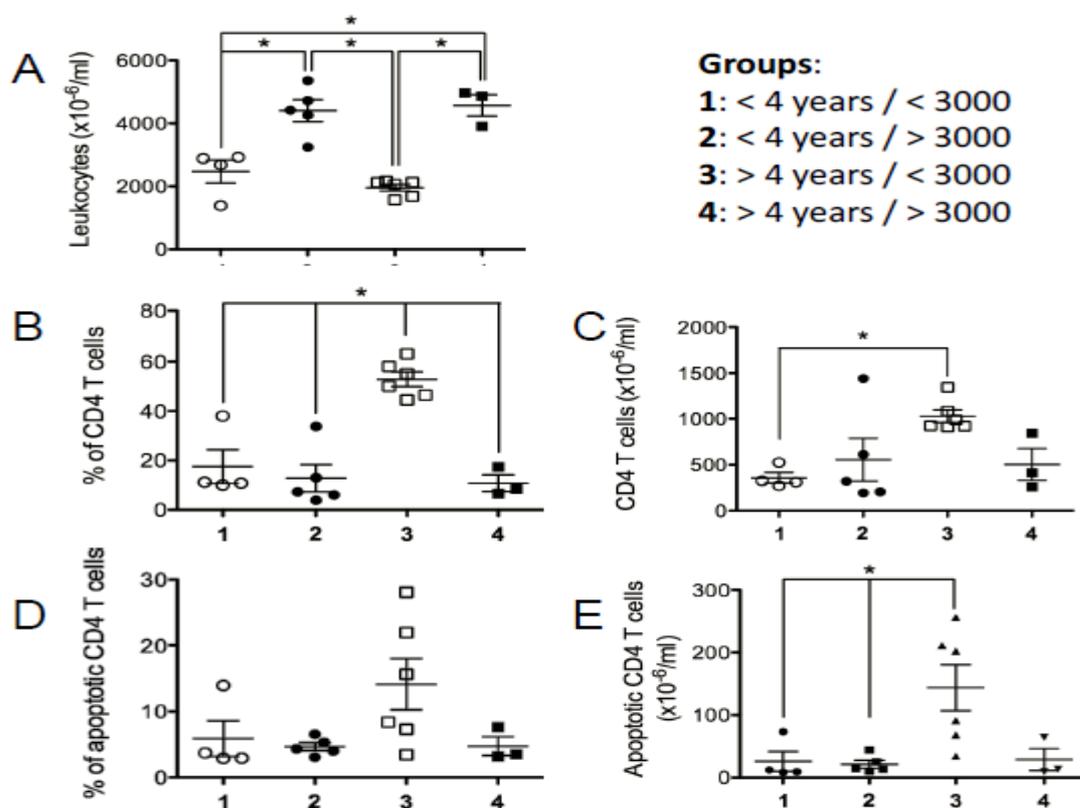


Figura 2: Correlação do tempo hemodiálise e leucometria nas células T CD4 de pacientes com DRC. (Intervalos referentes a média e desvio padrão – valores demonstrados na tabela 3)

5.2 Validação da classificação dos pacientes em DRC dialítica em grupos imunológicos distintos

O objetivo principal do nosso estudo foi estabelecer um método de classificação imunológica dos indivíduos portadores de doença renal crônica em hemodiálise baseado no tempo de terapia dialítica e na contagem de leucócitos em sangue periférico, a partir da quantificação da taxa de apoptose de linfócitos T CD4 em amostras de sangue fresco.

O uso da leucometria como parâmetro de análise foi baseado na variação esperada da contagem das demais linhagens celulares que compõem tal medida, principalmente os neutrófilos e monócitos que guardam correspondência com o estado inflamatório do indivíduo em DRC, uma vez que o estado de ativação persistente dos leucócitos promovido pela uremia cursa com maior taxa de apoptose destas células. O ponto de corte para este parâmetro foi definido conforme a média da contagem do grupo geral.

Um fator a ser considerado, e que não foi pesquisado em nosso estudo, é se tal nível de ativação guarda correspondência direta com níveis mais elevados de citocinas inflamatórias (IL-1, TNF alfa), ou se há uma variação na susceptibilidade maior ou menor destas células à ação destas citocinas, ou ambas as situações concomitantemente.

O outro fator utilizado na categorização dos pacientes foi o tempo, a idéia inicial foi utilizar a idade do indivíduo como base para a classificação, dada a influência deletéria desta sobre o estado imunológico do indivíduo (35), entretanto, não conseguimos demonstrar nenhum tipo de correlação significativa da idade com os achados em nosso estudo. Consideramos então, utilizar o tempo de evolução da doença de base, como forma de quantificar o tempo de “estresse urêmico”, porém não foi possível obter este dado, desta forma, optamos em buscar o tempo em que o indivíduo está em terapia dialítica.

A figura 2 demonstra que ao utilizarmos ambas as variáveis (leucometria e tempo em hemodiálise) identificamos uma maneira de evidenciar diferentes comportamentos de contagens de células T CD4, com identificação, inclusive, do grupo 3 com maior número de células T CD4 em apoptose.

Quando observamos a distribuição entre os 4 grupos, observamos tendência de diferença entre as médias de idade nos grupos 2 e 4 (mais velhos) contra o 1 e 3 (mais jovens), como já relatado anteriormente, quando analisamos a variável idade isoladamente não houve correlação significativa com as contagens celulares, tampouco variação significativa na análise multivariada. Provavelmente, tal achado trata-se de uma consequência de uma maior taxa de mortalidade nos grupos 1 e 3, que teoricamente são os grupos sob maior estresse imunológico, logo, mais vulneráveis a tal evento.

5.3 Anarquia imunológica no grupo 3

Quando se observa a figura 2 pode-se concluir que todos os grupos possuem uma distribuição muito homogênea na contagem de CD4 totais e de CD4 em apoptose, tanto em valores absolutos, como em percentual, exceto o grupo 3, cuja contagem de CD4 é homogênea, porém os valores de apoptose são muito heterogêneos, evidenciado pela grande amplitude de distribuição dos valores no gráfico.

Não há possibilidade de tal achado ter ocorrido por erro laboratorial, uma vez que o processamento das amostras se deu sem o conhecimento de qual grupo o indivíduo era, e as amostras foram coletadas em dias diferentes em conjunto com as amostras dos outros grupos, ou seja, se evidenciaria falha nos demais grupos também, o que não ocorreu.

Considerando a dinâmica populacional de linfócitos T CD4 durante o estímulo imunológico, há uma fase proliferativa – expansão clonal -, seguida de posterior incremento de apoptose – retração clonal -, isto é, a população cresce e diminui de forma organizada (processo mediado normalmente pelo complexo TCR / FAS – FAS ligante) (19).

A única forma que explica a distribuição no grupo 3 é quando há ocorrência de elevada taxa de apoptose há elevada taxa de proliferação, quando há baixa taxa de proliferação há baixa taxa de apoptose, de forma que, apesar da grande dispersão da apoptose, haverá contagens populacionais homogêneas, como se evidencia no gráfico da figura 2. Tal achado é contraditório com o processo esperado normal, conforme descrito no parágrafo anterior. Assim, concluímos que o grupo 3 apresenta comportamento anárquico da população de linfócitos T CD4, o que pode caracterizar um estado de deterioração imunológica consequente a maior estresse imunológico ao longo dos anos de DRC, ou maior susceptibilidade individual.

5.4. Fatores clínicos/laboratoriais podem ser utilizados para definir pacientes dentro dos grupos previamente estabelecidos

A divisão dos pacientes com DRC em 4 grupos, de acordo com parâmetros leucocitários e tempo em diálise, revelou que estes pacientes possuem um perfil distinto de células T CD4 em apoptose. Entretanto, seria importante observar se outros fatores clínicos e/ou laboratoriais, coletados de rotina durante a triagem e terapia dialítica, estivessem correlacionados de maneira distinta entre os grupos. Deste modo, os pacientes poderiam ser classificados nos 4 grupos sem que a análise de células T CD4 em apoptose fosse necessária. Para compararmos todos os fatores com os 4 grupos, concomitantemente, decidimos por realizar uma análise multivariada (Figura 3).

Na figura 3 podemos observar a análise estatística multivariada os vetores de intensidade e sua proximidade com os grupos estudados. Quanto maior e mais próximo um determinado vetor está de um determinado grupo, maior é sua correlação com este grupo. Deste modo, verificamos que no Grupo 1 os fatores que mais se correlacionam com este grupo foram diurese residual, hemoglobina e albumina sérica; no Grupo 2 foram histórico de tabagismo, albumina sérica, Anti- HbsAg e sp Kt / V; no Grupo 3 foram MIS, Fósforo sérico, uso de eritropoetina, sp Kt/V, e PTH intacto; e no Grupo 4 foram o Cálcio corrigido, IMC, PTH intacto, níveis de hemoglobina e uso de eritropoetina. A tabela II lista os fatores clínicos/hematológicos para cada grupo.

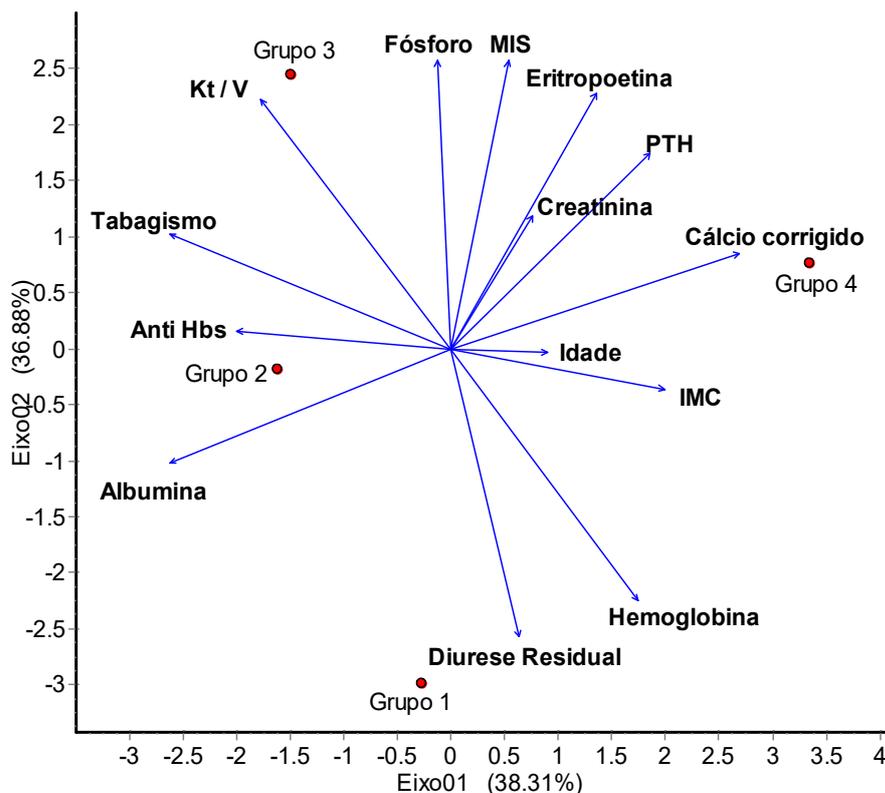


Figura 3: Análise multivariada para correlação de fatores clínicos/hematológicos com grupos de pacientes com DRC.

Os dados clínicos e/ou hematológicos levantados durante triagem e terapia dialítica foram correlacionados com os 4 grupos definidos em nosso estudo. A proximidade e tamanho de cada vetor são utilizadas para medir a influência de cada parâmetro em determinado grupo. Os dados de todos os pacientes foram compilados para realização desta análise (n=18).

A análise de componentes principais e a construção dos autovetores tem o objetivo de finalidade de substituir um conjunto de variáveis correlacionadas por um conjunto de novas variáveis não correlacionadas, as quais possuem independência estatística (29). Quando observamos as variáveis relacionadas à doença mineral e óssea (cálcio corrigido, fósforo e PTH) observamos que todas ganham significância coincidentemente nos grupos em diálise há mais de 4 anos (grupos 3 e 4), e, no contexto de pacientes em hemodiálise, quanto maior o tempo em terapia mais frequente e intenso é o hiperparatireoidismo (36), o mesmo pode ser aplicado à creatinina sérica, cujos níveis tendem a ser maiores em indivíduos há maior tempo sem função renal residual a qual é

perdida ao longo dos anos em hemodiálise (1, 37,38), o que se correlaciona com a grande relevância de diurese residual apenas no grupo 1.

Tabela 4: Correlação dos fatores clínicos/hematológicos para cada grupo de pacientes.

Grupo 1	Autovetor*	Grupo 2	Autovetor
Diurese Residual	-0.3942	Tabagismo	-0.4022
Hemoglobina	-0.3455	Albumina	-0.4017
Albumina	-0.1565	Anti Hbs	-0.3055
IMC	-0.0560	Kt / V	-0.2715
Idade	-0.0052	Fósforo	-0.0190
Grupo 3	Autovetor	Grupo 4	Autovetor
MIS	0.3947	Cálcio corrigido	0.4119
Fósforo	0.3943	IMC	0.3066
Eritropoetina	0.3504	PTH	0.285
Kt / V	0.3423	Hemoglobina	0.2673
PTH	0.2668	Eritropoetina	0.209
Creatinina	0.1814	Idade	0.1385
Tabagismo	0.1571	Creatinina	0.1164
Cálcio corrigido	0.1305	Diurese Residual	0.0988
Anti Hbs	0.0238	MIS	0.0837

Em relação a eritropoetina, observamos uma grande proporção dos pacientes eram prescritos, 72,22% (tabela 2), de forma que devido a restrição numérica do grupo sem eritropoetina não podemos inferir com clareza os seus efeitos sobre a apoptose de células T CD4, outro viés encontrado ocorre pela inclusão no estudo de pacientes com menos de 6 meses em diálise, uma vez que grande parte dos pacientes apresentam diagnóstico ao iniciar terapia dialítica (27), possivelmente, ou ainda não tiveram tempo para receber a prescrição de eritropoetina, ou ainda não obtiveram liberação pelo SUS, gerando um fenômeno em que os pacientes em diálise há mais tempo possuem maior chance de estar em uso de eritropoetina, evidenciado pela força de relevância nos grupos 3 e 4.

Acreditamos que a classificação dos grupos imunológicos levando em consideração o tempo em diálise possa gerar uma distorção na análise, uma vez que algumas das variáveis apresentam alterações inexoráveis com o passar dos anos, como ocorre com a idade por exemplo.

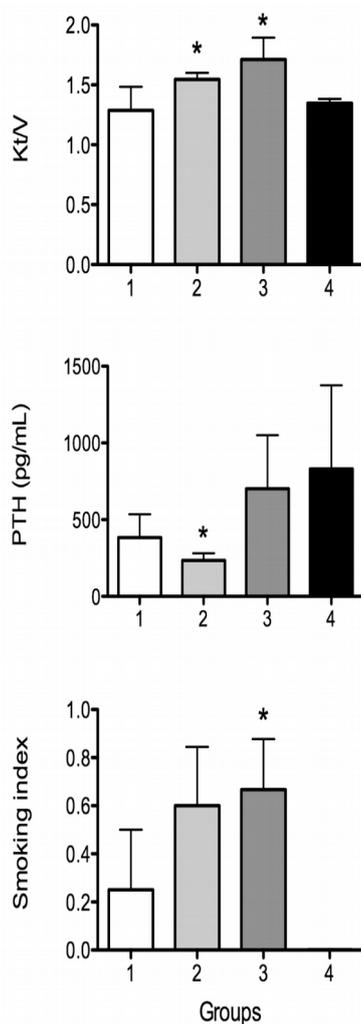
Excluídas as variáveis relacionadas ao tempo em hemodiálise (37,38), observamos que os fatores mais relacionados ao grupo 2 são tabagismo, Anti Hbs e spKt/V e no grupo 3 são o MIS, spKt/V e tabagismo.

O nível de produção de anticorpos anti HbsAg possui elevada correlação no grupo 2, refletindo provavelmente o melhor estado imunológico deste grupo evidenciada pela resposta vacinal é um indício de melhor estado imunológico.

Logo, indivíduos com menos de 4 anos em hemodiálise, tabagistas e com melhores spKt/V possivelmente estariam no grupo 2 com melhor, ao passo que indivíduos com maior atividade inflamatória (MIS), spKt/V e tabagistas estariam no grupo 3.

5.4 Alterações de Kt/V, PTH e influência do tabagismo nos grupos de pacientes testados

De todos os parâmetros medidos dos nossos pacientes, apenas sp Kt/V, PTH, e o índice de fumantes estavam significativamente alterados quando comparados com valores de referência. Quando comparados a um Kt/V de 1.2 (indicativo de uma boa adequação dialítica), os pacientes do grupo 2 e 3 apresentaram valores acima deste (Figura 4), confirmando os achados na análise multivariada.



Groups:

- 1: < 4 years / < 3000
- 2: < 4 years / > 3000
- 3: > 4 years / < 3000
- 4: > 4 years / > 3000

Figura 4: Alterações nas avaliações de Kt/V, PTH, e índice de tabagismo. (média e desvio padrão)

Provavelmente uma melhor adequação dialítica caracterizada por maiores spKt/V se relaciona a menor grau de uremia residual e alívio do estresse promovido pela uremia, porém isso não explicaria a ocorrência de maior spKt/V no grupo 3. Como a adequação dialítica guarda correspondência com sobrevida, possivelmente, indivíduos com maior grau de atividade inflamatória e maior deterioração imunológica com níveis mais baixos de Kt/V tendem a possuir maior vulnerabilidade ao óbito, isto é, o spKT/V

selecionaria os pacientes com passar do tempo, colaborando para maiores níveis médios desta variável neste grupo.

O grupo 2 apresentou níveis significativamente menores de PTH, sendo que nos grupos 3 e 4 estes ficaram acima do limite máximo considerado de 495 pg/dL (Figura 4). Recentemente observa-se que um maior grau de ativação dos linfócitos T maduros inseridos na medula óssea correlaciona-se a melhor resposta dos osteoclastos ao PTH e por conseguinte na manutenção de níveis menores de PTH (36), uma melhor atividade dos osteoclastos induzem aos linfócitos medulares a apresentarem um maior densidade de receptores ao PTH, o qual possui ação antiapoptótica sobre os linfócitos (36), guardando correspondência com menor grau de atividade inflamatória.

Uma medição que nos chamou a atenção foi o índice de tabagismo (Figura 4). Os pacientes do grupo 3 possuem uma maior quantidade de fumantes que os demais grupos e no grupo 4 não encontramos fumantes. O índice de tabagismo dos grupos 1 e 2 não foram diferentes ao não-tabagismo (índice = 0) porque se tratam de grupos onde este hábito é muito heterogêneo. O tabagismo geralmente se relaciona com maior estresse oxidativo e, teoricamente, maior grau de atividade inflamatória e de apoptose, possivelmente sendo um dos fatores que colaboram para o maior estresse imunológico no grupo 3 (39).

6 CONCLUSÃO

Podemos dizer que os pacientes portadores de DRC dialítica são imunossuprimidos e sua divisão em grupos com características clínicas/hematológicas distintas poderia auxiliar na elaboração de planos de tratamento mais adequados a cada fase da doença. Nosso estudo visou exatamente este objetivo geral, pois conseguimos separar estes pacientes de acordo com o número de leucócitos e período em terapia dialítica (Tabela 2), avaliando a quantidade de células T CD4 em apoptose (Figura 2; em tese, quanto maior a quantidade de células T CD4 em apoptose, mais imunocomprometido estaria o paciente).

A população de indivíduos portadores de DRC, em estágio terminal em hemodiálise, não é homogênea no que diz respeito a atividade inflamatória basal, apoptose e contagem de linfócitos T CD4, sendo que, a divisão em grupos baseados em contagem de leucócitos e tempo de hemodiálise é um bom indicador deste quadro. A influência de cada um dos fatores clínicos determinantes de apoptose de linfócitos T CD4 dentro de cada faixa de tempo e leucometria não foi uniforme.

Utilizando como parâmetros o tempo em hemodiálise e a leucometria foi possível distinguir 4 grupos distintos dentre os pacientes portadores de DRC dialítica. Indivíduos com mais de 4 anos em hemodiálise com contagem de leucócitos em sangue periférico inferior a $4000/\text{mm}^3$ possuem maior quantidade de células T CD4 em apoptose, e, por conseguinte seriam indivíduos com maior grau de imunossupressão.

Os fatores clínicos relacionados ao grupo de maior deterioração imunológica é o MIS, tabagismo e spKT/V, enquanto o PTH está relacionado ao grupo com possivelmente melhor estado inflamatório e imunológico. Observamos efeitos contraditórios em relação ao tabagismo e ao spKT/V.

Estudos prospectivos, de diferentes centros e com populações maiores são necessários para melhor definição do comportamento imunológico dos indivíduos em hemodiálise.

Os resultados aqui apresentados foram coletados de um único centro, com número relativamente pequeno de pacientes, porém aponta para utilização de dois parâmetros simples (tempo de diálise e contagem de leucócitos) para divisão em dos pacientes com DRC em 4 grupos (Tabela I), sendo que o grupo com maior tempo em diálise (> 4 anos) e de menor número de leucócitos (<3000) parece ter um maior comprometimento da resposta imune pela alta de células T CD4 em apoptose (Figura 1).

Deste modo, pacientes incluídos por estes dois critérios nestes grupos poderiam receber tratamentos diferenciados para cada “estágio imunológico” que se encontrem.

A análise prospectiva também poderá determinar as características evolutivas de cada grupo, ou mesmo determinar se os achados de cada um são passos evolutivos de um mesmo processo de base.

Para obtermos conclusões mais precisas, deve ser levado em conta os diagnósticos etiológicos da doença renal crônica, co-morbididades, e tempo de instalação da doença renal, se diferentes métodos dialíticos teriam diferentes impactos sobre o sistema imunológico.

Outros fatores interessantes para futura avaliação seriam o impacto prático dos dados do presente estudo correlacionando o grau de imunossupressão em pacientes em doença renal dialítica conforme os parâmetros propostos em nosso estudo, que seria baseado na ocorrência de eventos infecciosos, neoplasias, e desfecho do transplante renal.

7 REFERÊNCIAS

1. KLAHR, S., SCHREINER, G., ICHIKAWA, I., The progression of renal disease, *The New England Journal of Medicine*, 23 de Junho de 1988, 318(25): 1657-1665
2. KDIGO, Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease, 2012.
3. MEYER, T.W., HOSTETTER, T.H., Uremia, *The New England Journal of Medicine*, 27 de Setembro de 2007, 357(13): 1316-1325.
4. VAZIRI, N.D., PAHL, M.V., CRUM, A., NORRIS, K., Effect of uremia on structure and function of immune system, *Journal of Renal Nutrition*, Janeiro de 2012, 22(1): 149-156, doi:10.1053/j.jrn.2011.10.020
5. MEIJERS, R.W.J., BETJES, M.G.H., BAAN, C.C., LITJENS, N.H.R., T-cell ageing in end stage renal disease patients, *World Journal of Nephrology*, 06 de Novembro de 2014, 3(4): 268-276, doi: 10,5527/wjn.v3.i4.268.
6. VANHOLER, A.V.L., DHONDT, A.M., DE SMET, R., RINGOIR, S., Influence of uraemia and haemodialysis on host defence and infection, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1996, 11: 593-598.
7. BETJES, M.G.H., MEIJERS, R.W.J., LITJENS, N.H.R., Loss of renal function causes premature aging of the immune system, *Blood Purification*, 20 de Dezembro de 2013;36:173–178, doi: 10.1159/000356084
8. AMORE, A., COPPO, R., Immunological basis of inflammation in dialysis, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2002, 17(Suplemento 8): 16-24.
9. COHEN G., HÖRL, W.H., Immune dysfunction in uremia – an update, *Toxins*, 24 de Outubro de 2012, 4: 962-990.
10. HÖRL, W.H., Hemodialysis membranes: interleukins, biocompatibility and middle molecules, *Journal of American Society of Nephrology*, 2002, 13: S62-S71.
- 11.. HAUSER, A.B., STINGHEN, A.E.M., KATO, S., BUCHARLES, S., AITA, C., YUZAWA, Y., PECOITS-FILHO, R., Characteristics and causes of immune dysfunction related uremia and dialysis, *Peritoneal Dialysis International*, 2008 (Suplemento 3) : S183-S187.
12. DAUGIRDAS, J.T., *et al.* Prescrição de hemodiálise crônica: uma abordagem da cinética da uréia. In: Daugirdas JT, Ing TS. Manual de diálise. 3a ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2003. Cap. 9

- 13.** HADLEY, D., CHEUNG, R.K, BECKER, D.J., GIRGIS, R., PALMER, J.P., CUTHBERTSON, D., KRISCHER, J.P., DOSCH, H.M., Large Scale prospective T-Cell function assays in shipped, unfrozen blood samples: Experiences from multicenter TRIGR trial, *Clinical and vaccine immunology*, Fevereiro de 2014, 21(2): 203-211.
- 14.** AMORE, A., COPPO, R., Immunological basis of inflammation in dialysis, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2002, 17(Suplemento 8): 16-24.
- 15.** MEIJERS, R.W., LITJENS, R.W., LITJENS, N.H., DE WIT, E.A., LAGERAK, A.W., VANDER SEPK, A., BAAN,C.C., WEIMAR, W. , BETJES, M.G., Uremia causes premature ageing of the T cell compartment in end-stage renal disease patients. *Immunology Ageing* 2012; 9: 19. doi: 10.1186/1742-4933-9-1912.
- 16.** MOSER, B., ROTH, G., BRUNNE, M. et al. Aberrant T cell activation and heightened apoptotic turnover in end-stage renal failure patients: a comparative evaluation between non-dialysis, haemodialysis, and peritoneal dialysis. *Biochemistry Biophysical Research Community* 2003; 308: 581–585.
- 17.** YOON, J.W., PAHL, M.V., VAZIRI, N.D. Spontaneous leukocyte activation and oxygen-free radical generation in end-stage renal disease. *Kidney International*. Janeiro de 2007 71(2):167–72.
- 18.** LILES, W.C, KIENER, P.A., LEDBETTER, J.A., ARUFFO, A., KLEBANOFF, S.J., Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: Implications for the regulation of apoptosis in neutrophils, *Journal of Experimental Medicine*, 184:429-440, 1996.
- 19.** KRAMMER,P.H., ARNOLD, R., LAVRIK,I.N., Life and death in peripheral T cells, *Nature Reviews, Immunology*, vol 7, Julho de 2007, 532-542.
- 20.** SQUIER, M.KT., SEHNERT, A.J., COHEN, J.J., Apoptosis in leukocytes, *Journal of leukocyte biology*, 57:2-10,1995.
- 21.** JABER,B.L., CENDOROGLO, M., BALAKRISHNAN,V.S., PERIANAYAGAM, M.C., KING, A. J., PEREIRA, B.J.G., Apoptosis of leukocytes: Basic concepts and implications in uremia.
- 22.** BETJES, M.G., Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease. *Nature Reviews Nephrology* 2013; 9: 255-265, doi: 10.1038/nrneph.2013.44.
- 23.** YOON, J.W., PAHL, M.V., VAZIRI, N.D. Spontaneous leukocyte activation and oxygen-free radical generation in end-stage renal disease. *Kidney International*. Janeiro de 2007 71(2):167–72.

- 24.** GOLLAPUDI, P., YOON, J.W., GOLLAPUDI, S., PAHL M.V., VAZIRI, N.D. Leukocyte toll-like receptor expression in end-stage kidney disease. *American Journal of Nephrology*. 2010; 31(3):247–54.
- 25.** HSIEH, S.C, HUANG, M.H., TSAI, C.Y., TSAI, Y.Y., TSAI, S.T., SUN, K.H., YU, H.S., YU, C.L., The expression of genes modulating programmed cell death in normal human polymorphonuclear neutrophils. *Biochemistry Research Community*, 233: 700-706, 1997.
- 26.** BALOMENOS, D., RAHMAN, S., DASZKIEWICZ, L., MATEO, C.V., MARTINES, C., On How Fas Apoptosis-independent Pathways Drive t cell Hyperproliferation and Lymphadenopathy in lpr Mice, *Frontiers in Immunology* | www.frontiersin.org March 2017 | Volume 8 | Article 237.
- 27.** SESSO, R.C., LOPES, A.A., THOME, F.S., LUGON, J.R., MARTINS, C.T., Brazilian Chronic Dialysis Census 2014, *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 2016;38(1):54-61, doi: 10.5935/0101-2800.20160009.
- 28.** HADLEY, D., CHEUNG, R.K, BECKER, D.J., GIRGIS, R., PALMER, J.P., CUTHBERTSON, D., KRISCHER, J.P., DOSCH, H.M., Large Scale prospective T-Cell function assays in shipped, unfrozen blood samples: Experiences from multicenter TRIGR trial, *Clinical and vaccine immunology*, Fevereiro de 2014, 21(2): 203-211.
- 29.** JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. Applied multivariate statistical analysis. 4th ed. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice-Hall, 1999, 815 p.
- 30.** YOON, J.W., GOLLAPUDI, S., PAHL, M.V., VAZIRI, N.D., Näive and central memory T-cell lymphopenia in end-stage renal disease, *Kidney International*, 31 de Maio de 2006, 70, 371–376, doi:10.1038/sj.ki.5001550;
- 31.** MEIER, P., DAYER, E., BLANC, E., WAUTERS, J.P., Early T cell activation correlates with expression of apoptosis markers in patients with end-stage renal disease. *Journal of American Society of Nephrology*, 2002; 13: 204–212.
- 32.** MORAES PINTO, M.I. e at, Lymphocyte subsets in human immunodeficiency virus unexposed brasilian individuals from birth to adulthood, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Dezembro de 2014, 109(8): 989-998.
- 33.** PEDERSEN, C.; LINDHARDT, B. O.; JENSEN, B. L. et al. Clinical course of primary HIV infection: consequences for subsequent course of infection. *British Medical Journal*, [S.I.], v. 299, p. 154, 1989.

34. POLK, B. F.; FOX, R. et al. Predictors of the acquired immunodeficiency syndrome developing in a cohort of seropositive homosexual men, *The New England Journal of Medicine*, v. 316, n. 2, p. 61-6, 1987.

35. GUPTA, S., SU, H., BI, R., AGRAWAL, S., GOLLAPUDI, S., Life and death of lymphocytes: a role in immunosenescence, *Immunity and ageing*, 23 de Agosto de 2005, 2:12, doi:10.1186/1742-4933-2-12

36. COMPLAND, M., KOMENDA, P., WAINHADL, E.D., MCCULLOUGH, P.A., MORFIN, J.A., Intensive Hemodialysis, Mineral and Bone Disorder, and Phosphate Binder Use, *American Journal of Kidney Diseases*, 2016 Nov;68(5S1):S24-S32. doi: 10.1053/j.ajkd.2016.05.024.

37. LUCAS, M.F., BRIONES, J.L.T., COUTO, A.G., PÉREZ, J.V., NAVARRO, C.Q.R., Maintaining residual renal function in patients on haemodialysis: 5-year experience using a progressively increasing dialysis regimen, *Nefrologia* 2012;32(6):767-76.

38. EKNOYAN, G., BECK, G.J., CHEUNG, A.K., DAUGIRDAS, e cols, Effect of Dialysis Dose and Membrane Flux in Maintenance Hemodialysis for the Hemodialysis (HEMO) Study Group, *The New England Journal of Medicine*, 19 de Dezembro de 2002, doi: 10.1056/NEJMoa021583

39. HERNANDEZ, C.P., MORROW, K., VELASCO, C., WYCZECZOWSKA, D.D., NAURA, A., RODRIGUES, P.C., Effects of cigarette smoke extract on primary activated T cells, *Cellular Immunology* 2013 Mar; 282(1): 38–43. doi: 10.1016/j.cellimm.2013.04.005

ANEXO 1

ANÁLISE DA ATIVIDADE REPLICATIVA LINFOCITÁRIA EM PACIENTES RENAIS CRÔNICOS EM HEMODIÁLISE

Responsável pela pesquisa: Vinícius Bortoloti Péterle
Universidade de Vila Velha

Este documento que você está lendo é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Ele contém explicações sobre o estudo que você está sendo convidado a participar. Antes de decidir se deseja participar (de livre e espontânea vontade) você deverá ler e compreender todo o conteúdo. Ao final, caso decida participar, você será solicitado a assiná-lo e receberá uma cópia do mesmo. Antes de assinar faça perguntas sobre tudo o que não tiver entendido bem. A equipe deste estudo responderá às suas perguntas a qualquer momento (antes, durante e após o estudo). Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis.

Essa pesquisa procura quantificar a atividade do sistema imunológico dos pacientes em hemodiálise através da resposta dos linfócitos T (células de defesa) sob estímulo de multiplicação, e, a partir destes dados, avaliar como será a evolução dos pacientes.

Caso decida aceitar o convite, você será submetido (a) ao(s) seguinte(s) procedimentos:

1. Coleta de dados pessoais conforme questionário padronizado.
2. Coleta de dados do prontuário da clínica de hemodiálise relativos às suas condições de saúde conforme questionário padronizado.
3. Coleta de amostra de sangue total da linha arterial de hemodiálise antes de ser iniciada a sessão do dia.
4. Processamento do sangue coletado em laboratório com avaliação da proliferação dos leucócitos e correlação estatística com as informações obtidas com os procedimentos descritos nos itens 1 e 2.

Não há adição de riscos em relação ao usual da realização das sessões de hemodiálise, para os quais as clínicas já dispõem de infra-estrutura adequada para

atendimento conforme normas da ANVISA. Caso esse procedimento promova algum tipo de constrangimento você não precisa realizá-lo.

Você terá os seguintes benefícios ao participar da pesquisa: Com o melhor entendimento da influência da terapia dialítica sobre o sistema imunológico, poderemos individualizar e melhorar a qualidade do atendimento com melhora da sobrevida e da qualidade de vida em diálise e após o transplante renal, se for o caso. Sua participação poderá ajudar no maior conhecimento sobre o funcionamento sistema imunológico em pessoas submetidas à hemodiálise.

Todas as informações obtidas serão sigilosas. O material com as suas informações (questionários, planilhas) ficarão guardados em local seguro sob a responsabilidade do (a) pesquisador responsável com a garantia de manutenção do sigilo e confidencialidade e que será destruído após a pesquisa. A divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, entretanto, ele mostrará apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição a qual pertence ou qualquer informação que esteja relacionada com sua privacidade.

Conforme previsto pelas normas brasileiras de pesquisa com a participação de seres humanos você não receberá nenhum tipo de compensação financeira pela sua participação neste estudo. Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, caso solicite. Em qualquer momento, se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito a indenização.

Você ficará com uma cópia deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para Vinícius Bortoloti Péterle – contato: peterlevinicius@gmail.com.

Dúvidas sobre a pesquisa envolvendo princípios éticos poderão ser questionadas ao **Comitê de Ética em Pesquisa da UVV** localizado na Rua Comissário José Dantas de Melo, nº 21, Boa Vista, Vila Velha-ES, CEP: 29.102-770, Tel: (27) 3421-2085, E-mail: cep.uvv@gmail.com

Horário de funcionamento: 2ª a 6ª feira –13:30 às 18:30h. Secretária: Andréa Sarmiento.

Reclamações e/ou insatisfações relacionadas à participação do paciente na pesquisa poderão ser comunicadas por escrito à Secretaria do CEP/UVV, desde que os reclamantes se identifiquem, sendo que o seu nome será mantido em anonimato.

Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro que fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador sobre a pesquisa: **Análise da Atividade replicativa linfocitária em pacientes renais crônicos em hemodiálise**, dos procedimentos nela envolvidos, assim como dos possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso me traga prejuízo ou penalidade.

Participante (Paciente ou Responsável): (assinatura, nome e CPF)

Pesquisador responsável:

Vinicius Bortoloti Péterle – 100529577-80

ANEXO 2

IDENTIFICAÇÃO		
DATA COLETA __/__/__		
INICIAIS _____		
SEXO __ M __ F	NÚMERO _____	
COR: _____	IDADE ____	INICIO HD __/__/__

2. ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E ESTADO NUTRICIONAL		
ESTATURA _____ M	PESO _____ KG	IMC _____ KG / M ²
ESCORE DE MALNUTRIÇÃO E INFLAMAÇÃO		
A) Redução no peso seco nos últimos 6 meses: _____		=
B) Padrão de ingesta _____		=
C) Sintomas gastro intestinais _____		=
D) Capacidade funcional _____		=
E) Co-morbidades _____		=
F) Perda de gordura subcutânea _____		=
G) Perda de massa muscular _____		=
H) IMC _____		=
I) Albumina sérica _____		=
J) Capacidade total de ligação ao Fe _____		=
		=

3. INDICADORES CLÍNICOS			
DM S N	HAS S N	LINF	HB
Ca	P	PTH	ALB
Cr	KT / V	EPORH S N	
CD4	APOT		
Anti HBSAg	DATA VACINA HBV / /		

4. ATIVIDADE REPLICATIVA
BASAL
FITHEMOAGLUTININA