

Valor de corte para linfócitos absolutos como alternativa para análise imunofenotípica de células T CD3+ no monitoramento de terapia imunossupressora com timoglobulina

Cut-off value for absolute lymphocytes as an alternative for the immunophenotypic analysis of CD3+ T cells in the monitoring of immunosuppressive therapy with thymoglobulin

Autores

Gislaine Furlanetto ¹
 Ana Paula Alegretti ²
 Mariela Granero Farias ²
 Priscila Aparecida Corrêa Freitas ²
 Gustavo Muller Lara ¹
 Fabiane Spagnol Pedrazzani ²

¹ Universidade Feevale.

² Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Data de submissão: 20/10/2016.

Data de aprovação: 7/3/2017.

Correspondência para:

Gislaine Furlanetto.
 Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
 Rua Doutor Carlos Renato R Fonseca, nº 200, Apto 601, Torre A, Jardim Itu Sabará, Porto Alegre, RS, Brasil.
 CEP: 91210-120
 E-mail: gislainefurlanetto@gmail.com

DOI: 10.5935/0101-2800.20170032

RESUMO

Introdução: A imunossupressão de linfócitos T é necessária para a prevenção da rejeição aguda em transplantes e no tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas. O seu monitoramento laboratorial consiste na quantificação dos linfócitos T realizada pela técnica de imunofenotipagem, na qual o valor preconizado é manter inferior a 20 células/ μ L. **Objetivo:** Estabelecer um ponto de corte para o número de linfócitos totais no hemograma automatizado que reflita uma contagem de linfócitos T inferior a 20 células/ μ L por imunofenotipagem. **Métodos:** Foram avaliados 242 pacientes transplantados renais que continham resultados do hemograma automatizado e quantificação de linfócitos T por imunofenotipagem. Os pacientes foram divididos em dois grupos, conforme os valores de linfócitos T estabelecidos pela imunofenotipagem: inferiores e superiores a 20 células/ μ L. A partir disto, foi avaliado o ponto de corte de linfócitos no hemograma com especificidade de 100% para excluir os pacientes com valores elevados de linfócitos T. **Resultados:** Este estudo evidenciou que o ponto de corte de 70 linfócitos/ μ L obtidos pelo hemograma automatizado apresentou especificidade de 100% para excluir os pacientes com contagens de linfócitos T superiores a 20 células/ μ L na imunofenotipagem. **Conclusão:** Esta pesquisa poderá auxiliar no monitoramento da terapia imunossupressora em pacientes transplantados renais em locais que não possuem um citômetro de fluxo disponível, ou ainda quando este equipamento não se faz presente na rotina integral.

Palavras-chave: citometria de fluxo; imunofenotipagem; imunossupressores; transplante de rim.

ABSTRACT

Introduction: Immunosuppression of T lymphocytes is required for preventing acute rejection after transplantation and for the treatment of chronic autoimmune and inflammatory diseases. The laboratory monitoring for this therapy is the measurement of T cells by immunophenotyping, aiming the target value of less than 20 cells per μ L. **Objective:** To establish a cut-off point for the total number of lymphocytes in the automated blood cell count that reflects less than twenty T cells μ L by immunophenotyping. **Methods:** We studied and evaluated 242 kidney transplant patients that had results of automated blood cell count and quantification of T cells by immunophenotyping technique. The patients were divided into two groups, depending on the T lymphocyte immunophenotyping rates established by lower and higher than 20 cells per μ L. After, we evaluated the cut-off point for lymphocytes in the blood cell count with a specificity of 100% to exclude patients with high levels of T lymphocytes. **Results:** We found that the cut-off point of 70 lymphocytes per μ L obtained by automated blood cell count showed 100% of specificity to exclude patients with T-cell counts higher than 20 cells per μ L by immunophenotyping. **Conclusion:** The results found in this study may be helpful to monitor the immunosuppressive therapy in kidney transplant patients in places where a flow cytometer is not available, or when this equipment is not present in the full routine.

Keywords: flow cytometry; kidney transplantation; immunophenotyping; immunosuppressive agents.

INTRODUÇÃO

O transplante renal é reconhecido como um grande avanço na medicina moderna, que aumenta a expectativa e qualidade de vida de pacientes com insuficiência renal irreversível. O que era uma opção de tratamento experimental, arriscado e muito limitado há 50 anos, atualmente é uma prática clínica de rotina em mais de 80 países.¹

Indivíduos em estágio terminal de doença renal crônica (DRC) necessitam escolher uma terapia substitutiva: diálise ou transplante renal.^{2,3} No Brasil o transplante é a terapia de substituição mais custo-efetiva,^{4,5} sendo a melhor alternativa quanto à qualidade de vida, morbidade e mortalidade.^{6,7} Um fator que contribui substancialmente para que esta terapia seja considerada a melhor opção para o portador de DRC é o avanço tecnológico relacionado à terapia de imunossupressão.^{8,9}

O uso de terapia imunossupressora contribuiu para a expansão dos transplantes, por inibir a divisão celular e também por possuir propriedades anti-inflamatórias. É prescrita na prevenção da rejeição do órgão transplantado e no tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas.¹⁰ Por modularem a resposta das células T efetoras na apresentação de antígenos, estas drogas aumentam a sobrevida do enxerto e do paciente.^{11,12} Como terapia de indução, associada às melhores respostas, utiliza-se a imunoglobulina antitimocitária (ATG) policlonal procedente de cavalo ou coelho.^{13,14}

O monitoramento de ATG pós-transplante renal se faz pela quantificação de linfócitos T absolutos pela técnica de imunofenotipagem por Citometria de Fluxo^{15,16} que devem ser inferiores a 20 células/ μ L dos leucócitos totais.¹⁷⁻¹⁹ Portanto, a dose é ajustada de acordo com a quantidade de CD3.

O objetivo desse trabalho foi analisar as quantificações de linfócitos T realizadas pela técnica de imunofenotipagem de pacientes submetidos a transplante renal e que fizeram uso de ATG em um hospital universitário, e estabelecer um ponto de corte para os linfócitos totais do hemograma automatizado que estime uma contagem inferior a 20 células/ μ L quando comparado à técnica padrão.

MÉTODOS

Foram obtidos dados laboratoriais retrospectivos de prontuário eletrônico no sistema AGHU (Aplicativos

de Gestão para Hospitais Universitários) de um Hospital Universitário de Porto Alegre, RS, de pacientes que realizaram transplante renal no período de janeiro de 2014 a junho de 2015, totalizando 242 amostras.

Foram incluídas amostras de pacientes transplantados renais em uso de ATG que realizaram na mesma amostra de sangue total a quantificação de linfócitos T por imunofenotipagem e hemograma ou leucograma. Foram excluídos pacientes: submetidos a outros tipos de transplantes que não o renal; em uso de imunossupressores para imunodeficiências; na falta da realização do hemograma ou leucograma; quantificações de linfócitos de doadores e pacientes externos.

As amostras foram coletadas pós-transplante, variando a quantidade de amostras de cada paciente de acordo com a solicitação médica. Alguns pacientes entraram mais de uma vez no estudo.

Os pacientes avaliados receberam ATG de coelho na dose de 1,5 mg/Kg, a qual consiste na mesma quantidade relatada por Buchler *et al.*¹⁸ No estudo de Castro *et al.*,¹⁹ sugere-se que a dose de timoglobulina deve ser de 1 a 1,5 mg/Kg, numa dose total acumulada variando de 4 a 8 mg/Kg, conforme o risco imunológico do paciente.

O trabalho foi desenvolvido de acordo com os princípios de ética em pesquisa estabelecidos pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital, CAAE: 50465815.4.0000.5327. Não foi solicitado aos pacientes qualquer exame ou questionamento, assim como foi mantido completo sigilo sobre a identificação dos indivíduos envolvidos no estudo. Todos os pesquisadores assinaram o termo de compromisso para utilização de dados do prontuário.

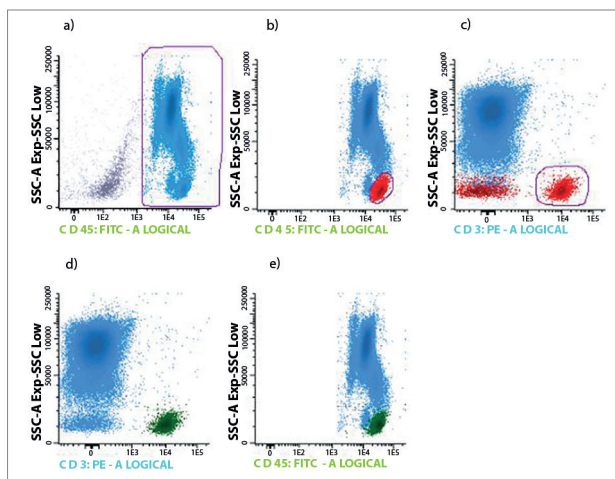
Foram utilizadas amostras de sangue total em tubos com anticoagulante K2EDTA, e foram processadas no período máximo de 2 horas após a coleta.

Os hemogramas e leucogramas foram realizados no equipamento Sysmex® XE-5000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japão) para obtenção da contagem de leucócitos absolutos e linfócitos totais.

Para a caracterização das células T, foi utilizada a técnica de imunofenotipagem que identifica e quantifica estes linfócitos por meio do uso dos anticorpos monoclonais específicos: CD45 (pan-leucocitário) conjugado com o fluorocromo FITC (isotiocianato de fluoresceína) e CD3 (marcador de linfócitos T) conjugado com PE (ficoeritrina). Após a

marcação, as amostras foram adquiridas no Citômetro de Fluxo FACSCanto II (BD-Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, Estados Unidos) e analisados no *software* Infinicyt®, versão 1.7 (Cytognos, Salamanca, Espanha) (Figura 1).

Figura 1. Histogramas bivariados de *dot plot* ilustrando a subpopulação de linfócitos T dos leucócitos totais. (a) Estratégia de *gate* identificando as células CD45+, correspondendo às células leucocitárias da amostra (eventos azuis); (b) seleção de linfócitos totais dentro das células leucocitárias (eventos vermelhos) para o reconhecimento dos linfócitos T nesta população; e finalizando (c-e) *gate* dos linfócitos T dentro dos leucócitos totais.



Os pacientes foram divididos em dois grupos conforme os valores absolutos de linfócitos T obtidos por imunofenotipagem, em conformidade com o alvo terapêutico: inferior a 20 células/ μ L e superior ou igual a 20 células/ μ L. Posteriormente, foi estipulado o ponto de corte de linfócitos totais pelo hemograma automatizado com especificidade de 100% para uma contagem de linfócitos T inferior a 20 células/ μ L.

Para avaliação dos resultados, foi realizada análise de curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) a partir do *software* SPSS 18.0 (*Statistical Package for the Social Science*). A normalidade dos dados foi investigada pelo teste de *Shapiro Wilk*, as variáveis entre contagem de linfócitos obtidos no hemograma automatizado e obtidos por imunofenotipagem por citometria de fluxo foram avaliadas pela correlação de *Pearson*, e a idade dos pacientes foi apresentada como média \pm desvio-padrão e o restante dos dados como mediana (intervalo interquartil).

RESULTADOS

Foram avaliados 242 pacientes com idade de 51 ± 13 anos, sendo que 50,4% foram do sexo masculino. Os

valores de leucócitos e linfócitos totais no hemograma automatizado, e a quantificação dos linfócitos T por imunofenotipagem dos pacientes foram de 5.550,00/ μ L (4.017,50 - 7.865,00/ μ L), 212,9/ μ L (132,7 - 328,5/ μ L) e 10,4/ μ L (4,0 - 28,3/ μ L), respectivamente (Figura 2). A correlação entre o número de linfócitos totais obtidos por imunofenotipagem *versus* hemograma automatizado apresentou $r = 0,88$; $p < 0,001$ (Figura 3).

Figura 2. Distribuição dos linfócitos totais por imunofenotipagem e hemograma automatizado.

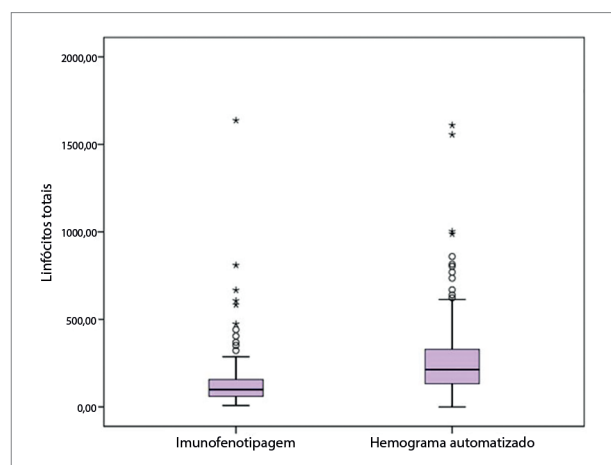
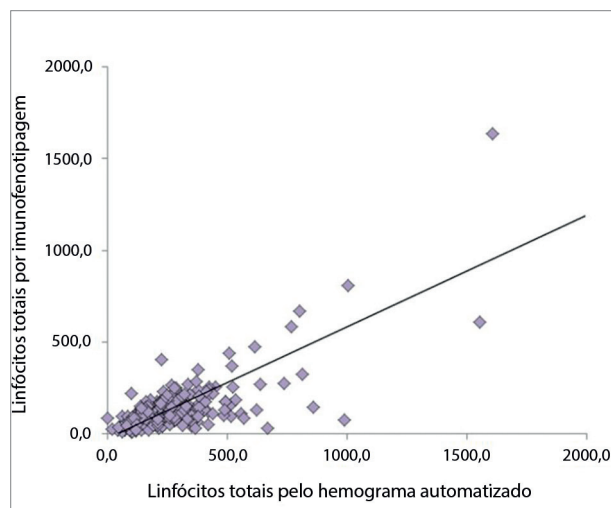


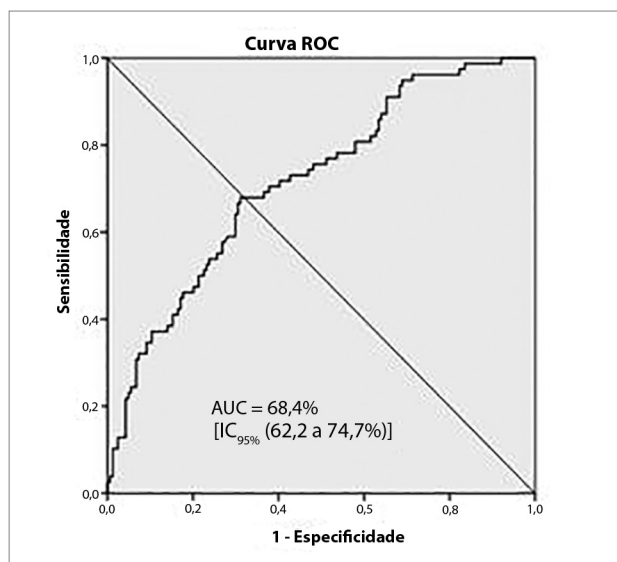
Figura 3. Correlação entre o número de linfócitos totais obtidos por imunofenotipagem *versus* hemograma automatizado ($r = 0,88$; $p < 0,001$).



Analisando a sensibilidade e especificidade de diferentes valores absolutos de linfócitos obtidos pelo hemograma automatizado, foi encontrado um ponto de corte de 70 linfócitos/ μ L, o qual teve a capacidade de excluir 100% os pacientes com contagens de linfócitos T superiores a 20 células/ μ L na imunofenotipagem.

Na análise da curva ROC foi identificada uma sensibilidade e especificidade de 67,95% [IC: Intervalo de confiança (IC) 95% (56,96 a 77,25%)] e 68,90% [IC: 95% (61,45 a 75,49%)], respectivamente, para identificar os pacientes com linfócitos T > 20 células/ μL . A área sob a curva (AUC) foi de 68,4% [IC: 95% (62,2 a 74,7%)], $p < 0,001$ (Figura 4).

Figura 4. Curva ROC representando a sensibilidade e especificidade obtida para o ponto de corte de 70 linfócitos/ μL quando a contagem de linfócitos T foi > 20 células/ μL na imunofenotipagem. A área sob a curva ROC, medida resumo usual do desempenho do teste, foi de 68,4% [IC: 95% (62,2 a 74,7%)]. A linha diagonal mostra onde ocorre o melhor valor de sensibilidade para o melhor valor de especificidade.



As taxas de falso positivo, falso negativo, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo foram de 31,1% [IC: 95% (24,51 a 38,55%)], 32,05% [IC: 95% (22,75 a 43,04%)], 51,0% [IC: 95% (44,14 a 57,75%)] e 81,9% [IC: 95% (76,33 a 86,37%)], respectivamente.

DISCUSSÃO

Neste trabalho, a quantidade estabelecida de linfócitos totais no sangue periférico para representar um valor de células T inferior a 20 células/ μL foi de 70 linfócitos/ μL , concordando com Castro *et al.*,¹⁹ que relatam que a contagem de linfócitos deve ser menor que 100 células/ μL , podendo haver variação entre 50 - 150 células/ μL . Contudo, o estudo de Buchler *et al.*¹⁸ demonstra que o valor deve ser inferior a 200 linfócitos/ μL .

É importante ressaltar que os linfócitos quantificados pelo hemograma contemplam todos

os subtipos de linfócitos, ou seja, além dos linfócitos T, também os B e *Natural killer* (NK). Portanto, o valor de 70 linfócitos/ μL mostra uma margem segura para garantir que os linfócitos T na amostra sejam inferiores a 20 células/ μL .

Os valores encontrados nos protocolos dos hemogramas automatizados dos pacientes incluídos na pesquisa foram de 5.550,0/ μL (4.017,50 - 7.865,00/ μL) leucócitos, 212,0/ μL (132,7 - 328,5/ μL) linfócitos totais e de 10,4/ μL (4,0 - 28,3/ μL) linfócitos T por imunofenotipagem, valores semelhantes com o estudo de Buchler *et al.*¹⁸

A média de idade encontrada nos indivíduos transplantados renais foi compatível com a relatada por Buchler *et al.*,¹⁸ que relataram uma média de 48 ± 13 anos nos pacientes de seu estudo. Contudo, neste mesmo trabalho não há dados sobre a prevalência de gênero. Em nossa pesquisa encontramos a média de 51 ± 13 anos; destes, 50,4% eram do sexo masculino.

A curva ROC permite evidenciar os valores para os quais existe maior otimização da sensibilidade em função da especificidade. A área sob a curva é uma medida de desempenho de um teste (Índice de exatidão do teste), em que valores acima de 0,70 são considerados com desempenho satisfatório.²⁰ Neste trabalho encontramos um valor de 68,4% [IC: 95% (62,2 a 74,7%)].

Os resultados de sensibilidade (definida como a capacidade do teste sob investigação fornecer um resultado positivo) foram de 67,95% [IC: 95% (56,96 a 77,25%)] e o resultado da especificidade (definido como a capacidade do teste sob investigação fornecer um resultado negativo) foi 68,90% [IC: 95% (61,45 a 75,49%)], ambos considerados com desempenho satisfatório.

CONCLUSÃO

Este estudo propôs um ponto de corte de 70 linfócitos/ μL pela contagem automatizada do hemograma que refletiu em um número de linfócitos T inferior a 20 células/ μL se realizada por imunofenotipagem, valor preconizado para o ajuste da dose durante o tratamento com ATG.

Os resultados desta pesquisa poderão auxiliar no monitoramento desta terapia imunossupressora em pacientes transplantados renais em locais que não possuam um citômetro de fluxo ou quando este equipamento não se faz presente na rotina integral.

REFERÊNCIAS

1. Garcia-Garcia G, Harden P, Chapman J. The global role of kidney transplantation. *Indian J Nephrol* 2012;22:77-82. DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/0971-4065.97101>
2. Lipay MA, Noronha Ide L, Vidonho Júnior A, Romão Júnior JE, Campagnari JC, Srougi M. Lymphocyte: a possible relationship with acute cellular rejection in kidney transplantation. *Sao Paulo Med J* 1999;117:238-42. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-31801999000600003>
3. Bastos MG, Bregman R, Kirsztajn GM. Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. *Rev Assoc Med Bras* 2010;56:248-53. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302010000200028>
4. Sesso R, Eisenberg JM, Stabile C, Draibe S, Ajzen H, Ramos O. Cost-effectiveness analysis of the treatment of end-stage renal disease in Brazil. *Int J Technol Assess Health Care* 1990;6:107-14. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0266462300008965>
5. Guerra Junior AA, Acúrcio FA, Andrade EIG, Cherchiglia ML, Cesar CC, Queiroz OV, et al. Ciclosporina versus Tacrolimus no transplante renal no Brasil: uma comparação de custos. *Cad Saúde Pública* 2010;26:163-74. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2010000100017>
6. Manfro RC, Carvalhal GF. Transplante renal. *Rev AMRIGS* 2003;47:14-9.
7. Machado EL, Cherchiglia ML, Acúrcio FA. Perfil e desfecho clínico de pacientes em lista de espera por transplante renal, Belo Horizonte (MG, Brasil), 2000-2005. *Ciênc Saúde Coletiva* 2011;16:1981-92. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232011000300032>
8. Woodroffe R, Yao GL, Meads C, Bayliss S, Ready A, Raftery J, et al. Clinical and cost-effectiveness of newer immunosuppressive regimens in renal transplantation: a systematic review and modeling study. *Health Technol Assess* 2005;9:1-179. DOI: <http://dx.doi.org/10.3310/hta9210>
9. Manfro RC, Gonçalves LFS. Individualização da imunossupressão e pacientes transplantados renais. *Rev HCPA Fac Med Univ Fed Rio Gd Sul* 2006;26:102-4.
10. Bressan AL, Fontenelle E, Silva RS, Gripp AC. Imunossupressores na Dermatologia. *An Bras Dermatol* 2010;85:9-22. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962010000100002>
11. Nga HS, Garcia PD, Conitti MM, Takase HM, Carvalho MFC, Andrade LGM. Diferentes esquemas de indução para transplante renal com doador vivo. *J Bras Nefrol* 2015;37:206-11.
12. Mahmud N, Klipa D, Ahsan N. Antibody immunosuppressive therapy in solid-organ transplant: Part I. *MAbs* 2010;2:148-56. DOI: <http://dx.doi.org/10.4161/mabs.2.2.11159>
13. Chocair PR, Picon PD, Krug BC, Gonçalves CBT, Amaral KM, Zimmermann IR, et al. (cons). Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. Imunossupressão no Transplante Renal [Acesso 2017 Abr 10]. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Protocolos/Imunossupressao_TransplanteRenal.pdf
14. Ayuk F, Zander A, Kröger N. Antitumor effects of polyclonal antithymocyte globulins: focus on B-cell malignancies and multiple myeloma. *Ann Hematol* 2009;88:401-4.
15. Al-Mukhalafi Z, Pyle R, Al-Hussein K. monitoring immune responses in organ recipients by flow cytometry. *Saudi J Kidney Dis Transplant* 2001;12:32-41.
16. Djamali A, Turc-Baron C, Portales P, Levenson G, Chong G, Clot J, et al. Low dose antithymocyte globulins in renal transplantation: daily versus intermittent administration based on T-cell monitoring. *Transplantation* 2000;69:799-805. PMID: 10755529 DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/00007890-200003150-00021>
17. Peddi VR, Bryant M, Chaudhury PR, Woodle ES, First MR. Safety, efficacy, and cost analysis of thymoglobulin induction therapy with intermittent dosing based on CD3+ lymphocyte counts in kidney and kidney-pancreas transplant recipients. *Transplantation* 2002;73:1514-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/00007890-200205150-00025>
18. Buchler M, Thibault A, Najjar Al, Valentin JF, Guerraoui A, Nivet H, et al. Monitoring of ATG therapy by flow cytometry and lymphocyte counts in renal transplantation. *Transplant Proc* 1996;28:2817-8.
19. Castro MCR, Deboni L, Esmeraldo RM, Matuk TA, Pacheco A, Saitovitch D, et al. Guia prático para usar Thymoglobuline® (globulina antitímócito) em transplante renal. *J Bras Nefrol* 2015;37:228-40.
20. Martinez EZ, Louzada-Neto F, Pereira BB. A curva ROC para testes diagnósticos. *Cad Saúde Colet* 2003;11:7-31.