



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Pós-Graduação em Ciências Médicas

Faculdade de Ciências Médicas

Suzimar da Silveira Rioja

**Hipoesplenismo funcional em transplante renal**

Rio de Janeiro

2017

Suzimar da Silveira Rioja

**Hipoesplenismo funcional em transplante renal**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.



Orientador: Prof. Dr. Nordeval Cavalcante Araújo

Coorientadora: Profa. Dra. Stella Beatriz Sampaio Gonçalves de Lucena

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

R585 Rioja, Suzimar da Silveira

Hipoesplenismo funcional em transplante renal / Suzimar da Silveira Rioja –  
2017.  
73f.

Orientador: Ptro. Dr. Nordeval Cavalcante Araújo  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Stella Beatriz Sampaio Gonçalves de Lucena

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Hospital  
Universitário Pedro Ernesto. Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em  
Ciências Médicas.

1. Rins-Transplante-Teses. 2. Imunossupressão-Teses. 3. Baço – Anatomia e  
Histologia. 4. Técnicas e procedimentos diagnósticos. I. Cavalcante Araújo,  
Nordeval. II. Lucena, Stella Beatriz Sampaio Gonçalves de. III. Universidade do  
Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.61-089

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira – CRB7/5302

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta  
tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Suzimar da Silveira Rioja

**Hiposplesnismo funcional em transplante renal**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 09 de novembro de 2017.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Nordeval Cavalcante Araújo (Orientador)  
Hospital Universitário Pedro Ernesto - UERJ

---

Prof. Dr. Carlos Perez Gomes  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

---

Profa. Dra. Irene Biasoli  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin de Lacerda  
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes- UERJ

---

Prof. Dr. Luis Cristóvão de Moraes Sobrino Porto  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Rio de Janeiro

2017

## DEDICATÓRIA

A todos que me deram exemplos e oportunidades.

A meu pai, Gilberto da Silva Rioja. *In memorium.*

## AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que aceitaram colaborar com o estudo, fornecendo material para a investigação.

Ao Prof. Nordeval Cavalcante Araújo, do Serviço de Nefrologia, orientador da tese, pela realização dos exames de ultrassom-Doppler, pelas sugestões e discussão dos resultados.

À Profa. Dra. Stella Beatriz Sampaio Gonçalves de Lucena, do Serviço de Hematologia, co-orientadora da tese, pelas horas dedicadas ao exame das lâminas ao microscópio e discussão dos resultados.

À Profa. Dra. Erika Tami Kasai, pelas horas dedicadas a realizar os exames de cintilografia e a discutir os resultados.

Ao Prof. Dr. Luis Cristóvão de Moraes Sobrino Porto, do Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação, pela cessão de material utilizado na imunofenotipagem de células B e pela orientação quanto à metodologia empregada nesta análise.

À Profa. Dra. Luciana Tricai Cavallini, pela colaboração no tratamento estatístico dos dados obtidos.

A Regina Celia Hermsdorff de Faria e Carlos Roberto Fernandes, biólogos do Laboratório de Hematologia, pela preparação das lâminas utilizadas na avaliação hematológica.

A Gustavo Milson, biólogo do laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação, pela preparação e análise do material processado no citômetro de fluxo (células B).

Ao grupo de Enfermagem da Disciplina de Nefrologia, na pessoa do Enfermeiro-Chefe Sergio Roberto Martins de Souza, pela colaboração na colheita de material biológico.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação da FCM-UERJ com quem convivi nestes anos, pelo interesse no projeto e incentivo.

Aos professores que se dispuseram a examinar os resultados da investigação, nas bancas de seleção, qualificação e defesa.

Aos colegas do Serviço de Nefrologia, pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Hélio Siqueira, da Disciplina de Pneumologia, pelo incentivo e confiança.

## RESUMO

RIOJA, Suzimar. **Hipoesplenismo funcional em transplante renal**. 2017. 74 f. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

A partir da observação, à ultrassonografia (US), de que ocorria redução do tamanho do baço em receptores de transplante de rim (RTRs) após >seis meses do procedimento, foi levantada a hipótese da existência de hipoesplenismo funcional (condição que pode aumentar o risco de infecções, neoplasias, trombose do enxerto e morte), em parte deste grupo de pacientes. Este estudo foi, então, conduzido para verificar a ocorrência do fenômeno, determinar sua prevalência, comparar métodos diagnósticos usados para seu diagnóstico e verificar sua associação com drogas imunossupressoras usadas na manutenção da função do enxerto renal. A avaliação anatômica do baço incluiu a determinação de seu diâmetro longitudinal (DLB) e dados de Doppler, obtidos em artérias esplênicas e intraesplênicas. As funções fagocítica e imunológica foram avaliadas através da pesquisa de corpúsculos de Howell-Jolly (HJ) no esfregaço de sangue periférico, da cintilografia hepato-esplênica com  $^{99m}\text{Tc}$ -Sn-coloidal e da quantificação (percentagem e número absoluto) de subpopulações de células B, no sangue periférico, por citometria de fluxo. Em todas as avaliações foram observadas alterações e seus resultados foram comparados entre si. Quando os resultados da pesquisa de HJ e da cintilografia foram divergentes (HJ positivo e cintilografia normal), foi observado que a ocorrência da alteração hematológica foi mais frequente nos pacientes que apresentavam menor DLB, sugerindo que, nestes casos, a massa de tecido esplênico funcionante (“massa crítica”) seria inferior à para a remoção de eritrócitos senescentes da circulação. Quando os grupos em uso de inibidores de calcineurina (IC) ou sirolimo (SRL) foram comparados, associação entre menor DLB e uso de SRL foi encontrada, sem que a disfunção esplênica pudesse ser atribuída a esta droga. Quando os grupos em uso de combinações à base de micofenolato de mofetila (MMF) foram comparados, de acordo com as distribuições dos diferentes subtipos de células B, associação estatisticamente significativa entre terapia com micofenolato-esteróide (MMF-ST) e redução na proporção de células B *switched* de memória foi encontrada ( $p=0.028$ ). De acordo com a anormalidade da função fagocítica, determinada pela presença de HJ, a prevalência de hipoesplenismo em RTRs foi estimada em 30%. Se observada a combinação HJ presente-redução da captação do radiocolóide na cintilografia, em 29.09%. E quando consideradas, em conjunto, as funções fagocítica e imunológica do baço, a prevalência do quadro foi calculada em 14,55%. Em conclusão, o conjunto dos resultados permitiu confirmar a ocorrência de hipoesplenismo funcional em RTRs, em prevalência elevada, definir que a US-Doppler do baço é método que pode apontar para a existência do fenômeno e verificar como o transtorno se correlaciona com a dose e o tempo de exposição ao MMF ( $p<0.001$ ).

Palavras chave: Transplante de rim. Hipoesplenismo funcional. Métodos diagnósticos. Micofenolato de mofetila.

## ABSTRACT

RIOJA, Suzimar. **Functional hyposplenism in renal transplant recipients.** 2017. 74 f. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

From ultrasonography (US) observation that reduction of spleen size in kidney transplant recipients (RTRs) occurred after > six months of the procedure, the hypothesis of functional hyposplenism, in part of this group of patients, was raised. Then, we conducted this study, to verify the occurrence of the phenomenon, to determine its prevalence, to compare diagnostic methods used for its diagnosis and to verify its association with immunosuppressive drugs used to maintain renal graft function. The anatomical evaluation of the spleen included the determination of its longitudinal diameter (DLB) and Doppler data, obtained in splenic and intrasplenic arteries. The spleen evaluation of the phagocytic and immunological functions included the presence of Howell-Jolly (HJ) corpuscles in the peripheral blood smear, the  $^{99m}\text{Tc}$ -Sn-colloidal hepatosplenic scintigraphy and quantification (percentage and absolute number) of B-cell subpopulations, in peripheral blood, by flow cytometry. We observed changes in all evaluations and we compared their results to each other. In the cases that the results of HJ and scintigraphy were divergent (HJ positive and normal scintigraphy), we observed that the occurrence of hematological alteration was more frequent in patients with lower DLB, suggesting that the mass of functioning splenic tissue ("critical mass") would be lower than the necessary for the removal of senescent red blood cells from the circulation. When we compared the groups using calcineurin inhibitors (IC) or sirolimus (SRL), association between lower DLB and SRL use was found, without splenic dysfunction being attributable to this drug. When groups using MMF based combinations were compared, according to the distributions of the different B-cell subtypes, a statistically significant association between mycophenolate-steroid therapy (MMF-ST) and reduction in the proportion of B switched memory cells were found ( $p = 0.028$ ). According to the abnormality of the phagocytic function, determined by HJ presence, the prevalence of hyposplenism in RTRs was estimated at 30%. If the presence of HJ was associated with the reduction of radiocolloid uptake in scintigraphy, at 29.09%. If taken together, the phagocytic and immunological functions of the spleen, the prevalence of the condition was calculated estimated at 14.55%. In conclusion, all the results allowed to confirm the occurrence of functional hyposplenism in RTRs, in high prevalence, to define that the US-Doppler of the spleen is a method that can point to the existence of the phenomenon and to verify how the disorder correlates with the dose and the time of exposure to MMF ( $p < 0.001$ ).

Key words: Kidney transplantation. Functional hyposplenism. Diagnostic methods. Mycophenolate mofetila.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Funções do baço .....	14
Quadro 2 –	Doenças associada a hipoesplenismo funcional .....	26
Tabela 1 –	Distribuição dos subtipos de células B em indivíduos sadios e transplantados .....	53
Tabela 2 –	Comparação de diferentes esquemas de imunossupressão com a distribuição de células B .....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Anemia falciforme
ANOVA	Análise de variância
APS-1	Síndrome poliendócrina autoimune tipo 1
AZA	Azatioprina
CAAs	Células apresentadoras de antígenos
CCL19	Ligante da quimiocina CC19
CCL21	Ligante da quimiocina CC21
CD	Célula dendrítica
CsA	Ciclosporina
CXCL12	Ligante da quimiocina CXC12
CXCL13	Ligante da quimiocina CXC13
CXC4	Quimiocina CXC4
CXC5	Quimiocina CXC5
CXC12	Quimiocina CXC12
CXCR4	Receptor da quimiocina CXC4
CXCR5	Receptor da quimiocina CXC5
CXCR7	Receptor da quimiocina CXC7
DC	Doença celíaca
DLB	Diâmetro longitudinal do baço
FNT	Fator de necrose tumoral
FAPERJ	Fundação Carlos Chagas Filho de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
FAV	Fístula arteriovenosa
GVHD	Doença enxerto <i>versus</i> hospedeiro
HF	Hipoesplenismo funcional
HJ	Corpúsculo de Howell-Jolly
HRD	Síndrome de hipoparatiroidismo, retardo no crescimento e dismorfismo
IC	Inibidores da calcineurina
IR	Índice de resistência
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Linfotoxina

LT-βR	Receptor beta de linfotoxina
MAIC1	Molécula de adesão intercelular 1
MACV1	Molécula de adesão celular-vascular 1
MARCO	Receptor de macrófago com estrutura de colágeno
MMF	Micofenolato de mofetila
MMF-CsA	Micofenolato de mofetila associado à ciclosporina
MMF-SRL	Micofenolato de mofetila associado a sirolimo
MMF-TAC	Micofenolato de mofetila associado a tacrolimo
MPA	Ácido micofenólico
mPA	Média das pressões arteriais
MPAG	Glucoronídeo do ácido micofenólico
m-TOR	Inibidor da proteína alvo da rapamicina em mamíferos
N	Normalidade
PALS	Bainha linfoide periarteriolar
PA	Pressão arterial
PIT	Eritrócitos <i>pitted</i>
RTRs	Receptores de transplante renal
SIGNR1	Lecitina do tipo C
SIGLEC1	Molécula de adesão lecitina 1-ácido siálico
SPECT-TC	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único
S1P1	Receptor 1 de esfingosina-1-fosfato
S1P3	Receptor 3 de esfingosina-3-fosfato
Sn	Estanho
SRL	Sirolimo
TAC	Tacrolimo
TC	Tomografia computadorizada
TMO	Transplante de células tronco
Tx	Transplante
TxR	Transplante de rim
US	Ultrassonografia
v	Versus
VEF	Volume esplênico funcionante
VPS	Velocidade de pico sistólico

## LISTA DE SÍMBOLOS

dL	Decilitro
>	Maior
<	Menor
mg	Miligrama
mg/Kg	Miligrama por quilo
mL	Mililitro
μL	Microlitro
mm	Milímetros
-	Negativo
+	Positivo
ng	Nanograma
%	Porcentagem
<i>p</i>	Nível de significância
<i>r</i>	Coefficiente de correlação

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	14
1.1	<b>ESTRUTURA E FUNÇÕES DO BAÇO</b> .....	14
1.1.1	Polpa vermelha.....	15
1.1.2	Zona marginal.....	16
1.1.3	Polpa branca.....	18
1.2	<b>MÉTODOS DIAGNÓSTICOS USADOS NA AVALIAÇÃO DAS FUNÇÕES DO BAÇO</b> .....	19
1.2.1	Cintilografia hepato-esplênica.....	20
1.2.2	Corpúsculos de Howell-Jolly <i>versus</i> hemácias <i>pitted</i> .....	21
1.2.3	SPEC-TC e VEF.....	21
1.2.4	Avaliação anatômica.....	22
1.2.5	Imunofenotipagem de células B.....	23
1.3	<b>HIPOESPLENISMO FUNCIONAL</b> .....	23
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	28
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	28
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	28
3	<b>ARTIGOS SUBMETIDOS</b> .....	29
3.1	<b>Artigo 1: Functional Hyposplenism in Long-standing Renal Transplant Recipients</b> .....	29
3.2	<b>Artigo 2: Effect of Rapamycin on Spleen Size in Longstanding Renal Transplant Recipients</b> .....	34
3.3	<b>Artigo 3: Howell-Jolly bodies and liver-spleen scanning for assessment of splenic filtrative function yields discordant results in renal transplant recipients</b> .....	40
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	48
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	58
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	60
	<b>ANEXO - Comitê de ética em pesquisa</b> .....	73

## INTRODUÇÃO

Como resultado de participações em projetos financiados pela Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), a Disciplina de Nefrologia recebeu, em 2012, aparelho de ultrassom-Doppler (US-Doppler), e, a partir de então, modificações na rotina de acompanhamento dos receptores de transplante renal (RTRs) foram implementadas: (i) os pacientes passaram a ser avaliados por um único examinador, um dos *staffs* do Serviço de Nefrologia com experiência em ultrassonografia; (ii) o exame passou a ser realizado sequencialmente, a partir do pós-operatório imediato, e não apenas anualmente, como era feito no período anterior; (iii) e a incluir informações sobre órgãos de todo o abdômen e não somente do enxerto renal.

A sequência de avaliações levou à observação de que alguns pacientes evoluíam com redução do diâmetro longitudinal do baço (DLB) após seis meses da realização do transplante, achado que levou à hipótese de que a redução do volume do órgão seria acompanhada de prejuízo de seu funcionamento.

Como estados hipoesplênicos aumentam a susceptibilidade às infecções na população geral [1], a ocorrência do fenômeno em RTRs poderia explicar, em parte, as elevadas taxas de morbidade e mortalidade atribuídas às infecções que são registradas neste grupo [2,3]. Como a revisão da literatura, realizada na base PubMed sob os termos “*hyposplenism in transplantation*”, “*hyposplenism in renal transplantation*” e “*hyposplenism in kidney transplantation*”, no intervalo entre 1997-2012, resultou na identificação de tão somente sete publicações – cinco em transplante de células tronco (TMO) [4,5,6,7,8] e duas em transplante renal (TxR) [9,10] – estudo destinado a confirmar a ocorrência de hipoesplenismo em RTRs, em uma série, se justificaria.

Inicialmente, a função esplênica de RTRs com > de seis meses de transplante (Tx) foi avaliada com base na presença de corpúsculos de Howell-Jolly (HJ) no sangue periférico, que foi, subsequentemente, comparada a dados anatômicos e hemodinâmicos de US-Doppler, obtidos em baço e rim transplantado. Subsequentemente, procurou-se verificar a existência de associação entre a ocorrência de hipoesplenismo e drogas imunossupressoras utilizadas na manutenção da função do enxerto renal. Os resultados do exame hematológico e os dados obtidos por US-Doppler foram, então, comparados, aos dois maiores grupos de agentes imunossupressores empregados na rotina de nosso Serviço – os que combinam inibidores de calcineurina (ICs) ou sirolimo (SRL) com micofenolato de mofetila (MMF). Em seguida,

tomando-se por base relato anterior de discordâncias verificadas entre os resultados dos diferentes exames empregados na avaliação da função esplênica, em distintas condições clínicas [11], o objetivo foi o de estabelecer a importância da medida do DLB na interpretação dos casos em que os resultados do exame hematológico e da cintilografia hepato-esplênica sejam divergentes. RTRs incluídos nas etapas anteriores foram, aleatoriamente, selecionados para realizar a quantificação de células B (proporção e número absoluto) no sangue periférico, por citometria de fluxo. Inicialmente, os valores obtidos foram comparados aos descritos para a população de indivíduos saudáveis [12]. Em seguida, os pacientes foram separados em grupos, conforme estivessem em uso de esquema triplice (esteroide, IC ou SRL e MMF) ou duplo (esteroide-MMF) de imunossupressão, e foi analisada a distribuição dos diferentes subtipos de células B, em cada um desses grupos. Por fim, calculou-se a prevalência de hipoesplenismo funcional em RTRs, de acordo com a combinação dos exames realizados para o diagnóstico do quadro.

# 1 REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 Estrutura e funções do baço

O baço é recoberto por uma cápsula fibrosa de tecido conjuntivo que se desdobra em trabéculas para seu interior, de modo a dar sustentação à rede vascular intraesplênica que sobre elas corre. Assim estruturado, o órgão realiza várias funções, com destaque para as de fagocitose, reciclagem do ferro e produção de anticorpos. Essas funções são realizadas em três zonas distintas – a polpa vermelha, a zona marginal e a polpa branca (Quadro 1)-, que, permanentemente, interagem entre si.

Quadro 1. Funções do baço

POLPA VERMELHA	ZONA MARGINAL	POLPA BRANCA
Hematopoiese extramedular se necessária	Fagocitose de microrganismos e imunocomplexos pelos macrófagos	Zona de células T Zona de células B
Sítio de liberação de material dos eritrócitos	Produção de linfócitos B após estímulo antigênico T1-2	Armazenamento de linfócitos T e B
Filtração de células senescentes ou danificadas	Tráfego de linfócitos T e B	Maturação e proliferação de T e B após estimulação antigênica
Armazenamento de ferro, eritrócitos, plaquetas, plasmablastos e células plasmáticas	Liberação de imunoglobulinas pelos linfócitos T e B após estimulação antigênica	Liberação de imunoglobulinas pelos linfócitos B após estimulação antigênica
Liberação de anticorpos produzidos pelas células plasmáticas		Produção de mediadores imunes que participam do <i>clearance</i> de bactérias
Defesa contra bactérias utilizando o metabolismo do ferro dos macrófagos		

Fonte: Traduzido e adaptado de: de Porto AP *et al.* 2010; 29:1465–1473.

### 1.1.1 Polpa vermelha

A polpa vermelha ocupa mais da metade do volume do órgão e é responsável pela fagocitose e pela reciclagem do ferro. O sistema vascular, na região, é particularmente adaptado para realizar as funções de filtração e depuração do sangue porque: (i) se organiza como um sistema “aberto”, em que arteríolas de menor calibre terminam em um sistema venoso sinusoidal situado próximo à zona perifolicular [13]; (ii) o endotélio arteriolar é descontínuo, apresentando fenestras cuja abertura é controlada por filamentos semelhantes à actina e miosina e que regulam a passagem do sangue das arteríolas para a área de bainha linfóide que as envolve – a bainha linfóide periarteriolar (PALS), onde macrófagos se acumulam -, daí retornando ao sistema venoso [14]; (iii) o fluxo sanguíneo se reduz na passagem pela PALS.

A combinação de fenestras com propriedade de contração e de redução do fluxo arterial dificulta a passagem de eritrócitos envelhecidos (em razão do enrijecimento de suas membranas) e de patógenos pela região [15], o que aumenta o tempo de exposição destes à ação de macrófagos aí presentes. Ao encontrar bactérias, os macrófagos secretam moléculas, em particular a lipocalina-2 que atua bloqueando sideróforos e sequestrando ferro, com o objetivo de limitar o crescimento bacteriano [16]. Algumas bactérias são reconhecidas diretamente pelos macrófagos, enquanto outras precisam ser primeiro opsonizadas - processo em que as bactérias têm sua superfície revestida por complemento ou por moléculas produzidas no próprio baço, caso da properdina e da tuftsina, que interagem com receptores localizados nos fagolisossomas dos macrófagos. Bactérias opsonizadas são, em princípio, removidas eficientemente pelos macrófagos. Entretanto, quando o processo de opsonização não é completado, como ocorre com bactérias formadoras de cápsula (destaque para *Streptococcus pneumoniae*, cuja cápsula de polissacarídeo impede a ligação do complemento ou que este interaja com os receptores de macrófagos), a remoção de patógenos exige a presença de anticorpos produzidos na própria polpa vermelha, na zona marginal (IgM) ou na polpa branca [17].

### 1.1.2 Zona marginal

Além de ser área de trânsito para células que deixam a corrente sanguínea em direção à polpa branca, processo que envolve sinalização através de receptores acoplados à proteína G [18], a zona marginal contém um grande número de células B residentes que possuem propriedades únicas e parecem ter ligação de interdependência entre si, de modo a contribuir para manter a “arquitetura” local. A fixação de células B na zona marginal envolve uma gama complexa de interações moleculares.

Dois subconjuntos de macrófagos são encontrados nesta região: o de macrófagos da zona marginal e o de macrófagos metalofílicos da zona marginal. Macrófagos da zona marginal se caracterizam pela expressão de lecitina tipo C (SIGNR1) [19,20,21] e do receptor de macrófago com estrutura de colágeno (MARCO) [22]. SIGNR1 se liga, de maneira eficaz, a antígenos de polissacarídeos, sendo crucial na captação e fagocitose de *Streptococcus pneumoniae* [19,23] e para o *clearance* de vírus [21,24], enquanto o receptor MARCO pode reconhecer *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* [21]. Macrófagos metalofílicos da zona marginal estão localizados mais próximos à polpa branca e se caracterizam pela expressão da molécula lecitina 1 de adesão ao ácido siálico (SIGLEC1), também conhecida como sialoadhesina [25]. Moléculas SIGLEC1 são expressas na superfície de células do sistema hematopoiético, incluindo monócitos e células dendríticas (CDs), e atuam nas interações celulares. A expressão de níveis elevados de SIGLEC1 auxilia na captura de patógenos mediada por macrófagos metalofílicos, caso da *Neisseria meningitidis* [26]. Macrófagos metalofílicos da zona marginal são os maiores produtores de interferon- $\alpha$  e de interferon- $\beta$  durante infecções virais, ao passo que macrófagos da zona marginal também produzem essas citocinas, mas em menor escala [27]. Entre os dois subconjuntos de macrófagos, encontram-se células B que residem na zona marginal e CDs [28,29]. Células B desempenham papel importante na organização e integridade da região, tendo sido demonstrado que, se ausentes no momento do nascimento ou se destruídas, pode haver desaparecimento dos dois subconjuntos de macrófagos [30,31].

Células B que expressam linfotóxina  $\alpha_1\beta_2$  (LT- $\alpha_1\beta_2$ ) podem se unir ao receptor de linfotóxina (LT- $\beta$ aR), expresso por células endoteliais e/ou estromais presentes na zona marginal, o que leva à indução da expressão de uma gama de quimiocinas que, por sua vez, podem influenciar a hospedagem de vários subconjuntos celulares nesta região, indução que

pode ocorrer tanto quando as células B se hospedam na zona marginal (células B da zona marginal) ou quando transitam pela zona marginal a caminho dos folículos das células B [18].

Em modelo animal, ficou demonstrado como os macrófagos de zona marginal dependem dos quimioattractantes CCL19 e CCL21 para sua localização na região: na ausência dessas duas quimiocinas, os macrófagos da zona marginal não foram encontrados em seu domínio específico (ao lado do revestimento endotelial do seio marginal), enquanto, na ausência do quimioattractante CXCL13, um subconjunto de ligação ao receptor de manose de CDs desapareceu da zona marginal [28,32].

Até o presente momento, nenhuma quimiocina foi identificada como crucial para a atração e/ou retenção dos macrófagos metalofílicos na zona marginal, podendo-se, todavia, considerar que as quimiocinas são importantes nesses processos, dado o papel crucial das células B na manutenção da zona marginal [30]. Além disso, há demonstração de que MARCO, expresso por macrófagos de zona marginal, é essencial para a retenção de células B nesta zona [33], um indicativo de que macrófagos e células B interagem entre si.

Células B da zona marginal são consideradas população relativamente séssil e se distinguem das células B foliculares por expressar altos níveis de IgM (as foliculares expressam IgD). Para que células B se localizem na zona marginal, é necessária sinalização através dos receptores 1 e 3 de esfingosina-fosfato (S1P1 e S1P3), por elas expressos em níveis muito mais elevados do que pelas células B foliculares. Quando deficientes em S1P1, células B não conseguem se fixar na zona marginal e migram para os folículos das células B. No entanto, na ausência de CXCL13, que atrai células B para a área folicular, a capacidade das células B deficientes em S1P1 se hospedarem na zona marginal é restaurada, indicando que a sinalização mediada por S1P1 prevalece sobre o efeito de atração promovido por CXCL13 [34].

Moléculas de adesão do tipo integrinas associadas a antígeno 1 (FLA1,  $\alpha_1\beta_2$ -integrina e  $\alpha_4\beta_1$ -integrina), que interagem com a molécula de adesão intercelular 1 (MAIC1) e com a molécula de adesão celular-vascular 1 (MACV1), respectivamente, também parecem estar envolvidas na hospedagem de células B na zona marginal [35]. A demonstração de que regulação deficiente da expressão dos receptores S1P1 e S1P3 e das integrinas FLA1 e  $\alpha_4\beta_1$  ocorre, após a estimulação de células B da zona marginal com lipopolissacarídeos (LPS), deu suporte a esta observação. Todavia, foi verificado que células B de zona marginal de ratos deficientes em S1P1 ainda podem se ligar fortemente a MAIC1 e a MACV1, *in vitro*, excluindo um efeito direto da sinalização S1P1 na expressão dessas integrinas [34,35].

Suporte para a participação de outros receptores de quimiocinas ou de receptores lipídicos na fixação de células B na zona marginal veio da observação de que, na ausência de CXCR5 e de S1P1, células B da zona marginal permaneciam na região, enquanto o contacto com toxina *pertussis*, que bloqueia a sinalização através de receptores de quimiocinas, provocou sua saída da região. Nesse modelo foi observado, ainda, que a ligação dos receptores de quimiocinas ou de receptores lipídicos na superfície das células B da zona marginal pode levar à supregulação da expressão de integrinas [34,35].

Células B da zona marginal são especializadas na detecção de agentes patogênicos que chegam à esta região pela via sanguínea: após o contato com os patógenos, essas células se diferenciam em células plasmáticas produtoras de IgM ou ganham capacidade para funcionar como células apresentadoras de antígenos (CAAs) [36]. Após serem ativadas, algumas das células B que residem na zona marginal e subpopulações de CDs migram para a polpa branca, onde ativam células T CD4+ *naïve* [37,38], etapa crucial para o início da resposta imune adaptativa.

### 1.1.3 Polpa branca

A polpa branca é constituída por tecido linfóide e abriga células T e B, em sítios específicos. A correta alocação destes grupos de células é controlada por quimiocinas que as atraem para seus respectivos domínios. Na zona das células T, essas interagem com CDs, enquanto na zona de células B ocorre expansão clonal de células ativadas, o que leva à mudança de isotipo e à hipermutação somática. Para que células B migrem para os folículos linfóides, a quimiocina CXCL13 é exigida [39], enquanto que os ligantes (ou quimio-atractantes) CCL19 e CCL21 atraem células T e CDs para a zona de células T [40,41]. A expressão dessas quimiocinas é controlada pela linfotóxina- $\alpha_1\beta_2$  (LT- $\alpha_1\beta_2$ ) e pelo fator de necrose tumoral (FNT). Quando não há sinalização a partir do receptor de linfotóxina- $\beta$  (LT- $\beta$ R) e do receptor do fator de necrose tumoral 1 (FNTR1), os níveis da quimiocina CXCL13 e dos ligantes CCL19 e CCL21 caem, o que resulta em desorganização das regiões da polpa branca [42].

Células B expressam o receptor CXCR5, que orienta sua migração para os folículos linfóides. A sinalização através de CXCR5 induz a expressão de LT- $\alpha_1\beta_2$  na superfície das células B que, por sua vez, induzem a diferenciação de CDs e sua expressão de CXCL13,

criando, assim um *loop* de *feedback* positivo [17]. Mecanismo semelhante regula a integridade da zona de células T.

A entrada de CAAs na polpa branca, em particular na zona das células T, é passo importante para o início da resposta imune adaptativa: após exposição a antígenos nos folículos linfóides da polpa branca, ocorre a formação de plasmablastos, que expressam o receptor de quimiocina CXCR4 que vai se unir ao ligante CXCL12, expresso na polpa vermelha [43]. A ação coincide com regulação negativa da expressão dos receptores de quimiocinas CXCR5 e CCR7, que se ligam às quimiocinas homeostáticas presentes nos folículos linfóides e na zona das células T da polpa branca. Para sobreviver e fazer a transição para células plasmáticas, plasmablastos requerem a presença de células dendríticas CD11chi [44]. Alojadas na polpa vermelha, fora da zona marginal, as células plasmáticas podem entrar na circulação sanguínea, rapidamente, sempre que necessário [45].

A importância do baço no combate às infecções pode, com base no exercício das funções imunes que lhe são próprias, ser assim resumida: (i) o baço é estruturado de tal forma que a passagem da maior parte do fluxo sanguíneo através da zona marginal e ao longo da polpa branca leva ao monitoramento eficiente do sangue pelo sistema imunológico; (ii) células do sistema imune inato, bem como as células B da zona marginal, estão estrategicamente localizadas para, efetivamente, eliminar os agentes patogênicos; (iii) na resposta inicial a patógenos, CDs fazem sua captura na circulação e os levam ao baço; (iv) a produção aumentada de lipocalina-2 sequestra ferro e limita o crescimento bacteriano; (v) a hospedagem de células B de zona marginal neste sítio envolve uma gama complexa de interações moleculares; (vi) SIP é necessária para a retenção de células B da zona marginal na região; (vii) expressão de SIGNR1 é restrita a macrófagos da zona marginal; (viii) a diferenciação de células B em células B de zona marginal ou em células B foliculares é regulada por fatores múltiplos; (ix) CDs garantem a diferenciação inicial e a sobrevivência das células B para que evoluam até plasmablastos produtores de anticorpos.

## **1.2 Métodos diagnósticos usados na avaliação das funções do baço**

As diferentes funções do baço são avaliadas por métodos distintos que têm por objetivo não só identificar a disfunção esplênica, mas, também, determinar seu grau de severidade. As funções de filtração e fagocítica são avaliadas através de exames que usam partículas

marcadas, caso a cintilografia, e da análise morfológica do sangue periférico (em busca da presença de corpúsculos de Howell-Jolly (HJ) – que são restos de cromatina nuclear resultantes de mitoses anômalas - ou de eritrócitos *pitted* (PIT) – aqueles que apresentam depressão na membrana). A função imunológica do baço pode ser avaliada através da resposta à vacinação ou da quantificação de células imunes em sangue periférico e tecidos por citometria de fluxo [46,47,48].

### 1.2.1 Cintilografia hepato-esplênica

Historicamente, as primeiras observações relativas a hipoesplenismo tiveram origem no estudo das funções de filtração e fagocítica do baço. Assim sendo, métodos diagnósticos que usam injeção, absorção e depuração de substâncias particuladas [49] se multiplicaram. Após injeção da partícula marcada que, via de regra, tem o tamanho de uma bactéria formadora de cápsula [50], 80 a 90% do volume injetado é, em condições normais, captado pelo fígado, pelas células de Kupffer, e 5 a 10% se destina ao baço, enquanto o restante é absorvido pelo sistema retículoendotelial (hoje em dia, nomeado mononuclear-fagocitário), na medula óssea. Imagens planares do fígado e do baço são obtidas nas posições anterior, posterior, lateral esquerda e direita, posterior esquerda e direita e oblíqua anterior. A quantificação da captação esplênica das partículas marcadas oferece avaliação estática da função do baço, definindo-se o hipoesplenismo funcional pela redução da captação do radiocolóide, estando o baço presente, em oposição à asplenia secundária à remoção do órgão [11,51,52].

Cintilografia com o emprego de hemácias autólogas desnaturadas pelo calor e marcadas com rubídio-81 ou tecnécio-99 [53,54], de agregados de albumina radioativa [55] ou de colóide radioativo [56] são realizadas desde os anos 1960. Entretanto, os custos elevados, o diagnóstico apenas qualitativo e a exposição à radiação viriam a limitar o uso do método e, a partir de então, sugeriu-se que este fosse substituído pelo de detecção de alterações morfológicas em eritrócitos (corpúsculos de Howell-Jolly), no sangue periférico, método que seria menos invasivo, de menor custo e de mais fácil execução.

### 1.2.2 Corpúsculos de Howell-Jolly *versus* hemácias *pitted*

Corpúsculos de Howell-Jolly (HJ) foram descobertos no final do século XIX, com o uso do microscópio ótico, mas somente em meados do século XX foi demonstrada sua associação com retardo no *clearance* de hemácias danificadas [57,58,59], o que levou a Sociedade Britânica de Hematologia a propor, em 1996, um algoritmo para o diagnóstico de hipoesplenismo em cuja base estaria a presença do achado [60].

Após sucessivas investigações, esse método foi, entretanto, classificado como pouco específico [61], por estar presente em algumas situações em que não há real disfunção esplênica (sobrecarga transitória do sistema mononuclear-fagocitário e deficiência de vitamina B12, são exemplos), e pouco sensível [62,63], por não identificar graus mais leves de disfunção esplênica, em relação aos que usam radioisótopos, sendo proposto que a contagem de HJ passasse a ser realizada em citômetro de fluxo e não mais ao microscópio ótico [64].

A contagem de hemácias *pitted* (PIT) se faz por microscopia de interferência de fase. Estudo em portadores de doença falcêmica e de esferocitose definiu que a percentagem média de PIT ultrapassaria 30% ( $30,5\% \pm 13,9\%$ ), nesta população, enquanto seria da ordem de  $0,5 \pm 0,5\%$  em indivíduos sadios [65,66]. Essa contagem foi, posteriormente, validada a partir de amostras maiores, ficando estabelecido o limite mínimo de 4%, em amostra com pelo menos 2000 hemácias, para o diagnóstico de hipoesplenismo [67]. Correlação significativa entre a contagem de PIT e os resultados de cintilografia realizada com  $^{99m}\text{Tc}$  foi documentada [68,69,70,71]. E, no ensaio multicêntrico, controlado, randomizado, duplo cego, BABYHUG, realizado em crianças portadoras de anemia falciforme, foi verificada correlação entre HJ e PIT, ambos quantificados por citometria de fluxo [72].

### 1.2.3 SPECT-TC e VEF

Combinada à tomografia computadorizada de emissão de fótons (SPECT-TC), a cintilografia permite calcular o volume esplênico funcionante (VEF), que é assim obtido:

$$\frac{\% \text{ da captação esplênica do radiocolóide}}{\text{volume esplênico total}} \quad (1)$$

Assim se obtém imagem dinâmica, e não estática, o que confere 96% de sensibilidade e 97% de especificidade ao método [73].

Em estudo realizado em portadores de doença falcêmica e que teve por objetivo comparar diferentes métodos diagnósticos de disfunção esplênica, os indivíduos foram submetidos à cintilografia e tiveram o volume esplênico (VEF) calculado. Os resultados foram comparados com a função imunológica, determinada pela quantificação dos diferentes subtipos de células B, com a presença de HJ, identificados com microscópio ótico, e com as percentagens de PIT. O VEF correlacionou-se significativamente com a função fagocítica e imunológica, concluindo-se que tanto HJ como PIT seriam marcadores válidos de disfunção esplênica [74].

A avaliação por SPECT-TC não se aplicaria, todavia, ao rastreamento de grandes populações, em razão dos custos e da dificuldade operacional [75]. Por isso, sugere-se que, como primeira linha de investigação da função esplênica, seja utilizada a contagem de PIT, que permitiria identificar estágios iniciais de disfunção esplênica, assim como graduá-los em intensidade, ainda que se reconheça que o equipamento necessário para sua realização (microscópio de fase) nem sempre esteja disponível [76].

#### 1.2.4 Avaliação anatômica

No que diz respeito à avaliação anatômica, se baço reduzido de tamanho associado à ausência de perfusão (visualizada em ecografia-Doppler com cores) apontou para disfunção esplênica, em transplante de células tronco [77], não foi possível, entretanto, demonstrar correlação entre o tamanho do órgão, medido por US, e função esplênica determinada por cintilografia, em pacientes com hipoesplenismo secundário à doença intestinal inflamatória crônica [77].

No ensaio BABYHUG, foi observado que o volume esplênico calculado pela fórmula [(comprimento x diâmetro anterior-posterior x diâmetro transversal) x 0.523], (2)

que tem por base parâmetros obtidos por US [79], não refletiu a função esplênica determinada por cintilografia [80].

### 1.2.5 Imunofenotipagem de células B

A técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo permite distinguir as diferentes subpopulações de células B e plasmócitos [81,82,83,84]. De acordo com a expressão do anticorpo CD27, considerado marcador de célula de memória [85], e das imunoglobulinas IgM e IgD, células B podem ser subdivididas em *naïve* (CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>), células B de memória da zona marginal ou *nonswitched* (CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>), células B de memória da polpa branca (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) e células B de memória CD27-duplamente negativas (CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>), as que carecem da expressão de CD27 e IgD na superfície [86,87,88,89,90,91,92]. O método vem contribuindo para melhor entendimento das funções imunes do baço, em diferentes situações clínicas e no transplante de órgãos, favorecendo o melhor manejo dos pacientes [93,94,95,96]: em estudo em que participaram portadores de doença de Crohn, doença inflamatória intestinal, esplenectomizados e controles saudáveis, foi observada correlação negativa entre a quantidade (menor) de células B *nonswitched* (IgM<sup>+</sup>) e o percentual de PIT em hipoesplênicos (assim definidos por apresentarem percentual de PIT >4%), o que reafirmou o valor da pesquisa de PIT para o diagnóstico de hipoesplenismo [74].

## 1.3 Hipoesplenismo funcional

A evidência experimental do papel protetor do baço contra infecções data do início do século XX, quando Morris e Bullock demonstraram mortalidade pós-operatória significativamente maior em ratos esplenectomizados, por quadro atribuído à septicemia causada por *Bacterium enteritidis*, em comparação com os que não o foram (80.5% v 38.9%, respectivamente) [97]. Na década de 50, a participação crucial do baço na defesa imune foi sugerida após estudo em que os autores relataram óbito por meningite fulminante em 4 de 5 crianças portadoras de esferocitose hereditária submetidas à esplenectomia antes dos seis meses de idade [98]. Em 1957, Dameshek valeu-se do termo hipoesplenismo para descrever o

quadro de um paciente com doença celíaca (DC) em quem HJ foi detectado em esfregaço do sangue periférico e cujo baço se apresentava atrofiado, no exame *post-mortem* [99].

Sucessivamente, relatos de caso ou de pequenas séries documentaram, ainda majoritariamente em crianças, em razão da condição de asplenia ou de doenças de caráter congênito vistas neste grupo, que a ausência do baço ou sua remoção se associava a quadro de infecção grave: (i) em duas crianças que morreram devido a choque séptico secundário à infecção por *Streptococcus pneumoniae* foram encontrados, na primeira, baço ectópico (condição congênita rara causada por fixação inapropriada dos ligamentos), auto-infartado e aderente ao lobo hepático esquerdo e, na segunda, HJ [100]; ii) hipoesplenismo diagnosticado por cintilografia e prejuízo da fagocitose de polimormonucleares foram observados em crianças portadoras de síndrome HRD (hipoparatiroidismo, retardo no crescimento e dismorfismo) que evoluíram com infecção de repetição [101]; (iii) baço ectópico, com áreas de infarto e com ausência de polpa branca foi encontrado em criança de 8 meses portadora de trissomia 21 que morreu 12 horas após instalação de quadro de sepse pneumocócica com características da síndrome de Waterhouse-Friderichsen [102]. Ainda com respeito às doenças de caráter familiar, desde que asplenia foi diagnosticada em duas crianças, seu pai e um dos primos dele, todos portadores de síndrome poliendócrina autoimune tipo I (APS-1), a avaliação da função esplênica passou a ser recomendada em tais condições [103].

Se, inicialmente, o conceito de hipoesplenismo foi relacionado à ausência congênita do órgão ou à esplenectomia, verificou-se, subsequentemente, que, em algumas situações, o órgão estava presente, todavia sem funcionamento adequado: (i) cinco casos de *purpura fulminans* (síndrome aguda de necrose progressiva da pele causada por trombose vascular da derme no contexto da coagulação intravascular disseminada) foram comprovadamente associados a *Streptococcus pneumoniae* (4 casos) e a *Streptococcus* do grupo A (1 caso), em pacientes que apresentavam hipoesplenismo funcional diagnosticado pela presença de HJ [104]; (ii) em mulher de 84 anos de idade, portadora de mieloma múltiplo, que desenvolveu pneumococemia fulminante, foi observado, na necropsia, que o baço fora quase totalmente substituído por deposição linear difusa de amilóide e que o tecido linfóide residual era escasso. Em decorrência deste achado e considerando-se que infecção bacteriana é complicação comum na doença, foi proposta investigação sistemática para a ocorrência de amiloidose esplênica, entre os que apresentam este tipo de infecção [105]; (iii) em homem infectado pelo HIV que também apresentava vasculite *lupus-like*, glomerulonefrite membranosa, traço menor de beta-talassemia e asplenia funcional após-radioterapia, e que estava sob terapia com agente antiretroviral, prednisolona e azatioprina (AZA), observou-se

infecção óssea causada por *Salmonella enteritidis* em sítio de infecção micobacteriana anterior [106].

Em relação à associação com drogas ou substâncias tóxicas, síndrome de *Austrian* (em que se observa a Tríade de *Osler* - combinação de meningite, pneumonia e endocardite), que é causada por *Streptococcus pneumoniae* e fortemente associada a asplenia ou hipoesplenismo, foi diagnosticada em homem alcoolista de 62 anos [107]. E hipoesplenismo funcional foi relatado em paciente com história e achados radiológicos típicos de doença pulmonar relacionada ao amianto e que apresentava pneumonia pneumocócica recorrente: na necropsia, pó de amianto foi encontrado no baço e em vários de seus outros órgãos extrapulmonares [108].

Por décadas, os estudos voltados para o tema hipoesplenismo replicaram registros obtidos de portadores de doença celíaca (DC) e anemia falciforme (AF) - das 257 publicações indexadas na base de dados PubMed, sob o termo “*hyposplenism*”, 56 se referem à DC e 34, à AF -, em grande esforço para esclarecer a patogênese do quadro, nas duas condições: os resultados apontaram para patogênese distinta.

Em modelo animal, a perda de linfócitos do intestino e a depleção de linfócitos que se seguiu à drenagem do ducto torácico levaram à alterações esplênicas semelhantes às observadas na DC [109,110], assim como foi evidenciado bloqueio retículo-endotelial que foi atribuído à presença de complexos imunes circulantes [111]. Como suporte à existência de componente autoimune na gênese da disfunção esplênica na DC, atrofia do baço foi associada à presença dos antígenos de histocompatibilidade HLA-DQ2 e DQ-8 [112,113,114]. Para alguns autores, o grau de severidade do hipoesplenismo, na DC, estaria relacionado à gravidade da atrofia da mucosa jejunal [115]. Manifestações hematológicas múltiplas (trombocitose, trombocitopenia, leucopenia, tromboembolismo venoso, hipoesplenismo e deficiência de IgA) são tão frequentes na doença, que, não raro, os pacientes procuram os hematologistas antes de receberem o diagnóstico de DC [116]. Por esta razão, na Inglaterra, um dos primeiros países a considerar a doença como problema de saúde pública, sugeriu-se que DC fosse investigada em todos os indivíduos que apresentassem alterações hematológicas ou eventos trombóticos [117].

Dois mecanismos foram propostos para explicar o quadro de hipoesplenismo na AF: (i) haveria desvio de sangue para *shunts* intraesplênicos que resultam do bloqueio de sinusóides da polpa vermelha por células falciformes [118]; (ii) haveria bloqueio retículo-endotelial em área onde os macrófagos esplênicos realizam fagocitose de células falciformes [11]. Em pacientes com AF, foram encontrados níveis reduzidos de tuftsin [119] e, enquanto houve

predomínio de Th2 nos que apresentavam disfunção esplênica, nos que apresentavam função esplênica preservada predominaram as citocinas Th1 [120].

Posteriormente, as publicações tiveram como objeto a relação do baço com resistência à infecção, com base em quatro evidências: (i) os resultados de exames *post-mortem* em espectro variado de quadros de infecção mostravam que o baço respondia com congestão, infiltração celular, proliferação de macrófagos e hiperplasia do tecido linfático; (ii) infecções latentes eram reativadas, após esplenectomia; (iii) em determinadas espécies animais, a esplenectomia reduziu a resistência natural às infecções agudas e crônicas; (iv) o baço é, sabidamente, o maior reservatório de linfócitos.

Nas publicações mais recentes, número maior de patologias é associado ao quadro de hipoesplenismo e estão apresentadas em grupos, conforme tenham natureza mais ou menos comum, mas um grande número de condições clínicas ainda é listado no subtítulo “miscelânea” [1,80,121], entre as quais, entendemos, cabe incluir o transplante de rim.

#### Quadro 2. Doenças associadas a hipoesplenismo funcional

##### **Hematológicas:**

anemia falciforme, TMO, leucemia aguda, linfoma não-Hodgkin, CA avançado de mama

##### **Hepáticas:**

cirrose alcoólica, hepatite crônica ativa, cirrose hepática com hipertensão porta  
cirrose biliar primária

##### **Autoimunes:**

LES, SAF, vasculites, artrite reumatóide, tireoidite de Hashimoto

##### **Gastrointestinais:**

doença celíaca, doença de Crohn, colite ulcerativa, doença de Whipple

##### **Infeciosas:**

SIDA

##### **Circulatórias:**

Trombose de artéria celíaca e esplênica, trombose de veia esplênica

##### **Miscelânea:**

amiloidose, sarcoidose, hipertensão pulmonar primária, nutrição parenteral total  
irradiação do baço, doses elevadas de corticóide?

Fonte: Traduzido e adaptado de William BM *et al.* 2007 Feb; 12(1):1-13.

Fora do espectro da DC e da AF, o quadro de hipoesplenismo funcional deve ser suspeitado quando há infecções de repetição, relato de asplenia familiar ou quando há o achado incidental de baço reduzido de tamanho na US, de tal modo que a real prevalência do quadro pode estar subestimada. Alguns estudos citam que a incidência de mortalidade secundária a hipoesplenismo funcional é incerta, em razão de morte em curto intervalo de tempo após hospitalização por quadro infeccioso ou porque o diagnóstico não é feito. Em estudo retrospectivo de pacientes submetidos à esplenectomia, os autores estimaram que o risco de morte por septicemia provocada por bactérias encapsuladas, em particular *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, foi até 200 vezes mais elevado do que entre os que tinham função esplênica normal [122].

Em relação ao transplante de órgãos, que é o objeto de interesse deste estudo, publicações que associam hipoesplenismo ao transplante de células tronco (TMO) vêm se multiplicando. Em sua maioria, elas citam a coexistência de doença enxerto *versus* hospedeiro (GVHD) em pacientes que apresentam disfunção esplênica, o que pode sugerir mecanismos próprios na patogênese do fenômeno neste grupo. Redução do tamanho do baço foi verificada em receptores de TMO submetidos à irradiação e quimioterapia na indução do transplante, quando comparados a 10 controles sadios [123]; em 6 de 15 receptores de TMO demonstrou-se disfunção esplênica através da presença de corpúsculos de Howell-Jolly, tamanho reduzido do baço, maior contagem de plaquetas, redução do fluxo sanguíneo esplênico e redução da captação do radiocolóide, pelo baço. Os pacientes com asplenia funcional apresentavam GVHD e, entre estes, a incidência de infecções bacterianas foi quatro vezes maior [5]; em estudo em que se comparou 27 pacientes submetidos a TMO, 20 controles sadios e 10 pacientes esplenectomizados ou que apresentavam atrofia do baço secundária à condições hematológicas outras, utilizando a presença de hemácias *pitted* como indicativa de hipoesplenismo, em 15% dos transplantados foi confirmada a existência da disfunção do baço [6]; outro estudo comparou as medidas do DLB, aferidas nas fases pré e pós-transplante, em 22 pacientes que desenvolveram, ou não, GVHD: no grupo que evoluiu com disfunção do transplante houve redução significativa do DLB, enquanto que diferença não foi observada no grupo controle. Além disso, foi observado que, em 4 pacientes com GVHD, os dois que apresentavam o DLB mais acentuadamente reduzido evoluíram com infecção severa (meningite e sepsis fulminante) [7]; há, ainda, relato de caso de infecção de repetição provocada por *Neisseria*, seguida por infecção pneumocócica fulminante, em paciente com GVHD que apresentava HJ no sangue periférico [124].

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Verificar a ocorrência de hipoesplenismo funcional em receptores de transplante renal e estabelecer sua prevalência.

### **2.2 Objetivos específicos**

2.2.1 Comparar métodos de diagnóstico do quadro de hipoesplenismo funcional.

2.2.2 Verificar se há associação entre o quadro de hipoesplenismo funcional e drogas imunossupressoras utilizadas na manutenção da função do enxerto renal.

### **3 ARTIGOS PUBLICADOS**

#### **3.1 ARTIGO 1 – “Functional Hyposplenism in Long-Standing Renal Transplant Recipients” (artigo publicado). Qualis B2, fator de impacto 1.24.**

Neste artigo, o objetivo principal foi verificar a ocorrência de hipoesplenismo funcional em pacientes em fase tardia do transplante renal (> seis meses). Receptores de transplante renal (RTRs) foram avaliados para a presença de corpúsculos de Howell-Jolly no sangue periférico e para alterações anatômicas no baço, verificáveis por ultrassom-Doppler.



## Functional Hyposplenism in Long-Standing Renal Transplant Recipients

N.C. Araújo, S.B.S.G. de Lucena, and S.d.S. Rioja

### ABSTRACT

**Background.** A nephrologist with expertise in ultrasonography noticed that patients with long-standing renal grafts had smaller spleens than subjects undergoing initial post-transplantation imaging. This putative finding prompted us to pursue a further investigation into splenic function based on Doppler ultrasound and hematologic parameters.

**Methods.** We enrolled 47 patients with functioning long-standing kidney grafts, measuring longitudinal diameter of the spleen, hilar and intrasplenic peak systolic velocities (PSV), and hilar and intrasplenic resistivity indices of the splenic artery as well as mean arterial blood pressure (MAP). Giemsa-stained peripheral blood smears were examined for the presence of Howell-Jolly bodies (HJBs) using light microscopy. The patients were then divided into HJB present (HJ<sup>+</sup>) or absent (HJ<sup>-</sup>) groups for further comparison.

**Results.** The overall mean age of 21 females and 26 males was  $47.8 \pm 12.0$  years, and the mean time after transplantation was  $2750 \pm 1818$  days (range, 208–6446). HJBs were detected in 23/47 patients (48.9%). The intrasplenic artery PSV was significantly lower and MAP higher in the HJ<sup>+</sup> group ( $P < .05$ ). There was no difference in spleen size between the groups.

**Discussion.** HJBs in peripheral blood red cells, an indicator of hyposplenism, was associated with reduced intrasplenic artery PSV, suggesting dysfunction, which may play a role in the known vulnerability of renal transplant recipients to infections.

**R**OUTINE screening for kidney transplant recipients in our unit includes surveillance with Doppler ultrasound in the immediate postoperative period, as well as at least 1 year later regardless of graft function. Almost all studies are performed by a specially trained nephrologist who noticed that patients with long-standing renal grafts displayed smaller spleen sizes than those in the early post-transplantation period. Patients with chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation also display reduced spleen sizes associated with hyposplenism,<sup>1</sup> a condition known to increase susceptibility to infections with encapsulated bacteria.<sup>2</sup> The detection of Howell-Jolly bodies (ie, erythrocytes with nuclear remnants) is a useful method to screen for hyposplenism.<sup>3</sup> These findings, together with the known vulnerability to infections among renal transplant recipients, prompted our study of splenic function in renal transplant recipients using Doppler ultrasound as well as clinical and hematologic parameters.

### METHODS

This prospective, cross-sectional survey based on single samples enrolled 47 unselected adult patients with long-standing functional kidney grafts. Twenty had undergone transplantation from deceased and 27 from living donors.

Their medical treatments included rapamycin and mycophenolate ( $n = 19$ ), calcineurin inhibitors in addition to mycophenolate or azathioprine ( $n = 18$ ) or azathioprine or mycophenolate ( $n = 10$ ). All in combination with steroids. Because the observed frequency of the third group was less than 5, we limited analysis of the associations between immunosuppressants and HJBs to the first and second groups.

From the Division of Nephrology (N.C.A., S.d.S.R.), and Division of Hematology (S.B.S.G.d.L.), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Address reprint requests to Nordeval Cavalcante Araújo, Rua São Salvador, 14/1404 – Flamengo, 22231-130 Rio de Janeiro – RJ, Brasil. E-mail: nordeval@oi.com.br

Data on the underlying cause of the chronic renal failure were infrequently recorded and, therefore, not reported in this article. The ethics committee approved of this study according to local legal requirements; it was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

To evaluate splenic function, we performed Doppler ultrasound of the spleen and prepared peripheral smears to detect HJBs. All ultrasounds were performed by the same operator using a Sonoline 40 (Erlangen, Germany) instrument with 3.5-MHz transducer. The only parameters that we considered significant for our study, according to our baseline hypothesis, were spleen dimension, peak systolic velocity (PSV) of the splenic artery, and resistive index. With the patient in the lateral decubitus position, real-time splenic examination was performed in both longitudinal and transverse planes to achieve complete visualization of the organ.

First, we measured the longitudinal diameter, which is the maximum length obtained with clearly defined splenic edges. Then we examined color Doppler flow and spectral Doppler, studying at least 2, and in most cases 3, intrasplenic and splenic arteries at the hilum. Velocity spectra were sampled under the guidance of color signals to discriminate arterial from venous waveforms. Color spots with no corresponding detectable Doppler waves were considered to be artifacts. Measurements were performed with the probe in such a position as to achieve an ultrasound beam nearly parallel to the blood flow direction of the artery (as close as possible to 0°). The position of the probe was adjusted until the velocity profiles were of maximum value. The PSV and resistive index (RI) [(PSV-EDV)/PSV] of the spectra were manually measured with built-in software via the ultrasound scanner. A 2- to 4-mm spectral gate, no angle correction, and low scale without aliasing were used to sample blood flow velocity. We also performed an ultrasound and Doppler study of the kidney grafts, recording kidney length, PSV, and RI of intraparenchymal and main graft arteries.

Using light microscopy all peripheral smears were reviewed by a single observer for the presence of HJBs. A blood smear was made from a drop of blood on a slide. After incubation with May-Grunwald stain for 3 minutes, water was added for 4 minutes and the blood was then Giemsa-stained for 10 minutes. HJBs counted among 100 leukocytes yielded patients who were HJB present (HJ<sup>+</sup>) or absent (HJ<sup>-</sup>).

To ensure that the groups were similar, we included related variables such as those related to the grafts. We compared the durations of the transplantation and of prior dialysis, age, mean arterial blood pressure (MAP), serum creatinine concentrations, and immunosuppressive regimen.

Using a standard statistical package (SPSS for Windows, version 17.0, Chicago, Ill, United States) to perform descriptive statistics on patient characteristics, we expressed data as mean values  $\pm$  standard deviations (SD), comparing groups with Student *t* test. The chi-square test was used to examine associations between categorical variables. The factors associated with HJB were assessed using univariate and multivariate logistic regression models. Multivariate logistic regression analysis evaluated the simultaneous influence of variables associated with HJB, such as those important clinically (spleen size) and those that had shown an association with HJB at an alpha level  $<0.25$  on univariate analysis.<sup>4</sup> Besides spleen size, intrasplenic artery PSV, MAP, gender, intrarenal artery RI, and age were entered into the multivariate model. The accepted level of statistical significance was 5%.

## RESULTS

Pertinent clinical data and Doppler ultrasound characteristics for patients with versus without HJBs are shown in Table 1. The overall mean age of the 21 female and 26 male subjects was  $47.8 \pm 12.0$  years (range, 15–74). The mean time after transplantation was  $2750 \pm 1818$  days (range, 208–6446).

HJBs were detected in 23/47 patients (48.9%). There was no association between HJB detection and transplantation duration, dialysis duration, donation type, or immunosuppressive drug regimen. Serum creatinine level was the same without regard to HJB detection. Upon univariate analysis, intrasplenic artery PSV of patients with HJBs was significantly lower ( $P < .015$ ) and MAP significantly higher ( $P < .017$ ) compared with patients without HJBs. Multivariate

**Table 1. Clinical Data and Measurements of Variables of Interest From Patients With (n = 23) and Without (n = 24) HJB**

	HJB	Mean	SD	P
Transplant duration (d)	(-)	2816.46	2064.19	.803
	(+)	2682.22	1563.92	
Dialysis duration (mo)	(-)	38.35	29.59	.438
	(+)	52.00	65.92	
Age (y)	(-)	46.92	9.77	.202
	(+)	51.13	12.43	
Creatinine (mg/dL)	(-)	1.96	0.94	.975
	(+)	1.95	0.88	
Splenic artery PSV (cm/s)	(-)	78.66	19.27	.426
	(+)	73.92	19.73	
Splenic artery RI	(-)	0.60	0.09	.768
	(+)	0.60	0.10	
Intrasplenic artery PSV (cm/s)	(-)	78.49	31.46	.015
	(+)	58.60	19.38	
Intrasplenic artery RI	(-)	0.54	0.09	.426
	(+)	0.56	0.10	
Spleen size (mm)	(-)	96.53	15.70	.519
	(+)	93.53	15.91	
Kidney length (mm)	(-)	120.35	15.52	.436
	(+)	117.26	10.94	
Graft main artery PSV (cm/s)	(-)	169.52	118.12	.896
	(+)	165.41	91.36	
Graft main artery RI	(-)	0.75	0.06	.327
	(+)	0.77	0.09	
Intrarenal artery PSV (cm/s)	(-)	27.34	8.75	.362
	(+)	30.13	11.58	
Intrarenal artery RI	(-)	0.66	0.07	.126
	(+)	0.70	0.10	
MAP (mm Hg)	(-)	86.18	9.08	.017
	(+)	93.03	9.64	
		%		P
Male gender	(-)	45.8		.181
	(+)	65.2		
Deceased donor	(-)	45.8		.851
	(+)	39.1		
Immunosuppressive regimen, calcineurin inhibitor	(-)	52.4		.603
	(+)	43.8		

Abbreviation: SD, standard deviation.

analysis using a logistic regression model showed lower intrasplenic artery PSV and higher MAP to remain independent factors associated with HJB (Table 2). There was no difference in mean spleen size between patients with and without HJBs.

#### DISCUSSION

The concept of hyposplenism initially referred to a functional state that exists postsplenectomy. It is now considered to be an acquired disorder potentially associated with several diseases and sometimes accompanied by a reduction in spleen size.<sup>3</sup> In the clinical setting, patients with signs of functional hyposplenism should be viewed in a similar fashion to those who are asplenic secondary to splenectomy.<sup>5</sup> Moreover, impaired filtering function in hyposplenism may mirror a corresponding impairment of the immune system.<sup>3</sup>

Functional hyposplenism can be demonstrated by the following examinations: (1) scintigraphy, as a failure in uptake of a standardized Tc 99m sulphur colloid;<sup>6</sup> (2) counting pitted erythrocytes using interference contrast microscopy;<sup>5</sup> or (3) appearance of red blood cells containing HJBs in the peripheral blood smear.<sup>3</sup> Although radioisotopic methods enable assessment of the filtering function of the spleen, their use in clinical practice is limited by high costs and technical difficulties.<sup>3</sup> Detection methods for morphological alterations of erythrocytes are more suitable for clinical use because they are easy to perform, inexpensive, and less invasive than radiolabelling. A study comparing these modalities suggested that both HJBs and pitted erythrocytes are valid biomarkers of splenic dysfunction, although visualizing HJBs is methodologically advantageous.<sup>7</sup> Moreover, a positive significant correlation between HJBs and pitted erythrocytes,<sup>8</sup> as well as between HJBs and delay in damaged red blood cell clearance rate,<sup>9</sup> further supports HJB visualization as a marker of hyposplenism.

Functional hyposplenism has been already reported in sickle cell anemia,<sup>10</sup> allogenic bone marrow transplantation,<sup>11</sup> inflammatory bowel disease,<sup>12</sup> celiac disease,<sup>13</sup> systemic lupus erythematosus,<sup>14</sup> and amyloidosis.<sup>15</sup> The presence of HJBs in the peripheral blood smears of renal transplant recipients has been reported in 2 cases.<sup>15,16</sup> In 1 of those cases HJBs observed pretransplantation were associated with chronic renal failure due to amyloidosis,<sup>16</sup> a condition that has been associated with hyposplenism.<sup>17</sup> In

the second case, functional asplenia may have been a consequence of recent disseminated varicella infection.<sup>15</sup> In this study, hyposplenism, assessed by HJBs, was a common finding after renal transplantation, occurring in 48.9% of long-standing patients, a result comparable with that found in postsplenectomy patients.<sup>7</sup>

Lower intrasplenic artery PSV, which mirrors splenic dysfunction, was observed among patients with HJBs and was the only difference related to the spleen. Consistent with this finding, reduced splenic blood flow as assessed by indium-111-labeled platelets has been shown in patients with HJBs who survived more than 6 months post-bone marrow transplantation.<sup>18</sup> Although the association between spleen dysfunction and blood pressure seems unexpected, splenectomy has been shown to aggravate hypertension among mice fed a high-fat diet.<sup>19</sup> We believe that this association is not spurious; however, further studies are necessary to achieve a better understanding of this thread.

Except for lower intrasplenic artery PSV and higher MAP, HJBs did not appear to be associated with any other feature. Because HJBs are associated with a more severe degree of hyposplenism,<sup>9</sup> we are not able to rule out a milder degree of hyposplenism among patients without this finding. Accordingly, it is possible that patients with different degrees of hyposplenism could share some features, which blunt possible differences between groups, particularly with regard to spleen size. We assessed size by ultrasonic measurement of splenic length, based on the significant correlation between spleen dimensions measured by ultrasound and volume measured by helical computed tomography.<sup>20</sup>

In our study, spleen size was not associated with splenic function as assessed by HJBs, consistent with previous studies that failed to demonstrate a relationship between splenic function, assessed using scintigraphy, and spleen size, assessed using ultrasonography, among patients with chronic inflammatory bowel disease.<sup>21</sup> In contrast, subjects with sickle cell anemia have shown autosplenectomy as detected using ultrasound and associated with an absence of splenic function by isotope evaluation.<sup>22</sup> Moreover, HJBs were present only when the functional splenic volume, as assessed by Tc 99m-labeled autologous erythrocyte scintigraphy, was low,<sup>7</sup> suggesting that the relationship between HJBs and spleen size could be better evaluated using more sensitive techniques. In bone marrow transplantation,

**Table 2. Multivariate Analysis With Their Respective OR and 95% CI (Dependent Variable is HJB Present or Absent)**

	B	Wald	P	OR	95% CI	
					Lower	Upper
Intrasplenic artery PSV (cm/s)	-0.05	5.482	.019	0.95	0.910	0.992
MAP (mm Hg)	0.10	4.180	.041	1.11	1.004	1.222
Gender	-1.17	1.969	.161			
Intrarenal artery RI	6.53	1.292	.256			
Spleen size (mm)	-0.01	0.306	.580			
Age (y)	0.02	0.172	.679			

Abbreviations: OR, odds ratio; CI, confidence interval.

spleen size, evaluated using Indium-111-labeled platelet scintigraphy, was smaller in patients with than those without HJBs.<sup>18</sup> Curiously, after orthotopic liver transplantation, changes in splenic size have also been reported,<sup>23</sup> although the authors did not study the association with splenic function.

Although the presence of HJBs in peripheral blood was a marker of hyposplenism, it is uncertain whether these renal transplant recipients are at greater risk of infection due to this disorder because they are already receiving immunosuppressive therapy. Overwhelming bacteremia has already been reported in asplenic renal transplant recipients, in whom bacteriologic findings and presentation were characteristic of postsplenectomy sepsis reported in nontransplant patients.<sup>24</sup> Moreover, the authors have suggested that absence of the spleen more than immunosuppression with azathioprine and prednisone predisposed to uncommon infections in long-standing renal transplant recipients.<sup>24</sup> Accordingly, we are currently undertaking a prospective study to examine the role of splenic dysfunction in susceptibility to bacterial infection following renal transplantation.

In conclusion, our data showed functional hyposplenism in a large proportion of patients after renal transplantation; however, interpretation of the clinical significance of this complication both for the patient and the graft is uncertain. Our findings may have important practical implications for the long-term management of renal transplant recipients.

#### REFERENCES

- Picardi M, Selleri C, Rotoli B. Spleen sizing by ultrasound scan and risk of pneumococcal infection in patients with chronic GVHD: preliminary observations. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 24:173-177.
- William BM, Thawani N, Sae-Tia S, et al. Hyposplenism: a comprehensive review. Part II: clinical manifestations, diagnosis, and management. *Hematology*. 2007;12:89-98.
- Di Sabatino A, Carsetti R, Corazza GR. Post-splenectomy and hyposplenic states. *Lancet*. 2011;378:86-97.
- Bursac Z, Gauss CH, Williams DK, Hosmer DW. Purposeful selection of variables in logistic regression. *Source Code for Biology and Medicine*. 2008;3:17.
- Halldanarson TR, Litow MR, Murray JA. Hematologic manifestations of celiac disease. *Blood*. 2007;109:412-421.
- Dillon AM, Stein HB, English RA. Splenic atrophy in systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med*. 1982;96:40-43.
- Lammers AJ, de Porto AP, Bennink RJ, et al. Hyposplenism: comparison of different methods for determining splenic function. *Am J Hematol*. 2012;87:484-489.
- Corazza GR, Ginaldi L, Zoli G, et al. Howell-Jolly body counting as a measure of splenic function. A reassessment. *Clin Lab Haematol*. 1990;12:269-275.
- Robertson DA, Bullen AW, Hall R, et al. Blood film appearances in the hyposplenism of coeliac disease. *Br J Clin Pract*. 1983;37:19-22.
- Harrod VL, Howard TA, Zimmerman SA, et al. Quantitative analysis of Howell-Jolly bodies in children with sickle cell disease. *Exp Hematol*. 2007;35:179-183.
- Cuthbert RJ, Iqbal A, Gates A, et al. Functional hyposplenism following allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Pathol*. 1995;48:257-259.
- Ryan FP, Smart RC, Holdsworth CD, et al. Hyposplenism in inflammatory bowel disease. *Gut*. 1978;19:50-55.
- Miele L, Pierconti F, Forgiome A, et al. Cystic lymphangioma of the mesentery and hyposplenism in celiac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2007;19:1026-1030.
- Pileri P, Furic R. Functional asplenia in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*. 1990;20:185-189.
- Hicks RJ, Young W, Shapiro B, et al. Absent splenic uptake of Indium-111-oxine-labeled autologous leukocytes in functional asplenia. *J Nucl Med*. 1991;32:524-526.
- Bilwani F, Adil SN, Kakepoto GN, et al. Impaired splenic function in systemic amyloidosis: diagnostic importance of peripheral blood film. *J Pak Med Assoc*. 2001;93:360-362.
- Akpek G, Comenzo RL. Primary (AL) amyloidosis: a concise review. *Turk J Cancer*. 2001;31:5-14.
- Kalhs P, Panzer S, Kletter K, et al. Functional asplenia after bone marrow transplantation. A late complication related to extensive chronic graft-versus-host disease. *Ann Intern Med*. 1988; 109:461-464.
- Gotoh K, Inoue M, Masaki T, et al. Obesity-related chronic kidney disease is associated with spleen-derived IL-10 [pub ahead of print]. *Nephrol Dial Transplant*. Accessed December 9, 2012.
- Lamb PM, Lund A, Kanagasabay RR, et al. Spleen size: how well do linear ultrasound measurements correlate with three-dimensional CT volume assessments? *Br J Radiol*. 2002;75:573-577.
- Gothardt M, Broker S, Schlieck A, et al. Scintigraphy with 99mTc-labeled heat-altered erythrocytes in diagnosing hyposplenism: prospective comparison to 99mTc-labeled colloids and colour-coded duplex ultrasonography. *Nuklearmedizin*. 2007;46: 135-140.
- Al-Jam'a AH, Al-Dabbous IA, Chirala SK, et al. Splenic function in sickle cell anemia patients in Oatiff, Saudi Arabia. *Am J Hematol*. 2000;63:68-73.
- Boozari B, Gebel M, Bahr MJ, et al. Changes of duplex parameters and splenic size in liver transplant recipients during a long period of observation. *World J Gastroenterol*. 2005;11:6787-6791.
- Schröter GPJ, West JC, Weil R III. Acute bacteremia in asplenic renal transplant patients. *JAMA*. 1977;237:2207-2208.

**3.2 ARTIGO 2 – “Effect of Rapamycin on Spleen Size in Longstanding Renal Transplant Recipients” (artigo publicado). Qualis B3, fator de impacto 1.39.**

Neste artigo, o objetivo principal foi verificar o efeito dos inibidores de calcineurina e da rapamicina sobre a função esplênica. RTRs em fase tardia do transplante (> seis meses) foram investigados para a presença de corpúsculos de Howell-Jolly no sangue periférico e para possíveis alterações anatômicas em baço, verificáveis por ultrassom-Doppler, após serem subdivididos de acordo com os dois grupos de drogas imunossupressoras.



## Effect of Rapamycin on Spleen Size in Longstanding Renal Transplant Recipients

N.C. Araújo<sup>a,\*</sup>, S.B. Sampaio Gonçalves de Lucena<sup>b</sup>, and S. da Silveira Rioja<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Division of Nephrology and <sup>b</sup>Division of Hematology, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

### ABSTRACT

**Background.** Based on evidence available in the literature, rapamycin, a mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor, but not calcineurin inhibitors (CNIs), has been shown to decrease spleen size. Small spleen, in some instances, is associated with hyposplenism, a condition recently reported in patients with longstanding renal transplant. Accordingly, the effect of immunosuppressive drugs on spleen size was evaluated.

**Methods.** Renal transplant recipients (35 taking mTOR and 68 CNI) were included, in whom a standardized investigation of the kidney allograft and spleen with the use of color Doppler ultrasound was performed and a peripheral smear were reviewed for the presence of Howell-Jolly bodies (HJBs).

**Results.** We enrolled 103 patients (64 men; 66 from a deceased donor). The mean age was 47.7 years (range, 23.0–74.0 y). Mean transplant duration was 1,899 days (range, 181–6,883 d). According to the presence of HJBs, the prevalence of hyposplenism was 47.6% for the entire cohort. The differences between the mTOR and CNI groups regarding sex and the presence of HJBs were not statistically significant ( $P > .05$ ). Age, creatinine, hemoglobin, leukocytes, platelets, and Doppler parameters in spleen and kidney were similar in both groups ( $P > .05$ ). mTOR patients had a decreased spleen length size ( $90.09 \pm 13.02$  mm vs  $111.95 \pm 18.66$  mm;  $P < .001$ ), a longer transplant duration ( $3,576 \pm 1,594$  d vs  $1,036 \pm 1,369$  d;  $P < .001$ ) and higher serum cholesterol ( $227.50 \pm 38.75$  mg/dL vs  $182.67 \pm 37.74$  mg/dL;  $P < .001$ ) and triglycerides ( $194.23 \pm 79.88$  mg/dL vs  $148.70 \pm 55.54$  mg/dL;  $P = .003$ ) levels compared with the CNI group. A multivariate analysis showed mTOR inhibitor to be the most important predictor of spleen size. In both the mTOR and CNI groups, the comparison between the subgroups of present and absent HJBs did not show any difference.

**Conclusions.** The findings of this study suggest that small spleens in transplant recipients may be linked to treatment with an mTOR inhibitor, although this apparently does not compromise splenic function.

**F**UNCTIONAL hyposplenism is indicated by an anatomically present spleen which fails to take up radiolabeled colloid [1,2]. Severe hyposplenism should also be suspected from a peripheral blood film with the presence of Howell-Jolly bodies (HJBs) [3]. In addition to these methods, a small spleen associated with a lack of perfusion assessed by color-coded Doppler ultrasound also points toward impaired splenic function [4]. Recently, the occurrence of functional hyposplenism has been reported in a small group patients with longstanding renal transplant based on the finding of

intraerythrocyte HJBs in blood smears [5]. It is reasonable to assume that if the hyposplenic state represents a risk to health in renal transplantation, further information on the consequences of hyposplenism in renal transplant recipients is needed. This entails an assessment of splenic function in a larger number of patients.

\*Address correspondence to Nordeval Cavalcante Araújo, Rua São Salvador, 14/1404–Flamengo 22231-130 Rio de Janeiro–RJ, Brazil. E-mail: [nordeval@oi.com.br](mailto:nordeval@oi.com.br)

Some immunosuppressive drugs used in transplant patients have been reported to have an effect on spleen size. Rapamycin, a mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor (mTORi), has been shown to decrease spleen size in a variety of experimental studies [6–9], whereas experiments with the use of cyclosporine or tacrolimus failed to demonstrate an effect on spleen size [10–13]. Experiments with the use of azathioprine (AZP) have had contradictory effects [14–16], and studies with mycophenolate mofetil (MMF) are lacking. In the present study, we investigated the effect of immunosuppressive drugs on spleen size and additionally on the appearance of HJBs in erythrocytes, with the use of color Doppler ultrasound to evaluate the size and Doppler parameters of the spleen along with peripheral blood smears to detect HJBs. We compared patients taking mTOR inhibitors with those taking calcineurin inhibitors (CNIs).

#### MATERIAL AND METHODS

The study design was a prospective cross-sectional survey based on single samples. One hundred three patients with renal allografts were included, in whom a standardized investigation of the kidney allograft and spleen with the use of color Doppler ultrasound was performed and a peripheral smear was reviewed for the presence of HJBs at least 6 months after transplantation.

All ultrasounds were performed by the same operator with the use of a Sonoline 40 (Erlangen, Germany) instrument with a 3.5-MHz transducer. The parameters measured were spleen dimension, peak systolic velocity (PSV), and resistive index (RI) of the splenic artery at the hilum and within the organ. We also performed an ultrasound and Doppler study of the kidney graft, recording kidney length, PSV, and RI of the intraparenchymal and main graft arteries. With the use of light microscopy, all peripheral smears were reviewed by a single observer for the presence of HJBs. The methods have been reported elsewhere [5].

To ensure that the groups were similar, we included related variables such as those related to the graft. We compared the duration of transplantation, age, and serum creatinine, cholesterol, and triglyceride concentrations. In addition, we included blood variables related to hyposplenism, such as hemoglobin, leukocytes, and platelets.

On the basis of immunosuppressive drugs, patients were assigned to the mTORi group or the CNI group with a further subdivision according to the presence or absence of HJBs. Preliminarily, we analyzed the effect of different combinations of immunosuppressive drugs on spleen size: CNI versus mTORi (regardless of associated antimetabolites), MMF versus AZP (regardless of associated mTORi or CNI), MMF plus CNI versus MMF plus mTORi and AZP plus CNI versus AZP plus mTORi; all drugs were administered in combination with steroids. Because the analysis yielded a bulk of data without statistical significance, we decided to include in the study the comparisons of CNI versus mTORi only, which showed a statistically significant difference in the variable of interest. Of note, the distribution of antimetabolites was equivalent in both groups.

The Ethics Committee approved the study according to local legal requirements, and informed consent was obtained from every subject.

#### Statistical Analysis

The results are presented as mean  $\pm$  standard deviation for continuous variables and as a percentage for dichotomous variables.

**Table 1. Clinical Data and Measurements of Variables in Patients Taking Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor (mTORi) or Calcineurin Inhibitor (CNI)**

	Group	n	Mean	SD	P Value
Transplant duration (d)	mTOR	35	3576	1584	<.001
	CNI	68	1036	1369	
Age (y)	mTOR	35	49.34	10.10	.295
	CNI	68	46.85	11.97	
Creatinine (mg/dL)	mTOR	35	2.16	0.99	.187
	CNI	68	1.85	1.18	
Hemoglobin (g/dL)	mTOR	35	12.32	2.08	.914
	CNI	68	12.21	2.52	
Leucocytes (/mm <sup>3</sup> )	mTOR	35	6943	1928	.828
	CNI	68	6891	2485	
Platelets (/mm <sup>3</sup> )	mTOR	35	236457	71647	.099
	CNI	68	211701	71106	
Cholesterol (mg/dL)	mTOR	35	222.76	39.03	<.001
	CNI	68	181.21	36.79	
Triglycerides (mg/dL)	mTOR	35	186.53	77.47	.004
	CNI	68	148.70	55.54	
Splenic artery PSV (cm/s)	mTOR	35	74.12	18.94	.969
	CNI	68	73.97	18.93	
Splenic artery RI	mTOR	35	0.59	0.08	.158
	CNI	68	0.62	0.08	
Intrasplenic artery PSV (cm/s)	mTOR	35	67.76	29.61	.482
	CNI	68	72.04	28.54	
Intrasplenic artery RI	mTOR	35	0.53	0.06	.122
	CNI	68	0.56	0.09	
Spleen size (mm)	mTOR	35	90.09	13.02	<.001
	CNI	68	111.95	18.66	
Kidney length (mm)	mTOR	35	117.71	14.50	.445
	CNI	68	119.58	9.87	
Graft main artery PSV (cm/s)	mTOR	35	161.00	89.08	.254
	CNI	68	185.64	107.69	
Graft main artery RI	mTOR	35	0.75	0.07	.095
	CNI	68	0.78	0.09	
Intrarenal artery PSV (cm/s)	mTOR	35	28.93	9.24	.110
	CNI	68	25.99	8.32	
Intrarenal artery RI	mTOR	35	0.66	0.07	.825
	CNI	68	0.67	0.09	
			%	Q-Square	
Male sex	mTOR	23	65.70	0.591	
	CNI	41	60.30		
HJBs (+)	mTOR	20	57.10	0.163	
	CNI	29	42.60		

Abbreviations: PSV, peak systolic velocity; RI, resistive index; HJBs, Howell-Jolly bodies; +, present.

Both groups were compared with the use of Student *t* test for continuous variables and chi-square test for dichotomous variables. Correlation between continuous variables were assessed by Pearson test. Multivariate logistic regression analysis evaluated the simultaneous influence of variables associated with spleen size, such as those important clinically (immunosuppressive regimen and HJBs) and those that had shown an association with spleen size at an alpha level of <0.25 on univariate analysis. Accordingly, besides immunosuppressive regimen and HJBs, age, transplant duration, leukocytes, hemoglobin, platelets, cholesterol, and intrasplenic artery PSV were entered into the multivariate model. Data were analyzed with the use of SPSS software, version 17. Significant differences between groups were indicated by a *P* value of <.05.

**Table 2. Comparison of Variables Between Patients With Howell-Jolly Bodies Present (+) or Absent (-) in mTORi and CNI Groups**

	HJBs	n	mTORi			CNI		
			Mean	SD	P Value	Mean	SD	P Value
Transplant duration (d)	(-)	15	3,402	1,705	.585	998	1,376	.793
	(+)	20	3,706	1,537		29	1,087	1,383
Age (y)	(-)	15	48.93	8.56	.839	39	44.64	12.10
	(+)	20	49.65	11.32		29	49.83	11.31
Creatinine (mg/dL)	(-)	15	1.94	0.75	.262	39	1.71	1.00
	(+)	20	2.33	1.13		29	2.05	1.39
Hemoglobin (g/dL)	(-)	15	12.07	2.25	.546	39	12.86	2.12
	(+)	20	12.51	1.97		29	12.18	2.05
Leucocytes (/mm <sup>3</sup> )	(-)	15	7,417	1,451	.213	39	6,976	2,443
	(+)	20	6,588	2,189		29	6,778	2,580
Platelets (/mm <sup>3</sup> )	(-)	15	243,733	73,326	.610	39	210,763	67,806
	(+)	20	231,000	71,771		29	212,931	76,418
Cholesterol (mg/dL)	(-)	15	229.33	39.77	.391	39	183.24	35.28
	(+)	20	217.58	38.70		29	178.62	39.11
Triglycerides (mg/dL)	(-)	15	202.93	96.81	.279	39	147.68	49.08
	(+)	20	175.25	59.76		29	146.59	61.78
Splenic artery PSV (cm/s)	(-)	15	72.73	16.78	.724	39	73.71	18.66
	(+)	20	75.15	20.79		29	74.30	19.59
Splenic artery RI	(-)	15	0.60	0.08	.542	39	0.61	0.08
	(+)	20	0.58	0.08		29	0.63	0.09
Intrasplenic artery PSV (cm/s)	(-)	15	66.21	18.31	.793	39	76.44	33.19
	(+)	20	68.93	36.32		29	66.22	20.02
Intrasplenic artery RI	(-)	15	0.54	0.06	.671	39	0.54	0.09
	(+)	20	0.53	0.06		29	0.57	0.09
Spleen size (mm)	(-)	15	90.59	12.52	.848	39	115.28	19.84
	(+)	20	89.72	13.69		29	107.47	16.21
Kidney length (mm)	(-)	15	120.73	14.27	.317	39	120.24	10.21
	(+)	20	115.60	14.64		29	118.69	9.51
Graft main artery PSV (cm/s)	(-)	15	166.55	83.29	.752	39	203.07	109.98
	(+)	20	156.61	95.43		29	161.98	101.66
Graft main artery RI	(-)	15	0.75	0.06	.892	39	0.77	0.10
	(+)	20	0.74	0.07		29	0.78	0.09
Intrarenal artery PSV (cm/s)	(-)	15	29.17	9.40	.895	39	26.02	6.53
	(+)	20	28.74	9.36		29	25.94	10.40
Intrarenal artery RI	(-)	15	0.65	0.07	.433	39	0.65	0.09
	(+)	20	0.67	0.07		29	0.69	0.10

Abbreviations: As in Table 1.

**RESULTS**

We enrolled 103 patients (64 men, 39 women; 66 transplants from deceased donors, 37 transplants from living donors). The mean age was 47.7 years (range, 23.0–74.0 y). Mean transplant duration was 1,899 days (range, 181–6,883 d). The mTORi group consisted of 35 patients (31 rapamycin, 4 everolimus) and the CNI group of 68 patients (49 tacrolimus, 19 cyclosporine). According to the presence of HJBs, the prevalence of hyposplenism was 47.6% for the entire cohort. The differences between the mTORi and CNI groups regarding sex and the presence of HJBs were not statistically significant ( $P > .05$ ; Table 1). Age, creatinine, hemoglobin, leukocytes, platelets, and Doppler parameters in the spleen and kidney were similar in both groups ( $P > .05$ ; Table 1). mTORi patients had a decreased spleen length size ( $90.09 \pm 13.02$  mm vs  $111.95 \pm 18.66$  mm;  $P < .001$ ), a longer transplant duration ( $3,576 \pm 1,594$  d vs  $1,036 \pm 1,369$  d;  $P < .001$ ), and higher serum cholesterol ( $227.50$

$\pm 38.75$  mg/dL vs  $182.67 \pm 37.74$  mg/dL;  $P < .001$ ) and triglycerides ( $194.23 \pm 79.88$  mg/dL vs  $148.70 \pm 55.54$  mg/dL;  $P = .003$ ) levels compared with the CNI group (Table 1). Because the longer transplant duration in mTORi patients could account for the difference in spleen size, the patients with shorter transplant duration were gradually excluded until this variable was similar in both groups. When only patients with a transplant duration  $>1,650$  days were included, the difference in transplant duration disappeared ( $4,014 \pm 1,248$  d vs  $3,416 \pm 1,481$  d;  $P = .180$ ), but the smaller spleen size in the mTORi group remained ( $93.89 \pm 17.69$  mm vs  $106.83 \pm 19.12$  mm;  $P = .001$ ). Besides immunosuppressive regimen and HJBs, on univariate analysis the following variables fulfilled the criteria to enter the multivariable model: transplant duration ( $r = -0.505$ ;  $P < .001$ ), age ( $r = -0.326$ ;  $P = .001$ ), intrasplenic artery PSV ( $r = 0.242$ ;  $P = .015$ ), platelets ( $r = -0.290$ ;  $P = .003$ ) leukocytes ( $r = -0.215$ ;  $P = .029$ ), serum cholesterol

( $r = -0.367$ ;  $P < .001$ ), and hemoglobin, ( $r = -0.131$ ;  $P = .189$ ). Accordingly, multivariate analysis with the use of a logistic regression model showed mTORi as the most important predictor of spleen size (Table 3). Age and intrasplenic artery PSV also remained independent factors associated with spleen size, though to a lesser extent (Table 3).

In both mTORi and CNI groups, the comparison between the subgroups of present and absent HJBs did not show any difference (Table 2).

## DISCUSSION

Recently, the occurrence of hyposplenism has been reported in longstanding renal transplant recipients, based on hematological parameters [5]. It is well known that a wide variety of disorders can be complicated by hyposplenism, an acquired disorder associated with increased morbidity and mortality from infectious complications [17]. Because hyposplenism may contribute to the known susceptibility of transplant patients to infection, any contribution to a thorough understanding of this condition is highly desirable. Hyposplenism associated with reduction in spleen size has been reported in sickle cell anemia [18], in chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplant [19], in celiac disease [20], and in systemic erythematous lupus; [21] however, the size of the spleen does not correlate with splenic function [22]. Moreover, in some cases, hyposplenism has been associated with splenomegaly [1,23,24].

The finding of higher levels of serum cholesterol and triglycerides in the mTORi group is in accord with the literature [25].

In this study, we found smaller spleens in patients taking an mTORi compared with those taking a CNI. However, a statistically significant association with HJBs in blood smears from patients in the mTORi group could not be demonstrated. This further corroborates the lack of a relationship between spleen size and splenic function.

Age also contributed to the spleen size, an effect that has long been known [26]. The relationship between spleen size

and intrasplenic artery PSV, in multivariate analyses, corroborated that seen in univariate analysis, in which smaller spleen size was associated with lower PSV.

In studies addressing unrelated issues in mice, rapamycin treatment significantly reduced the size of the spleen in nephritis, probably mediated through suppression of lymphoproliferation [8]. This treatment has also been shown to reverse latent membrane protein 2A-induced splenomegaly in Burkitt lymphoma [7]. Additionally, mTOR blockade by rapamycin ameliorates spleen enlargement in portal hypertensive rats [9]. Furthermore, in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats, a reduction in spleen weight has been suggested to indicate that rapamycin was given at an immunosuppressive dose [6]. Although the effect of rapamycin on spleen size has been well documented, we are not aware of any report relating mTOR inhibitors to a reduction in the size of the spleen in humans. On the contrary, reports from experimental studies in rats and mice addressing the toxicity of cyclosporine on lymphoid tissue demonstrated a reduction in the size of the thymus [11,12,27], but not in spleen size [10–12].

Based on evidence available in the literature, the different mechanisms of probable importance for spleen reduction are mediated by the suppression of neovascularization by the down-regulation of the mTOR signaling pathway [9]. This leads to suppression of lymphoproliferation [8] and increases apoptosis in splenocytes [7] via the inhibition of mTOR.

The mTORi patients had a longer transplant duration, which could account for the smaller average spleen size. However, having chosen to investigate only the longest transplant duration patients in both groups, the difference in transplant duration disappeared and the smaller spleen size in the mTORi group remained, suggesting an effect that could be assigned to the drug. Moreover, in the multivariate model, transplant duration did not emerge as an independent factor associated with spleen size. Longer transplant duration in mTORi patients may simply reflect that many patients began to receive mTOR inhibitors when they already had a long duration of transplant.

In conclusion, the findings of our study suggest that small spleens in transplant recipients may be linked to treatment with an mTORi, although this apparently does not compromise splenic function.

**Table 3. Multivariate Analysis With Respective Odds Ratio (OR) and 95% Confidence Interval (CI) (Dependent Variable Was Spleen Size; Cutoff Point Was the 25% Quartile of the Sample: 90.8 mm)**

	B	Wald	P Value	OR	95% CI	
					Lower	Upper
Immunosuppressive regimen, mTORi	3.62	8.35	.004	37.44	3.21	437.33
Age (y)	0.13	7.91	.005	1.14	1.04	1.25
Intrasplenic artery PSV (cm/s)	-0.09	7.87	.005	0.92	0.86	0.97
Platelets (/mm <sup>3</sup> )	0.00	2.92	.087	1.00	1.00	1.00
Leukocytes (/mm <sup>3</sup> )	0.00	2.83	.093	1.00	1.00	1.00
Hemoglobin (g/dL)	-0.36	2.27	.132	0.70	0.44	1.11
Cholesterol (mg/dL)	0.01	1.31	.252	1.01	0.99	1.04
Transplant duration (d)	0.00	1.08	.300	1.00	1.00	1.00
HJBs (+)	0.15	0.03	.864	1.16	0.21	6.34

Abbreviations: As in Table 1.

## REFERENCES

- [1] Pearson HA, Spencer RP, Cornelius EA. Functional asplenia in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1969;281:923–6.
- [2] Spencer RP, Pearson HA, Binder HJ. Identification of cases of “acquired” functional asplenia. *J Nucl Med* 1971;11:763–6.
- [3] Doll DC, List AF, Yarbro JW. Functional hyposplenism. *South Med J* 1987;80:999–1006.
- [4] Wollenberg B, Riera-Knorrenschild J, Neubauer A, et al. Functional hyposplenism after allogeneic bone marrow transplantation: a case report. *Ultraschall Med* 2001;22:289–92.
- [5] Araujo NC, de Lucena SB, Rioja SD. Functional Hyposplenism in long-standing renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2013;45:1558–61.

- [6] Simler NR, Howell DC, Marshall RP, et al. The rapamycin analogue SDZ RAD attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Eur Respir J* 2002;19:1124-7.
- [7] Cen O, Longnecker R. Rapamycin reverses splenomegaly and inhibits tumor development in a transgenic model of Epstein-Barr virus-related Burkitt's lymphoma. *Mol Cancer Ther* 2011;10:679-86.
- [8] Lui SL, Tsang R, Chan KW, et al. Rapamycin attenuates the severity of established nephritis in lupus-prone NZB/W F1 mice. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:2768-76.
- [9] Mejias M, Garcia-Pras E, Gallego J, et al. Relevance of the mTOR signaling pathway in the pathophysiology of splenomegaly in rats with chronic portal hypertension. *J Hepatol* 2010;52:529-39.
- [10] Armas OA, Astarita RW, Wolf PL, et al. Effects of cyclosporin A on the splenic tissue of rats: a histomorphometric analysis. *Exp Mol Pathol* 1989;50:92-103.
- [11] Hattori A, Kunz HW, Gil TJ III, et al. Thymic and lymphoid changes and serum immunoglobulin abnormalities in mice receiving cyclosporine. *Am J Pathol* 1987;128:111-20.
- [12] Nagai Y. Effect of cyclosporin on the thymus and spleen in rats. *Nihon Geka Gakkai Zasshi* 1988;89:906-20.
- [13] Takai K, Jojima K, Sakatoku J, et al. Effects of FK506 on rat thymus: time-course analysis by immunoperoxidase technique and flow cytometry. *Clin Exp Immunol* 1990;82:445-9.
- [14] House AK, Boak JL, Draper V. In vitro spleen leucocyte migration and phytohaemagglutinin-stimulated lymphocyte transformation of immunosuppressed mice cells. II. Cells from mice treated by azathioprine and/or immune stimulation or thymectomy. *Clin Exp Immunol* 1974;17:189-98.
- [15] Blyth WA, Harbour DA, Hill TJ. Effect of immunosuppression on recurrent herpes simplex in mice. *Infect Immun* 1980;29:902-7.
- [16] Matsumoto K, Sekita K, Ochiai T, et al. Evaluation of immunotoxicity testings using azathioprine-treated rats: the International Collaborative Immunotoxicity Study (Azathioprine). *Eisei Shikenjo Hokoku* 1990;108:34-9.
- [17] Di Sabatino A, Carsetti R, Corazza GR. Post-splenectomy and hyposplenic states. *Lancet* 2011;378:86-97.
- [18] Al-Jam'a AH, Al-Dabbous IA, Chirala SK, et al. Splenic function in sickle cell anemia patients in Qatif, Saudi Arabia. *Am J Hematol* 2000;63:68-73.
- [19] Picardi M, Selleri C, Rotoli B. Spleen sizing by ultrasound scan and risk of pneumococcal infection in patients with chronic GVHD: preliminary observations. *Bone Marrow Transplant* 1999;24:173-7.
- [20] Marsh GW, Stewart JS. Splenic function in adult coeliac disease. *Br J Haematol* 1970;19:445-57.
- [21] Dillon AM, Stein HB, English RA. Splenic atrophy in systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 1982;96:40-3.
- [22] Gotthardt M, Broker S, Schlieck A, et al. Scintigraphy with 99mTc-labeled heat-altered erythrocytes in diagnosing hyposplenia: prospective comparison to 99mTc-labeled colloids and colour-coded duplex ultrasonography. *Nuklearmedizin* 2007;46:135-40.
- [23] Budke HL, Breitfeld PP, Neiman RS. Functional hyposplenism due to a primary epithelioid hemangioendothelioma of the spleen. *Arch Pathol Lab Med* 1995;119:755-7.
- [24] Steinberg MH, Gatling RR, Tavassoli M. Evidence of hyposplenism in the presence of splenomegaly. *Scand J Haematol* 1983;31:437-9.
- [25] Kasiske BL, de Mattos A, Flechner SM, et al. Mammalian target of rapamycin inhibitor dyslipidemia in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2008;8:1384-92.
- [26] Krumbhaar EB, Lippincott SW. The post-mortem weight of the normal human spleen at different ages. *Am J Med Sci* 1939;197:344-58.
- [27] Brown PAJ, Thomson AW, Whiting PH, et al. Immunosuppressive activity and toxicity of cyclosporin A in rats pretreated with high dose cyclophosphamide. *Agents Actions* 1985;17:67-72.

**3.3 ARTIGO 3 – “ Howell-Jolly bodies and liver-spleen scanning for assessment of splenic filtrative function yields discordant results in renal transplant recipients” (artigo publicado). Qualis B1, fator de impacto 2.028.**

Neste artigo, foi desenvolvido um modelo em que o tamanho do baço seria auxiliar na interpretação de resultados, quando houver divergência entre os resultados da pesquisa de corpúsculos de Howell-Jolly (positiva) e cintilografia hepato-esplênica (normal).

## Howell-Jolly bodies and liver-spleen scanning for assessment of splenic filtrative function yields discordant results in renal transplant recipients

Nordeval Cavalcante Araújo, MD, PhD<sup>a,\*</sup>, Margarida Maria Camões Orlando, MD<sup>b</sup>,  
Moises Bonifácio Neves, MD<sup>b</sup>, Suzimar Silveira Rioja, MD<sup>a</sup>, Stella Beatriz Gonçalves de Lucena, MD, PhD<sup>c</sup>,  
Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda, MD, PhD<sup>d</sup>

### Abstract

Given discrepancies between methods for diagnosing hyposplenism, the purpose of this study was to evaluate the effect of the spleen size on the correlation between the methods, and to propose a model for improving the interpretation. Patients with renal allografts were included, in whom the spleen was assessed using Doppler ultrasound, scintiscan, and the presence of Howell-Jolly bodies (HJBs) in peripheral smears. In 35 subjects, scintiscan and HJBs were normal (Group 0); 20 had an abnormal result in both methods (Group 1); 34 had discordant results with HJBs present (Group 2); and 14 had discordant results with decreased spleen uptake (Group 3). There was no association between HJBs and scintiscan. The patients of Groups 1 and 2 had smaller spleens. The patients with smaller spleen had more hematological evidence of hyposplenism and exhibit smaller discrepancies between the methods than patients with larger spleen. The spleen can tip the balance from a normal to impaired function provided that the spleen size is below the critical mass required to maintain splenic function. A mild impairment of phagocytic function and slight dyserythropoiesis along with a small spleen would result in decreased take up of radiocolloid or the appearance of HJBs in blood smears.

**Abbreviations:** FH = functional hyposplenism, HJ+ = HJB present, HJ- = HJB absent, HJBs = Howell-Jolly bodies, RES = reticuloendothelial system, RI = resistive indice, SD = standard deviations, SPSS = Statistical Package for the Social Sciences.

**Keywords:** howell-jolly bodies, hyposplenism, methodology disagreement, renal transplant, scintigraphy

### 1. Introduction

Functional hyposplenism (FH) refers to a clinical condition in which a spleen that can be shown by anatomical imaging techniques does not take up radiocolloid properly.<sup>[1,2]</sup>

Besides failure to take up <sup>99m</sup>Tc-sulphur colloid,<sup>[3]</sup> FH can be also demonstrated by increase in pitted red cell counts by interference contrast microscopy,<sup>[4]</sup> or the finding of Howell-Jolly bodies (HJBs) on peripheral stained blood smear.<sup>[5]</sup>

Despite an extensive literature of medical conditions associated with FH, like sickle cell anemia,<sup>[6]</sup> allogenic bone marrow

transplantation,<sup>[7]</sup> inflammatory bowel disease,<sup>[8]</sup> celiac disease,<sup>[9]</sup> systemic lupus erythematosus,<sup>[10]</sup> and amyloidosis<sup>[11]</sup> has been known for decades, to our knowledge a series addressing this issue in renal transplant recipients has been reported only recently.<sup>[12]</sup> FH is now well-recognized as a condition associated with several diseases potentially at risk for developing the disorder and occasionally along with a small spleen.<sup>[5,13,14]</sup>

As a natural consequence of the use of different methods for the detection of hyposplenism, discrepancies between methods may be encountered. Indeed, the correlation between scintigram results and the presence of HJBs in peripheral blood smears has been already assessed in many reports that have yielded conflicting results.<sup>[1,15-21]</sup> Likewise, there is no consensus regarding the relationship between spleen size and function.<sup>[3,13-15,22-26]</sup>

The purpose of this study was a comparative assessment of 2 methods for diagnosing hyposplenism and an evaluation of the effect of the spleen size on the correlation between these 2 methods in a group of renal transplant recipients. Additionally, we propose a model based on mechanisms of decreased spleen uptake of radiocolloid and of appearance of HJBs in peripheral blood smears according to spleen size to improve the interpretation of test results.

### 2. Materials and methods

The study design was a prospective cross-sectional survey based on single samples. One hundred and three patients with renal allografts were included, in whom a standardized investigation of the spleen was performed using color Doppler ultrasound and scintiscan and an examination of a peripheral smear for the

Editor: Orazio Schillaci.

This study is made possible through the support from Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). Grant number: E-26/111.228/2013.

The authors report no conflicts of interest.

<sup>a</sup> Division of Nephrology, <sup>b</sup> Division of Nuclear Medicine, <sup>c</sup> Division of Haematology, <sup>d</sup> Department of Anatomy, University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

\* Correspondence: Nordeval Cavalcante Araújo, University of the State of Rio de Janeiro – Nephrology Section, Boulevard 28 de Setembro, 77 – Vila Isabel, 20551-030 Rio de Janeiro-RJ, Brazil (e-mail: nordeval@oi.com.br).

Copyright © 2017 the Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution-NoDerivatives License 4.0, which allows for redistribution, commercial and non-commercial, as long as it is passed along unchanged and in whole, with credit to the author.

Medicine (2017) 96:51(e9242)

Received: 8 June 2017 / Received in final form: 27 October 2017 / Accepted: 21 November 2017

<http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000009242>

presence of HJBs. In case of retransplant, only the second renal transplant episode during the study period was included; the results, therefore, reflect one transplant procedure per study patient. Data on the underlying cause of the chronic renal failure were infrequently recorded and are therefore not reported in this article. We included both variables related to the graft and those related to the hyposplenism.

The ethics committee approved this study according to local legal requirements, and informed consent was obtained from the patients.

### 2.1. Scintigraphy protocol

Scans were obtained using a gamma camera using frames in  $128 \times 128$  and  $256 \times 256$  matrices. Digital planar images were recorded 20 minutes after the patients received a 5-mCi intravenous injection of  $^{99m}\text{Tc}$ -stannous colloid; particles were in the nanometer range (according to the manufacturer's package insert). In properly exposed images, assessment of the relative uptake of radiocolloid by the spleen versus uptake by the liver in anterior projections was performed; 103 scans were qualitatively interpreted by 2 researchers in single separate sessions. Those patients whose scans demonstrated equal density in the spleen and the liver were designated as normal, whereas patients who had reduced uptake in the spleen compared with the liver were designated as hyposplenic. In the case of disagreements, differences were resolved by joint discussion.

### 2.2. HJBs

All peripheral smears were reviewed for the presence of HJBs by a single observer using light microscopy. A drop of blood was placed onto a slide, and a blood smear was made. The film of blood was incubated with May-Grunwald stain for 3 minutes, after which water was added for 4 minutes. The blood was then Giemsa-stained for 10 minutes. HJBs were counted in the environment of 100 leucocytes. Patients were then further divided into HJB present (HJ<sup>+</sup>) or absent (HJ<sup>-</sup>) groups.

### 2.3. Ultrasonography

All ultrasounds were performed using a Sonoline 40 instrument (Erlangen, Germany) using the 3.5-MHz transducer. The spleen and kidney longitudinal diameters were obtained where the splenic and kidney edges were clearly defined. The resistive indices of 2 intrasplenic and interlobar graft arteries were measured using the built-in software. Spleen longitudinal diameter values were divided into quartiles. The groups (quartiles) were defined by cutoff values reflecting the  $\leq 25^{\text{th}}$ ,  $>25^{\text{th}}$  and  $\leq 50^{\text{th}}$ ,  $>50^{\text{th}}$  and  $\leq 75^{\text{th}}$ , and  $>75^{\text{th}}$  percentiles of spleen size distribution.

Instead of comparing patients based only on the results of 1 method, we used a composite to compare patients based on both methods. Based on the combined results, we placed the patients into 4 mixed groups, to capitalize on the respective strengths of each approach. The results of the combined examination were considered concordant if results of both methods were positive or negative for diagnosis of hyposplenism and discordant in case of disagreement in either of the 2 tests. Thus, patients with normal results and agreement between the 2 methods were assigned to Group 0, those in whom both results pointed toward hyposplenism were assigned to Group 1, those with HJBs present in peripheral blood smears but normal scintigrams were

assigned to Group 2 and those with absent HJBs but abnormal scintigrams were assigned to Group 3. Additionally, the effect of the spleen size on the agreement between both methods was assessed.

### 2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS statistical package (SPSS for Windows, version 17.0, Chicago, IL). The values were expressed as means  $\pm$  standard deviations. For analysis of the differences between groups, analysis of variance or Student *t* test was used as appropriate.  $\chi^2$ , Spearman rank correlation, and Fisher exact tests were used to discover whether there was a relationship between categorical variables. The results were considered statistically significant at  $P < .05$ .

## 3. Results

We enrolled 103 patients (65 men; 62 cadaveric donors; 8 retransplants). The mean age was  $48.16 \pm 11.67$  years (range 23.0–74.0 years). The mean transplant duration was 2331 days (range 8–8978 days).

Medical treatments included rapamycin and mycophenolate or azathioprine ( $n = 30$ ); calcineurin inhibitors in addition to mycophenolate or azathioprine ( $n = 60$ ); or azathioprine or mycophenolate ( $n = 13$ ). All treatment regimens were administered in combination with steroids.

Thirty-five subjects had concordant normal results (33.98%) from both methods (normal spleen uptake and no HJBs in peripheral blood smears; Group 0); 20 had a concordant abnormal result (19.42%) in both methods (decreased spleen uptake and HJBs in peripheral blood smears, Group 1); 34 had discordant results (33.01%) with HJBs in peripheral blood smears, Group 2; and 14 had discordant results (13.59%) with decreased spleen uptake, Group 3. There was no evidence of a significant association between the presence of HJBs and spleen scintigraphy for diagnosing hyposplenism ( $Q\text{-square} = 0.833$ ;  $P = .362$ ).

The patients in Groups 1 and 2 were characterized by smaller spleen size (Table 1). None of the other analyzed variables were different among groups (Table 1).

The average spleen size was  $104.1 \pm 20.4$  mm and the range was between 57.2 and 168.1 mm. The spleen length was  $<90.0$  mm in 25 subjects (first quartile), between 90.0 and 102.6 mm in 26 subjects (second quartile), between 102.8 and 115.6 mm in 26 subjects (third quartile), and  $>115.6$  mm in 26 subjects (fourth quartile). The patients in the first quartile (smaller spleen) had higher hematocrit and hemoglobin levels and higher lymphocyte, monocyte, and platelets counts than those in the fourth quartile (larger spleen, Table 2).

The correlation between the groups and spleen size quartiles showed that smaller spleens were associated with the appearance of HJBs and decreased colloid uptake by the spleen, as inferred from the relationship between Group 1 and the lower quartile of the spleen size (Spearman  $\rho = 0.40$ ;  $P = .003$ ; Fig. 1). Additionally, HJBs (irrespective of scintigram) were more common in the first than in the fourth quartile ( $\chi^2 = 8.63$ ;  $P = .003$ ) (Fig. 1).

Discordance between splenic uptake of Tc-99m colloid and the presence of HJBs has been described in many conditions. To compare our results with those reported in the literature, data concerning agreement between the methods are presented in Table 3. Compared with values reported for a variety of conditions, there was an intermediate level of agreement

**Table 1**  
Clinical data and measurements of variables of interest from patients studied\*.

	Group 0=35	Group 1=20	Group 2=34	Group 3=14	P
Age, y	46.46 ± 11.56	53.90 ± 12.51	45.85 ± 10.43	49.79 ± 11.81	.064 <sup>†</sup>
Transplant duration, days	2102 ± 2359	2819 ± 2355	2367 ± 2351	2126 ± 1738	.500 <sup>‡</sup>
Dialysis duration, mo	72.11 ± 55.00	60.10 ± 59.55	53.56 ± 46.65	53.93 ± 40.53	.572 <sup>‡</sup>
Creatinine, mg/dL	2.08 ± 1.97	2.30 ± 2.11	2.26 ± 1.07	2.56 ± 2.57	.094 <sup>‡</sup>
Albumin, g/dL	4.30 ± 0.68	4.43 ± 0.50	4.61 ± 0.40	4.55 ± 0.58	.264 <sup>‡</sup>
AST, IU/L	19.19 ± 9.16	19.53 ± 6.69	22.00 ± 15.25	32.13 ± 23.19	.189 <sup>‡</sup>
ALT, IU/L	22.07 ± 20.38	17.93 ± 8.98	18.62 ± 15.75	29.14 ± 32.93	.583 <sup>‡</sup>
Direct bilirubin, mg/dL	0.17 ± 0.12	0.13 ± 0.09	0.16 ± 0.08	0.21 ± 0.12	.407 <sup>‡</sup>
Indirect bilirubin, mg/dL	0.30 ± 0.31	0.17 ± 0.04	0.27 ± 0.17	0.25 ± 0.09	.097 <sup>‡</sup>
Hematocrit, %	31.35 ± 8.14	36.58 ± 6.76	33.54 ± 8.98	36.20 ± 6.03	.146 <sup>‡</sup>
Hemoglobin, g/dL	10.15 ± 2.60	11.82 ± 2.23	10.83 ± 2.89	11.74 ± 1.99	.153 <sup>‡</sup>
Leucocytes, cells/mm <sup>3</sup>	7669 ± 2968	7872 ± 5812	8179 ± 2794	7328 ± 3287	.904 <sup>†</sup>
Neutrophils, cells/mm <sup>3</sup>	5738 ± 2721	4241 ± 2832	5824 ± 3072	5004 ± 3119	.258 <sup>†</sup>
Lymphocytes, cells/mm <sup>3</sup>	1284 ± 962	1746 ± 559	1580 ± 861	1696 ± 929	.256 <sup>†</sup>
Monocytes, cells/mm <sup>3</sup>	526 ± 370	583 ± 217	609 ± 296	641 ± 371	.680 <sup>†</sup>
Platelets, cells/mm <sup>3</sup>	195387 ± 83186	228176 ± 63668	213176 ± 69771	197125 ± 62748	.469 <sup>†</sup>
Spleen size, mm	115.21 ± 21.41	93.47 ± 19.06 <sup>§</sup>	99.70 ± 15.04 <sup>  </sup>	102.09 ± 18.90	.000 <sup>†</sup>
Intrasplenic artery RI	0.54 ± 0.07	0.58 ± 0.08	0.54 ± 0.06	0.55 ± 0.11	.278 <sup>‡</sup>
Kidney length, mm	118.07 ± 9.27	116.67 ± 16.64	118.33 ± 12.65	116.64 ± 11.66	.801 <sup>‡</sup>
Intrarenal artery RI	0.66 ± 0.09	0.71 ± 0.09	0.65 ± 0.08	0.68 ± 0.10	.067 <sup>‡</sup>
PRA class I, %	4.25 ± 13.16	7.60 ± 13.66	3.53 ± 13.35	1.53 ± 4.04	.500 <sup>‡</sup>
PRA class II, %	2.26 ± 9.86	9.89 ± 23.13	7.05 ± 22.59	2.83 ± 6.94	.614 <sup>‡</sup>
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	χ <sup>2</sup>
Sex, male	18 (51.4)	14 (70.0)	23 (67.6)	10 (71.4)	0.164
Calcineurin inhibitor	22 (62.9)	10 (50.0)	19 (55.9)	9 (64.3)	0.958
ATG or Anti-IL2	9 (25.7)	3 (15.0)	3 (8.8)	4 (28.6)	0.110
HLA-mismatches, >3	22 (75.9)	13 (81.3)	15 (53.6)	8 (66.7)	0.058

AST = aspartate aminotransferase, ALT = alanine aminotransferase, RI = resistive index, PRA = panel reactive antibody, ATG = rabbit anti-thymocyte globulin, Anti-IL2 = interleukin-2 receptor antagonists, HLA = human leukocyte antigen.

\* Mean ± standard deviation.

<sup>†</sup> ANOVA test.

<sup>‡</sup> Kruskal-Wallis test.

<sup>§</sup> P < .001 vs. Group 0.

<sup>||</sup> P = .005 vs. Group 0.

between the methods in our renal transplant patients (Table 3).<sup>[1-3,10,11,15-22,24-71]</sup>

We have integrated the examination results and mechanisms associated with the findings of hyposplenism reported in the literature in a theoretical model to help the interpretation of the results (Table 4). Besides the mechanisms, the model includes distributions as required to assign the results of scintigraphy, the presence of HJBs and spleen size according to severity class adjustments. The lowest level of the 3-level patient severity score corresponds to findings in the normal range and is indicative of low-risk patients. The highest level corresponds to patients who have examination findings that indicate severe hyposplenism.

**Table 2**  
Hematological data according to the spleen size quartile\*.

Variable	<25th	>75th	P
Hematocrit, %	35.12 ± 7.68	28.56 ± 9.09	.011
Hemoglobin, g/dL	11.42 ± 2.51	9.39 ± 2.94	.015
Leucocytes, cells/mm <sup>3</sup>	8004 ± 3190	7154 ± 2942	.350
Neutrophils, cells/mm <sup>3</sup>	5192 ± 2990	5706 ± 2792	.559
Lymphocytes, cells/mm <sup>3</sup>	1975 ± 752	878 ± 685	<.001
Monocytes, cells/mm <sup>3</sup>	691 ± 359	448 ± 264	.015
Platelets, cells/mm <sup>3</sup>	246,600 ± 63,543	173,667 ± 65,455	<.001

\* Mean ± SD.

#### 4. Discussion

To date, several useful techniques have been available for the evaluation of spleen function in clinical practice. Among them, excellent procedures such as liver-spleen scintigraphy and the examination of peripheral blood smears for the presence of HJBs are the most common, and are able to provide a specific diagnosis.<sup>[5,72]</sup>

To our knowledge, the present study is the first comparative assessment of these 2 traditional methods for the diagnosis of hyposplenism in a large study enrolling patients with the same condition.

In this prospective observational study, the most important observation was the finding that among 103 patients transplanted, 33 (32.7%) were found to be hyposplenic as measured by <sup>99m</sup>Tc-labeled stannous colloid spleen scans, whereas 54 (53.1%) were hyposplenic on the basis of HJBs.

These results showed that besides the groups in which both methods have a concordant relationship for the diagnosis of hyposplenism (19.42%) or for normal spleen function (33.98%); there are 2 discordant groups: one in which HJBs are present on peripheral blood smears but scintigrams are normal (33.01%) and a second one in which HJBs are absent but scintigrams point toward hyposplenism (13.59%).

Our findings are in accordance with data in previous reports of studies in smaller numbers of subjects in which radionuclide liver-spleen scan and peripheral blood smears did not correlate

	G0	G1	G0	G1	
First quartile	5	10	6	3	Second quartile
	G2	G3	G2	G3	
	7	3	13	4	
Third quartile	G0	G1	G0	G1	Fourth quartile
	8	4	16	3	
	G2	G3	G2	G3	
	10	4	4	3	

**Figure 1.** Distribution of subsets of concordant and discordant groups (G0–G3) according to the spleen size quartile. While the subgroup of normal concordant examination (Group 0) predominantly had spleen sizes in the upper quartile, the subgroup of hyposplenic concordant results (Group 1) showed the opposite result, with more spleen sizes in the lower quartile (Spearman=0.40; p=0.003) (Numbers highlighted in grey). Group 2 (HJBs present and normal scintiscan) had seven cases of spleen in the lower quartile (Cross-hatched number). HJBs were more common in the first than in the fourth quartile (17/25, 68.0% versus 7/26, 26.9%) (Chi-square=8.63; p=0.003). Spleen length quartiles: A: ≤25th, B: >25th to ≤50th, C: >50th to ≤75th, D: >75th.

**Table 4**

**A component-based mechanism involved in the impaired spleen uptake of radiocolloid and appearance of HJBs on peripheral blood smears. Compromised extent.**

Mechanism	Normal	Mild/moderate	Severe
RES impairment			
Liver-spleen scan	Normal	Normal/Decreased	Decreased
HJBs	Absent	Absent/Present	Present
HJBs overload			
Liver-spleen scan	Normal	Normal	Normal
HJBs	Absent	Absent/Present	Present
Spleen critical mass			
Liver-spleen scan	Normal	Normal/Decreased	Decreased
HJBs	Absent	Absent/Present	Present

RES = reticuloendothelial system, HJBs = Howell-Jolly bodies.

well,<sup>[13,17]</sup> although the correlation may vary among disease (Table 3).

There is no consensus concerning the best method for assessing spleen function. Although one study of functional asplenia in adults has suggested that HJBs are a more sensitive indicator of splenic function than sulfur colloid scanning,<sup>[15]</sup> others have found radionuclide sulfur colloid and heat-treated red cell studies to be more sensitive indicators of red cell function.<sup>[67,73]</sup>

Based on a compilation of case reports, concordance between the methods is the rule (Table 3). Indeed, in 52 case reports, from 47 articles, in a variety of conditions, the concordance (both normal or both abnormal) was as high as 80.8%, a figure quite a lot higher than that found in the current study (53.4%). However, the figure is substantially lower when the concordance is based on series instead. From 159 cases studied in 13 series (those including at least five cases), also in a variety of conditions, the concordance only reached 54.7% (from 21.8% in miscellaneous conditions to

100.0% in sickle cell anemia), a percentage very similar to that found in the present study (53.4%).

It is not entirely clear why concordance in compilations of case reports is different from that in series studies. However, one might hypothesize that part of this inconsistency may derive from fundamental problems associated with the way the patients are enrolled. In case reports, usually only cases with severe infection or fatal outcome are reported, a situation in which hyposplenism is more severe, while in series a wide range of disease severity is included. In accordance with this, it is well known that in mild cases of hyposplenism, although spleen dysfunction can be assessed by using scintiscan, HJBs are regularly absent on peripheral blood smears, that is, the appearance of HJBs in blood smears points towards a more severe form of hyposplenism.<sup>[72,73]</sup> Therefore, based on these assumptions, it is reasonable to believe that our concordant results represent either normal spleen function (HJBs absent and normal spleen scintigraphy) or severe hyposplenism (HJBs present and impaired spleen uptake of colloid) and in cases of disagreement where there is an absence of HJBs, we are dealing with a less severe dysfunction of the spleen. The more problematic discrepant results are the 34 patients in which the HJB tests are positive but the scintigrams are negative. This discrepancy may be caused by conditions other than hyposplenism.

This disagreement (HJBs present along with normal spleen scan) has been attributed to a bone marrow abnormality (dyserythropoiesis), in which an overload of HJBs delivered to the circulation can overwhelm the ability of a normal spleen to clear them from circulation.<sup>[58]</sup> In accordance with this, HJBs

**Table 3**

**Comparison of the results obtained in this study with the summation of several case reports and series found in the literature.**

	Concordant			Discordant		
	Total	Abnormal	Normal	Total	HJBs absent	HJBs present
Case reports <sup>[2,10,11,21,22,24–66]</sup>	78.6% (44/56)	88.6% (39/44)	11.4% (5/44)	21.4% (12/56)	58.3% (7/12)	41.7% (5/12)
Series <sup>[1,3,15–20,67–71]</sup>	54.7% (87/159)	77.0% (67/87)	23.0% (20/87)	45.3% (72/159)	67.6% (48/72)	33.3% (24/72)
Current	53.4% (55/103)	36.4% (20/55)	63.6% (35/55)	46.6% (48/103)	29.2% (14/48)	70.8% (34/48)
Distribution of series cases according to specific diseases						
Amyloidosis <sup>[15,16,18]</sup>	46.6% (14/30)	92.9% (13/14)	7.1% (1/14)	53.3% (16/30)	68.7% (11/16)	31.3% (5/16)
Sickle cell anemia <sup>[1,67,68]</sup>	87.0% (20/23)	95.0% (19/20)	5.0% (1/20)	13.0% (3/23)	66.7% (2/3)	33.3% (1/3)
Asplenia/ Splenectomy <sup>[19,20,69]</sup>	67.3% (33/49)	54.5% (18/33)	45.5% (15/33)	32.7% (16/49)	12.5% (2/16)	87.5% (14/16)
SLE, Sjögren syndrome <sup>[3,70]</sup>	63.7% (7/11)	85.7% (6/7)	14.3% (1/7)	36.4% (4/11)	0.0% (0/4)	100.0% (4/4)
Heterotaxy <sup>[71]</sup>	75.0% (9/12)	77.8% (7/9)	22.2% (2/9)	25.5% (3/12)	100.0% (3/3)	0.0% (0/3)
Miscellaneous <sup>[17]</sup>	11.8% (4/34)	100.0% (4/4)	0.0% (0/4)	88.2% (30/34)	100.0% (30/30)	0.0% (0/30)

HJBs = Howell-Jolly bodies, SLE = systemic lupus erythematosus.

have also been reported in some hematological abnormalities, such as iron deficiency anemia, hemolytic anemias, and megaloblastosis.<sup>[74,75]</sup> Thus, it is reasonable to speculate that the finding of HJBs in peripheral blood smears along with a normal spleen scan might represent the hematological disorders mentioned in renal transplant recipients. However, as no comprehensive study to detect hematological disorders was performed in the present study, it is not possible to confirm this hypothesis.

Whether the disassociation of radiocolloid uptake from the appearance of HJBs is a qualitative or quantitative phenomenon is unknown. However, there are several pieces of evidence that support the influence of spleen size on the blood film features of hyposplenism.

We performed some further analyses to examine whether incorporating a spleen size parameter in interpreting the traditional methods for diagnosing hyposplenism would improve the concordance between the methods. In our study, the findings on peripheral blood smears correlated better with spleen size than with the findings on radionuclide liver-spleen scans. Indeed, the appearance of HJBs increases from 26.9% to 70.0% as spleen size reduces from the upper to the lower percentile, respectively. Accordingly, HJBs was found in all patients submitted to total splenectomy,<sup>[69]</sup> whereas no case of HJBs could be detected in patients undergoing subtotal splenectomy.<sup>[20]</sup> To a lesser extent, a similar relationship was also found between spleen size and spleen colloid uptake.

There is also further supporting evidence from the literature. Indeed, based on data from the literature, 55 of 90 (61.1%) patients with a presence of HJBs had an absent or small spleen,<sup>[1-3,10,11,13,16,18,19,21,22,24-27,29,32,33,35,36,41-45,49,50,52,54,55,57-59,61,62,66,68,69,71]</sup>, whereas only 1 of 13 (7.7%) patients with absence of HJBs had a small spleen.<sup>[16,26,28,37,40,53,64,65]</sup> Moreover, of 35 cases of HJBs present with normal or enlarged spleen, 9 were sickle cell anemia cases<sup>[1]</sup> and in 5, microscopic sections showed extensive splenic parenchymal replacement by tissue infiltration of the underlying disease.<sup>[18,24-26,50]</sup>

Moreover, agreement between the methods increases depending on the spleen size. The lower the spleen size, the better the agreement between methods for diagnosing hyposplenism: 50% versus 15% agreement in the lower quartile and upper quartile, respectively. However, agreement on negative results for hyposplenism (normal results using both methods) presented the opposite trend (14.3% in the lower vs. 45.7% in the upper quartile).

If one assumes that the lower quartile is below the critical size of spleen required to clear HJBs, this assumption supports the appearance of HJBs in the peripheral blood smears of further 7 patients from the discordant group with HJBs, which in turn, further reduces the percentage of unexplained cases of HJBs from 33.0% to 26.2% (Fig. 1).

From a diagnostic perspective, it is comforting when the results of both methods agree, that is, both methods point toward hyposplenism or normality. However, when combinations of methods often vary, it seems to be a good idea to add other parameters to improve diagnosis. Clinicians need to be aware of the limitations of both methods when making management decisions. Adding information from the measurement of the spleen to the results of HJBs and scintiscanning might help to refine the diagnosis of hyposplenism. The addition of spleen size measurement increases the agreement between HJBs and scintiscanning, and it would be reasonable to include it to

further improve prediction in subgroups of patients with borderline degrees of hyposplenism.

Accordingly, a theoretical model is proposed (Table 4) to explain the discordance between the scintigraphy and HJBs methods based on the interaction of 3 mechanisms underlying medical tests for spleen function. This developed model is expected to maximize the strengths and minimize the weaknesses of each type of data. Like other models, this contains approximations and assumptions that limit the range of validity and predictive power, but may help us to gain insights into the disagreements between different methods for diagnosing hyposplenism. This process was performed for 3 different grades of severity for each variable.

The model assumes that as the impact of each mechanism (or the summation of more than one mechanism) impairment on the spleen function (as assessed by the method) are expected to vary substantially according to the degree of severity, then a stratified composite mechanism can help in interpreting the examination results and its consistency across these subgroups.

One might hypothesize that if all components are normal, the spleen uptake of radiocolloid should be normal and HJBs absent. However, if all components are abnormal—as in a severe disease extent—the spleen uptake of radiocolloid should be decreased and HJBs present, the classical features of hyposplenism. However, a composite score of abnormal components at different extents could yield a spectrum of spleen impairment severity that could explain the disagreements in results between liver-spleen scintiscanning and peripheral blood smears in hyposplenism, as reported in different clinical conditions.

Overall, the hypothesized model fits well. Both normal (Group 0) and abnormal concordant (Group 1) results can be associated with normal and at least 1 severely abnormal mechanisms, respectively (Table 4). If the spleen shows a decreased uptake by liver-spleen scan, without HJBs in peripheral blood (Group 3), the reason may be mildly or moderately compromised reticuloendothelial function of the spleen, without HJB outpouring and a spleen larger than a critical size. However, if HJBs are present and a liver-spleen scintiscan is normal (Group 2), reticuloendothelial function should be normal (or only mildly compromised) and either HJB outpouring or small spleen size or both should be taken into account.

It seems plausible to speculate that according to its size, the spleen can tip the balance from normal to impaired function as assessed by the tests, provided that the spleen is below a critical size that is required to maintain splenic function. Accordingly, an association of mild impairment of phagocytic function and slight dyserythropoiesis along with a small spleen would result in a clear decreased take up of radiocolloid or the appearance of HJBs in peripheral blood smears.

There are separate lines of evidence that support the hypothesis that spleen size may help in the understanding of disagreements between liver-spleen scintiscanning and peripheral blood smears. Some studies have shown an association of reduction in spleen size with a heterogeneous group of diseases that include hematological disorders,<sup>[14,23]</sup> chronic intestinal inflammation,<sup>[76]</sup> and in systemic erythematosus lupus.<sup>[3]</sup> However, there is significant uncertainty and divergence of opinion regarding the correlation between spleen size and function.<sup>[1,57]</sup> Moreover, the occurrence of hyposplenism in patients with splenomegaly or palpable spleen<sup>[1,58,70,77]</sup> seems an apparent contradiction. Nonetheless, in cases in which there was no clear evidence of hematologic stress and no outpouring of reticulocytes, a small

spleen, below a critical necessary size, cannot adequately clear all HJBs from red cells.<sup>[22]</sup>

Data from experimental<sup>[78]</sup> and clinical studies<sup>[79]</sup> showed that a greater amount of implanted spleen tissue reduces the likelihood of appearance of HJBs in peripheral blood smears. Based on the summation of the results from the reports mentioned above<sup>[78,79]</sup> and those of the present study, we are confident that small spleen size in renal transplant patients plays an important role in the finding of HJBs without impaired uptake in spleen scans. It is noteworthy that small spleen has also been associated with the use of rapamycin, a common immunosuppressant used in renal transplant.<sup>[80]</sup>

Nonetheless, our results are in line with the concept that a small spleen below a crucial size is an important cause HJB presence in peripheral blood.<sup>[78]</sup> Interestingly, spleen size but not HJBs and spleen scintiscanning correlated with peripheral blood cell counting, suggesting that a small spleen size is a more specific variable for the identification of some features of hyposplenism than spleen reticuloendothelial system function alone. Accordingly, small spleen correlated better with higher hemoglobin levels and lymphocyte and platelet counts.

As the blood filtrative function of the spleen relies on the amount of clarified senescent cells that travel through venous sinusoids and the elevation of spleen blood flow may play an important role in the development of hypersplenism,<sup>[81]</sup> it is reasonable to assume that the clearance of HJBs from peripheral blood might be compromised if the spleen blood flow decreases. On the one hand, an increase in the cardiac output ratio to the spleen in splenomegaly has been reported;<sup>[81]</sup> on the other hand, it seems plausible to infer that a decrease in cardiac output ratio to a small spleen could produce features of hyposplenism. Indeed, in patients with chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation, HJBs were associated with smaller spleen and lower splenic flow.<sup>[82]</sup>

A weakness of this study was the fact that we were not able to answer why a large number of renal transplant recipients present HJBs in peripheral smears without signs of impaired radiocolloid uptake by the spleen. The assumption that the presence of HJBs is a feature of severe splenic dysfunction is in disagreement with normal spleen colloid scintigraphy, at least at first sight. However, if different mechanisms, such as RES dysfunction, HJB overload, and spleen critical mass, take place to different extents, an intricate summation effect could be expected that might explain the discordant findings in different clinical situations.

According to the proposed model, it is possible that even an otherwise normal small spleen overwhelmed by an outpouring of HJBs cannot adequately clear all corpuscles from red cells, although clearance of colloidal particulate remains intact. This assumption would be valuable for interpreting the finding of HJBs in peripheral blood smears in patients with normal liver-spleen scans and could be used as an alternative to the present system.

The results of this study extend our knowledge concerning discrepancies between tests used for diagnosing hyposplenism by examining the underlying mechanisms responsible for the abnormal results. However, further exploration with longitudinal studies is necessary before any generalizations can be drawn regarding the significance of this model for refining the next steps in identifying limiting, worst-case, or special scenarios for diagnosing hyposplenism.

## References

- Pearson HA, Spencer RP, Cornelius EA. Functional asplenia in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1969;281:923-6.
- Spencer RP, Pearson HA, Binder HJ. Identification of cases of "acquired" functional asplenia. *J Nucl Med* 1970;11:763-6.
- Dillon AM, Stein HB, English RA. Splenic atrophy in systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 1982;96:40-3.
- Halfdanarson TR, Litzow MR, Murray JA. Hematologic manifestations of celiac disease. *Blood* 2007;109:412-21.
- Di Sabatino A, Carsetti R, Corazza GR. Post-splenectomy and hyposplenic states. *Lancet* 2011;378:86-97.
- Harrod VL, Howard TA, Zimmerman SA, et al. Quantitative analysis of Howell-Jolly bodies in children with sickle cell disease. *Exp Hematol* 2007;35:179-83.
- Cuthbert RJ, Iqbal A, Gates A, et al. Functional hyposplenism following allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Pathol* 1995;48:257-9.
- Ryan FP, Smart RC, Holdsworth CD, et al. Hyposplenism in inflammatory bowel disease. *Gut* 1978;19:50-5.
- Miele L, Pierconti F, Forgione A, et al. Cystic lymphangioma of the mesentery and hyposplenism in celiac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007;19:1026-30.
- Piliero P, Furie R. Functional asplenia in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 1990;20:185-9.
- Hicks RJ, Young W, Shapiro B, et al. Absent splenic uptake of Indium-111-oxine-labeled autologous leukocytes in functional asplenia. *J Nucl Med* 1991;32:524-6.
- Araújo NC, de Lucena SB, Rioja SD. Functional hyposplenism in long-standing renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2013;45:1558-61.
- Gotthardt M, Broker S, Schlieck A, et al. Scintigraphy with 99mTc-labeled heat-altered erythrocytes in diagnosing hyposplenia: prospective comparison to 99mTc-labeled colloids and colour-coded duplex ultrasonography. *Nuklearmedizin* 2007;46:135-40.
- Al-Jam'a AH, Al-Dabbous IA, Chirala SK, et al. Splenic function in sickle cell anemia patients in Qatif, Saudi Arabia. *Am J Hematol* 2000;63:68-73.
- Gertz MA, Kyle RA, Greipp PR. Hyposplenism in primary systemic amyloidosis. *Ann Intern Med* 1983;98:475-7.
- Powsner RA, Simms RW, Chudnovsky A, et al. Scintigraphic functional hyposplenism in amyloidosis. *J Nucl Med* 1998;39:221-3.
- Scheuerman O, Bar-Sever Z, Hoffer V, et al. Functional hyposplenism is an important and underdiagnosed immunodeficiency condition in children. *Acta Paediatr* 2014;103:e399-403.
- Boyko WJ, Pratt R, Wass H. Functional hyposplenism, a diagnostic clue in amyloidosis. Report of six cases. *Am J Clin Pathol* 1982;77:745-8.
- Rao BK, Shore RM, Lieberman LM, et al. Dual radiopharmaceutical imaging in congenital asplenia syndrome. *Radiology* 1982;145:805-10.
- Resende V, Petroianu A. Functions of the splenic remnant after subtotal splenectomy for treatment of severe splenic injuries. *Am J Surg* 2003;185:311-5.
- Ehrlich CP, Papanicolaou N, Treves S, et al. Splenic scintigraphy using Tc-99m-labeled heat-denatured red blood cells in pediatric patients: Concise communication. *J Nucl Med* 1982;23:209-13.
- Spencer RP, Bocobo GR, Sziklas JJ, et al. Splenic overload syndrome: possible relationship to a small spleen. *Int J Nucl Med Biol* 1984;11:291-3.
- Görg C, Eichkorn M, Zugmaier G. The small spleen: Sonographic patterns of functional hyposplenia or asplenia. *J Clin Ultrasound* 2003;31:152-5.
- Budke HL, Breitfeld PP, Neiman RS. Functional hyposplenism due to a primary epithelioid hemangioendothelioma of the spleen. *Arch Pathol Lab Med* 1995;119:755-7.
- Stone RW, McDaniel WR, Armstrong EM, et al. Acquired functional asplenia in sarcoidosis. *J Nat Med Assoc* 1985;77:930-6.
- Selby CD, Spratt VMA, Toghill PJ. Impaired splenic function in systemic amyloidosis. *Postgrad Med J* 1987;63:357-60.
- Abid N. Thrombocytosis in a patient with systemic lupus. *J Pak Med Assoc* 2013;63:1305-6.
- Aburano T, Katada R, Shuke N, et al. Discordant splenic uptake of Tc-99m colloid and Tc-99m denatured RBC in candidiasis-endocrinopathy syndrome. *Ann Nucl Med* 1997;11:335-8.
- Au WY, Ma SK, Wong KK. Hyposplenism after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematology* 2002;117:488.
- Childs JC, Adelizzi RA, Dabrow MB, et al. Splenic hypofunction in systemic lupus erythematosus. *J Am Osteopath Assoc* 1994;94:414-5.

- [31] Demetrapoulos GE, Tsokos GC, Levine AS. Recovery of splenic function after GVHD-associated functional asplenia. *Am J Hematol* 1982;12:77–80.
- [32] Dhawan VM, Spencer RP, Sziklas JJ. Reversible functional asplenia in chronic aggressive hepatitis. *J Nucl Med* 1979;20:34–6.
- [33] Diedrich J, Görg C, Eissele R, et al. Functional asplenia after severe varicella zoster-infection diagnosis by colour Doppler ultrasound [German]. *Z Gastroenterol* 2003;41:325–8.
- [34] Ferguson RP, Hoang GN. Transient functional hyposplenia and fever. *J Nucl Med* 1981;22:748–9.
- [35] Freeman HJ. Functional asplenia and microscopic (collagenous) colitis. *Can J Gastroenterol* 1996;10:443–6.
- [36] Germing U, Perings C, Steiner S, et al. Congenital asplenia detected in a 60 year old patient with septicemia. *Eur J Med Res* 1999;4:283–5.
- [37] Habibian MR, Abernathy EM. Splenomegaly with uniformly decreased splenic uptake of <sup>99m</sup>Tc-sulfur colloid: a new observation in childhood sarcoidosis. *J Nucl Med* 1974;15:45–6.
- [38] Hurd WW, Katholi RE. Acquired functional asplenia. Association with spontaneous rupture of the spleen and fatal spontaneous rupture of the liver in amyloidosis. *Arch Intern Med* 1980;140:844–5.
- [39] Jacobson IM, Isselbacher KJ. Amyloidosis and hyposplenism with leukocytosis and thrombocytosis. *Ann Intern Med* 1983;99:573.
- [40] Jacobson SJ, De Nardo GL. Splenosis demonstrated by splenic scan. *J Nucl Med* 1971;12:570–2.
- [41] Josph G, Rothenberg SP, Baum S. Transient functional asplenia in sickle cell C-disease. *Am J Med* 1973;55:720–2.
- [42] Kamdar N, Zanzi I, Kroop S, et al. Reversible functional asplenia in systemic lupus erythematosus. *Clin Nucl Med* 1991;16:760–2.
- [43] Kılıç M, Özdil M, Özdemir GN, et al. A one-year-old boy with thrombocytosis. *Turk Arch Ped* 2011;46:342–3.
- [44] Klepfish A, Halperin Y, Schattner A. Grave's disease and acquired hyposplenism. *Q J Med* 2010;103:195–7.
- [45] Larimer JH, Mendelson DS, Metz EN. Howell-Jolly bodies. A clue to splenic infarction. *Arch Intern Med* 1975;135:857–8.
- [46] Lee SH, Kim DH, Hwang HK, et al. Spleen Autotransplantation following laparoscopic distal pancreatectomy and cholecystectomy. *J Pancreas* 2015;16:299–302.
- [47] Leffler DA, Magallon JC, Goldar-Najafi A, et al. Pneumococcal septic shock in the setting of hyposplenic celiac disease. *Hosp Physician* 2006;42:21–5.
- [48] Levy-Lahad E, Steiner-Salz D, Berkman N, et al. Reversible functional asplenia and subcapsular liver hematoma—two distinctive manifestations of amyloidosis. *Klin Wochenschr* 1987;65:1104–7.
- [49] Moniot AL. Liver-spleen scintiscan in kala-azar: Case report. *J Nucl Med* 1975;16:1128–9.
- [50] Pavlotsky F, Mekhmandarov S, Mozes B. Functional hyposplenism in a patient with advanced breast cancer. *Isr J Med Sci* 1989;25:589–91.
- [51] Pearson HA, Scheibler GL, Spencer RP. Functional hyposplenia in cyanotic congenital heart disease. *Pediatrics* 1971;48:277–80.
- [52] Pines A, Kaplinsky N, Olchovsky D, et al. Hyposplenism in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1983;22:176–8.
- [53] Roth J, Brudler O, Henze E. Functional asplenia in malignant mastocytosis. *J Nucl Med* 1985;26:1149–52.
- [54] Santilli D, Govoni M, Prandini N, et al. Autosplenectomy and antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus: A pathogenetic relationship? *Semin Arthritis Rheum* 2003;33:125–33.
- [55] Santos N, Silva R, Rodrigues J, et al. Sjögren's syndrome and acquired splenic atrophy with septic shock: a case report. *J Med Case Rep* 2014;8:10.
- [56] Spencer RP, McPhedran P, Finch SC, et al. Persistent neutrophilic leukocytosis associated with idiopathic functional asplenia. *J Nucl Med* 1972;13:224–6.
- [57] Mohamed M. Functional hyposplenism diagnosed by blood film examination. *Blood* 2014;124:1997.
- [58] Spencer RP, Pearson HA. Splenic radiocolloid uptake in the presence of circulation Howell-Jolly bodies. *J Nucl Med* 1974;15:294–5.
- [59] Starzyk J, Kumorowicz-Kopiec M, Kowalczyk M, et al. Natural history of asplenia in APECED—patient report. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001;14:443–9.
- [60] Stein S, Duarte PS, Alavi A, et al. Multiple intraabdominal soft-tissue masses in a man awaiting liver transplantation: a case study and discussion. *Am J Clin Oncol* 2000;23:506–8.
- [61] Takayasu H, Ishimaru Y, Tahara K, et al. Splenic autotransplantation for a congested and enlarged wandering spleen with torsion: report of a case. *Surg Today* 2006;36:1094–7.
- [62] Wagman PG, Dworkin HJ. Splenic imaging in a patient with functional asplenia. *Clin Nucl Med* 1989;14:264–7.
- [63] Warrior I, Ravindranath Y. Splenic infarction and total functional asplenia in disseminated varicella. *J Pediatr* 1986;109:305–7.
- [64] Webster J, Williams BD, Smith AP, et al. Systemic lupus erythematosus presenting as pneumococcal septicaemia and septic arthritis. *Ann Rheum Dis* 1990;49:181–3.
- [65] William BM. Hyposplenism associating long-term asbestos exposure. *Rom J Intern Med* 2009;47:415–6.
- [66] Wollenberg B, Riera-Knorrenschild J, Neubauer A, et al. Functional hyposplenia after allogeneic bone marrow transplantation: a case report [German]. *Ultraschall Med* 2001;22:289–92.
- [67] Casper JT, Koethe S, Rodey GE, et al. A new method for studying splenic reticuloendothelial dysfunction in sickle cell disease patients and its clinical application: a brief report. *Blood* 1976;47:183–8.
- [68] Ferster A, Bujan W, Corazza F, et al. Bone marrow transplantation corrects the splenic reticuloendothelial dysfunction in sickle cell anemia. *Blood* 1993;81:1102–5.
- [69] Orda R, Barak J, Baron J, et al. Postsplenectomy splenic activity. *Ann Surg* 1981;194:771–4.
- [70] Vallés R, Rivero I, Morán D, et al. Spontaneous splenic hypofunction in systemic lupus erythematosus and primary Sjögren syndrome [Spanish]. *Medicina (B Aires)* 1993;53:397–400.
- [71] Oates E, Austin JM, Becker JL. Technetium-99m-Sulfur Colloid SPECT imaging in infants with suspected heterotaxy syndrome. *J Nucl Med* 1995;36:1368–71.
- [72] Corazza GR, Ginaldi L, Zoli G, et al. Howell-Jolly body counting as a measure of splenic function. A reassessment. *Clin Lab Haematol* 1990;12:269–75.
- [73] Robertson DA, Bullen AW, Hall R, et al. Blood film appearances in the hyposplenism of coeliac disease. *Br J Clin Pract* 1983;37:19–22.
- [74] Sills RH. Splenic function: physiology and splenic hypofunction. *Crit Rev Oncol Hematol* 1987;7:1–36.
- [75] Bain BJ, Fosbury E. Microangiopathic hemolytic anemia with hyposplenism. *Am J Hematol* 2009;84:242.
- [76] Trewby PN, Chipping PM, Palmer SJ, et al. Splenic atrophy in adult coeliac disease: is it reversible? *Gut* 1981;22:628–32.
- [77] Rogers ZR, Wang WC, Luo Z, et al. Biomarkers of splenic function in infants with sickle cell anemia: baseline data from the BABY HUG Trial. *Blood* 2011;117:2614–7.
- [78] Marques RG, Lucena SBSG, Caetano CER, et al. Blood clearance of Howell-Jolly bodies in an experimental autogenic splenic implant model. *Br J Surg* 2014;101:820–7.
- [79] Brandt CT, Maciel DT, Caneca OAF, et al. Autotransplant of spleen tissue in children with schistosomiasis: evaluation of splenic function after splenosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96(suppl): 117–22.
- [80] Araújo NC, Sampaio Gonçalves de Lucena SB, da Silveira Rioja S. Effect of rapamycin on spleen size in longstanding renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2014;46:1319–23.
- [81] Xu KY, Tao CL, Wang JH, et al. The effect of splenic arterial blood flow (SBF) on severity of hypersplenism and analysis of factors associated with SBF. *Hepatogastroenterology* 2010;57:1360–2.
- [82] Kalhs P, Panzer S, Kletter K, et al. Functional asplenia after bone marrow transplantation. A late complication related to extensive chronic graft-versus-host disease. *Ann Intern Med* 1988;109:461–4.

## 4 DISCUSSÃO

Este estudo teve como base a observação de que RTRs podem evoluir com redução do diâmetro longitudinal do baço (DLB), na fase tardia (> seis meses) do transplante (Tx). Como estados hipoesplênicos são fortemente associados a quadros infecciosos e neoplasias, eventos que concorrem para perda de enxertos e mortalidade elevada, neste grupo, esta investigação teve por objetivos verificar a ocorrência de hipoesplenismo funcional em RTRs, comparar métodos utilizados no diagnóstico do quadro, verificar a existência de associação do fenômeno com as drogas imunossupressoras utilizadas na manutenção da função do enxerto renal e estabelecer sua prevalência.

RTRs foram, inicialmente, submetidos à US-Doppler do baço e do enxerto renal e à pesquisa de corpúsculos de Howell-Jolly (HJ), em esfregaço do sangue periférico. O emprego de US-Doppler tomou por base a correlação entre as dimensões do baço medidas por US e seu volume medido por tomografia computadorizada (TC) helicoidal [125]. As variáveis aferidas foram: (i) o DLB e o comprimento do rim transplantado; (ii) as velocidades de pico sistólico (VPS) em artérias esplênica e renal do rim transplantado, e em artérias intraesplênicas e intra-renais do rim transplantado; (iii) os índices de resistência (IR) em artérias esplênica e renal do rim transplantado e em artérias intraesplênicas e intra-renais do rim transplantado, (iv) a média das pressões arteriais (mPA) aferidas em membro superior sem fistula arteriovenosa (FAV). A presença de HJ foi encontrada em 48.9% dos pacientes, resultado comparável ao relatado em indivíduos esplenectomizados [74]. Após a análise univariada, a presença de HJ foi associada à menor velocidade de pico sistólica (VPS) em artéria intraesplênica, à pressão arterial (PA) mais elevada, à maior idade, a IR mais elevado em artéria intra-renal e ao sexo masculino. Após a análise multivariada, em que HJ foi definido como variável dependente, apenas a menor VPS em artéria intraesplênica e a PA mais elevada foram confirmadas como fatores associados à presença de HJ.

A presença de HJ no sangue periférico fora, anteriormente, registrada em dois casos de transplante renal: no primeiro, o paciente era portador de amiloidose, causa estabelecida de hipoesplenismo, e a presença HJ já havia sido identificada na fase pré-transplante [10]. No segundo, o quadro de hipoesplenismo funcional, identificado pela presença de HJ e por redução na captação de radiocolóide na cintilografia hepato-esplênica, pode ter sido secundário ao quadro de varicela que o paciente desenvolveu no pós-transplante [9].

Conforme os conceitos básicos de Anatomia e Fisiologia, o fluxo sanguíneo intraesplênico é, fisiologicamente, reduzido na zona marginal, de modo a que aí ocorra a filtração e a remoção de detritos celulares e de patógenos. Em caso de aumento do número de hemácias senescentes nesta zona, o fluxo sanguíneo, advoga-se, poderia estar mais acentuadamente reduzido na região, na tentativa de removê-las [97], o que explicaria, a nosso ver, a associação entre menor VPS intraesplênica e HJ aqui encontrada. Por outro lado, na eventual substituição de tecido esplênico sadio por tecido de granulação ou por áreas de fibrose, poderia ocorrer aumento da resistência ao fluxo sanguíneo intraesplênico, o que também implicaria em menor VPS em artérias intraesplênicas. Achado semelhante ao por nós observado ao Doppler foi anteriormente visto em cintilografia em que se utilizou plaquetas marcadas com indium-111, em pacientes submetidos a transplante de células tronco (TMO) que desenvolveram doença enxerto *versus* hospedeiro (GVHD) e que apresentavam HJ no sangue periférico [5]. Quanto à associação entre HJ e PA mais elevada, ainda que pudesse não ser esperada, esplenectomia foi associada a agravamento da hipertensão em camundongos alimentados com dieta rica em gordura [126]. Como a frequência de dislipidemia é elevada entre os RTRs, explicada em parte pela dieta e em parte como efeito adverso tanto dos inibidores de calcineurina (IC) como do sirolimo (SRL) [127,128], optou-se por crer que a associação não seja espúria. Todavia, considera-se que mais estudos devam ser realizados para a confirmação do achado. Nesta fase da investigação, não conseguimos demonstrar associação entre o tamanho do baço, medido em seu diâmetro longitudinal, e a presença de HJ, o que poderia estar na dependência da menor severidade do quadro de disfunção esplênica, conforme anteriormente registrado [59,74,129,130,131].

Aspecto comum aos RTRs é o uso continuado de imunossupressores, que têm por objetivo evitar a rejeição do rim transplantado. Assim sendo, seria natural interrogar se alguma(s) droga(s) imunossupressora(s) seria(m) o fator predisponente para a ocorrência de hipoesplenismo em indivíduos transplantados de rim.

Redução do tamanho de órgãos, incluindo o baço, foi registrada em estudos experimentais com SRL em mamíferos [132,133,134,135], o que não ocorreu com o uso de IC [136,137,138,139]. A observação não foi, todavia, acompanhada de avaliação da função esplênica. Em relação à AZA, os resultados foram contraditórios [140,141,142] e dados com o uso de MMF não foram encontrados. Com base nessas informações, buscou-se determinar a associação entre tamanho do baço, presença de HJ e drogas imunossupressoras. Inicialmente, os pacientes foram agrupados e comparados, de acordo com as todas as diferentes combinações de drogas utilizadas em nosso Serviço: IC (CsA ou TAC) *v.* SRL,

independentemente de associação com antimetabólitos; MMF *v.* AZA, independentemente de associação com IC ou SRL; MMF combinado a IC *v.* MMF combinado a SRL; e AZA combinada a IC *v.* AZA combinada a SRL. Todos os pacientes estavam em uso de baixa dose de esteroide (5mg/dia). Com este desenho, a análise estatística produziu uma grande quantidade de dados sem significância, razão pela qual se optou por fazer apenas as comparações entre IC e SRL. Antimetabólitos (AZA e MMF) fizeram parte de ambos os esquemas, em distribuição similar. Após a avaliação do baço e do aloenxerto através de US-Doppler e a pesquisa de HJ, procedeu-se à subdivisão dos grupos ICs e SRL, de acordo com o resultado da pesquisa de HJ. Para garantir a semelhança entre os grupos, outras variáveis foram incluídas na análise estatística.

Na análise univariada, verificou-se que no grupo SRL o DLB era significativamente menor ( $90.09 \pm 13.02$  mm *v.*  $111.95 \pm 18.66$  mm,  $p < 0.001$ ), que o tempo de transplante era maior ( $3.576 \pm 1.594$  dias *v.*  $1.036 \pm 1.369$  dias,  $p < 0.001$ ), o colesterol sérico mais elevado ( $227.50 \pm 38.75$  mg/dL *v.*  $182.67 \pm 37.74$  mg/dL,  $p < 0.001$ ), assim como os triglicerídeos ( $194.23 \pm 79.88$  mg/dL *v.*  $148.70 \pm 55.54$  mg/dL,  $p = 0.003$ ) do que no grupo em uso de IC. Como o tempo de transplante fosse muito maior no grupo SRL, para evitar possível viés, pacientes com menor tempo de transplante foram gradualmente excluídos até que a variável fosse da mesma ordem, em ambos os grupos. Quando apenas indivíduos com tempo de transplante  $> 1.650$  dias foram incluídos na análise, a diferença desapareceu ( $4.014 \pm 1.248$  dias *v.*  $3.416 \pm 1.481$  dias,  $p = 0.180$ ), mas o tamanho do baço persistiu menor no grupo SRL ( $93.89 \pm 17.69$  mm *v.*  $106.83 \pm 19.12$  mm;  $p = 0.001$ ).

Modelo de análise multivariada foi, então, criado com as variáveis que preencheram critério para tanto: (i) idade ( $r = -0.326$ ;  $p = 0.001$ ); (ii) VPS em artéria intraesplênica ( $r = 0.242$ ;  $p = 0.015$ ); (iii) número de leucócitos ( $r = -0.290$ ;  $p = 0.003$ ); (iv) número de plaquetas ( $r = -0.215$ ;  $p = 0.029$ ); (v) e nível de hemoglobina ( $r = -0.131$ ;  $p = 0.189$ ). Como resultado, verificou-se que o uso de SRL, a idade e a VPS em artéria intraesplênica permaneceram como fatores independentes associados ao tamanho menor do baço. A notar que o tempo de transplante não emergiu como fator independente associado ao tamanho do baço, em concordância com a situação clínica real de que SRL foi inserido no esquema terapêutico quando os pacientes já estavam em fase avançada do transplante.

Como não foram observadas diferenças entre os grupos SRL e IC, em relação à presença de HJ, concluiu-se que a redução do tamanho do baço em RTRs pode estar relacionada ao uso de SRL, sem que haja, todavia, comprometimento da função esplênica. Justificativas para a redução do baço com o uso desta droga estariam na supressão da

neovascularização do órgão, mediada por regulação negativa, na inibição da proteína alvo da rapamicina, o que levaria à inibição da linfoproliferação, e ao incremento da apoptose em esplenócitos [132,133, 134]. Estudos em modelo animal demonstraram que a rapamicina foi capaz de reverter a esplenomegalia induzida pela proteína 2A de membrana, no linfoma de Burkitt [135] e de reduzir o tamanho do baço em ratos que apresentavam hipertensão portal [134]. Em ratos com fibrose pulmonar induzida por bleomicina, a redução no peso do baço foi usada como critério para indicar que a dose de rapamicina administrada aos animais atingira efeito imunossupressor [132]. Quanto aos IC, em estudos experimentais realizados em ratos e camundongos em uso de CsA, foi observada apenas redução no tamanho do timo e com doses da droga consideradas tóxicas para o tecido linfóide [136].

Níveis mais elevados de colesterol e de triglicerídeos no grupo SRL já haviam sido registrados na literatura [143], assim como de há muito se conhece a relação entre maior idade e redução do tamanho do baço [144].

O terceiro objetivo da investigação foi o de estabelecer o valor da US na avaliação de risco para hipoesplenismo, considerando que este não é, primariamente, um exame destinado a avaliar a função do baço. Os pacientes realizaram cintilografia hepato-esplênica cujo resultado foi definido como normal quando houve captação do radiocolóide pelo fígado e pelo baço na mesma intensidade ou como alterado, quando a captação do radiocolóide pelo baço foi menor do que pelo fígado. Os pacientes foram distribuídos segundo os quartis do DLB e, a seguir, cada um destes quartis foi subdividido de acordo com os resultados do exame hematológico e da cintilografia. Nos pacientes em quem estes dois exames foram normais, o DLB foi maior, em oposição aos pacientes que apresentaram alteração nos dois exames (Spearman= 0.40;  $p=0.003$ ). Quando houve divergência entre os resultados de HJ (positivo) e cintilografia (normal), foi observado que a ocorrência da alteração hematológica foi mais frequente nos pacientes que apresentavam menor DLB, o que, a nosso ver, sugere que a massa funcionante do baço (“massa crítica”) poderia ser, em tal condição, inferior à necessária para a remoção dos eritrócitos senescentes. Mais estudos nessa linha são, todavia, necessários.

As afirmações de que o estado hipoesplênico representa risco para a saúde [121], que hipoesplenismo funcional (HF) pode estar associado a efeito tóxico direto de algumas substâncias [1,17,67,76], de que o baço desempenha importante papel na maturação de células B de memória [81,82,83,84] e o atual incremento nos esforços para maior compreensão dos efeitos dos agentes imunossupressores sobre essa subpopulação de linfócitos [145,146] nos levaram a insistir na hipótese de que a ocorrência de HF, em RTRs, poderia ser atribuída não

apenas à ação continuada e/ou à dosagem das droga(s) imunossupressora(s) sobre o tecido esplênico, mas, também, sobre as células B.

A maturação e a proliferação de células B ocorrem nos órgãos linfóides secundários [81,82], podendo ser prejudicadas por fatores intrínsecos ou extrínsecos [1,121,147,148]. Assim sendo, RTRs anteriormente avaliados foram, aleatoriamente, selecionados para realizar a quantificação de células B no sangue periférico, por citometria de fluxo, de modo a se ampliar o número de observações sobre as funções do baço, em diferentes esquemas de imunossupressão. Linfócitos B e suas diferentes subpopulações foram identificados de acordo com a expressão do anticorpo marcador de célula B CD19, do anticorpo marcador de célula B de memória CD27 e das imunoglobulinas IgM e IgD. Células *naïve* (assim chamadas por não terem sido, ainda, expostas a antígenos), que não expressam CD27 (CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>); células B de memória da zona marginal, ou células *nonswitched*, que carregam a imunoglobulina M (CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>); células B de memória da polpa branca, ou *switched*, que carregam a imunoglobulina D (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>); e células B de memória CD27-duplamente negativas (CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>), que carecem da expressão de CD27 e IgD na superfície, foram quantificadas, em percentagem e número absoluto. Inicialmente, os valores obtidos foram registrados (em medianas e intervalos interquartis nos percentis 25 e 75) ao lado de valores atribuíveis a indivíduos saudáveis, segundo estudo anterior [12]. Em um primeiro momento, observou-se, em RTRs, redução no número absoluto de linfócitos B, com particular destaque para as subpopulações de células *naïve* e células de memória (*nonswitched e switched*), resultado que poderia ser dependente do efeito dos agentes imunossupressores sobre as células B.

Tabela 1 – Distribuição do subtipos de células B em indivíduos saudáveis e em RTRs\*

subtipos de linfócitos B	sadios**	RTRs
linfócitos b%	9.2	3.89
	7.2-11.2	1.94-5.20
<i>naïve</i> %	65.1	56.52
	58.0-72.1	35.57-80.27
<i>noswitched</i> %	15.2	2.47
	13.4-21.4	0.53-8.32
<i>switched</i> %	13.2	50.52
	9.2-18.9	27.92-66.40
memotardia%	3.3	30.12
	2.1-5.3	11.44-54.18
linfócitos b totais	199.00	41.0
	169.00-271.00	18-63
<i>naïve</i> totais	131.00	21.00
	112.00-169.00	5.00-43.00
<i>noswitched</i> totais	35.00	1.00
	22.00-54.00	0.00-3.00
<i>switched</i> totais	29.00	15.00
	18.00-40.00	5.00-36.00
memotardia totais	7.00	7.0
	4.00-13.00	3.0-23.0

Legenda: \*Valores expressos em mediana e intervalos interquartis, nos percentis 25 e 75;  
 Fonte:\*\*Compilado de Morbach 2010;271-9.

Em seguida, os pacientes foram divididos em quatro grupos, de acordo com as combinações de drogas em uso: micofenolato de mofetila-esteróide (MMF-ST) combinado a CsA; MMF-ST combinado a TAC; MMF-ST combinado SRL; e MMF-ST.

Subsequentemente, procedeu-se a comparação da distribuição dos diferentes subtipos de células B aos esquemas de imunossupressão.

Tabela 2 – Comparação de diferentes esquemas de imunossupressão com a distribuição de células B (ANOVA)

subtipos de células B	CsA-MMF	TAC-MMF	SRL-MMF	MMF	<i>p</i>
CD19 <sup>+</sup> %	3.29	4.67	3.60	2.40	.147
CD19 <sup>+</sup> /μl	30.52	65.76	56.27	29.07	.173
CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> %	42.95*	60.85	46.58	74.32*	.064
CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> /μl	15.58	40.31	26.14	24.77	.231
CD27 <sup>+</sup> %	42.57	34.23	47.29	43.89	.198
CD27 <sup>+</sup> /μl	12.57	21.96	23.77	10.69	.440
CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> %	4.80	6.61	6.35	3.47	.847
CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> /μl	0.61	3.31	2.31	0.68	.236
CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> %	62.99*	44.34	52.03	24.01*	.028
CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> /μl	18.99	31.79	31.40	4.98	.220
CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup> %	44.71	26.61	40.49	21.26	.098
CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup> /μl	12.46	21.22	22.43	3.02	.236
razão CD27 <sup>-</sup> /CD27 <sup>+</sup>	1.17	2.19	1.38	2.78	.138

Legenda: \* marca a diferença entre os grupos MMF combinado a esteróide *versus* CsA combinada a MMF e esteroide; *p* se refere à comparação entre os quatro grupos de pacientes.

Fonte: A Autora, 2017

Em indivíduos adultos, espera-se encontrar redução do número de células *naïve* e aumento do número de células de memória, considerado o tempo de exposição a antígenos de diversas naturezas [88,149,150]. No grupo estudado, o resultado apontou para tendência a aumento da razão entre células *naïve*/células de memória (CD27<sup>+</sup>), no grupo em uso de MMF-ST (ou seja, superior à esperada em condições de normalidade da função esplênica), quando comparada à observada no grupo MMF-ST-CsA (N= 2; média = 2.8 e 1.17, respectivamente). Assim como para ação significativamente negativa da combinação MMF-ST sobre a maturação e a proliferação de células B, consideradas a elevada proporção de células *naïve* e a redução na proporção de células B *switched* encontradas no grupo em uso desta combinação de drogas, quando comparado ao grupo MMF-ST-CsA (*p* = 0.028). Células B *naïve* que não são expostas a antígenos retornam à circulação, mas não nos parece ser esta a explicação para o achado, dado que transplantados estão permanentemente expostos à estimulação antigénica.

O aumento da razão células *naïve*/células de memória CD27<sup>+</sup> também se correlacionou negativamente com a percentagem de células B de memória duplamente-negativas (*r* = -0.525, *p* <0.001). Por outro lado, neste grupo de pacientes, a correlação negativa verificada

entre idade e percentagem de células de memória CD27<sup>+</sup> ( $r = -0.315$ ,  $p = 0.019$ ) foi achado diverso do que é registrado na literatura, sobretudo se considerada a idade dos pacientes incluídos na amostra (média =  $50.94 \pm 12.43$  anos). O conjunto dos resultados, a nosso ver, reforçam a hipótese de existência de distúrbio no processo de maturação e proliferação de células B, em transplantados de rim.

Uma vez que MMF fez parte dos quatro regimes terapêuticos comparados, a interpretação dos resultados, deve se concentrar, acreditamos, nos seguintes aspectos: na ação diferenciada dos imunossuppressores sobre células B; nas interações entre as drogas, em particular sobre o efeito de CsA, TAC e SRL sobre a cinética do ácido micofenólico (MPA), princípio ativo do MMF; nas doses das drogas; e no tempo de exposição ao MMF.

Com respeito à ação de drogas imunossupressoras sobre células B, sabe-se que, enquanto os inibidores da calcineurina (IC), como CsA e TAC, inibem, principalmente, a proliferação de células T, por atuar, seletivamente, bloqueando a transdução do sinal de ativação desencadeado pelo receptor de células T e a transcrição do genes de citocinas pró-inflamatórias, em particular a interleucina IL-2 [151,152], SRL é capaz de inibir as ações da proteína alvo da rapamicina (m-TOR) e a proliferação celular, assim como a ação de várias enzimas e do fator de crescimento, em linfócitos T, B e em células do músculo liso vascular [153]. Por outro lado, células T e B se mostram mais sensíveis à depleção de purinas e pirimidinas provocada pelo MMF: a depleção de nucleotídeos consequente à ação da droga leva à interrupção da síntese de DNA e à glicosilação de proteínas de membrana, interferindo no processo de adesão celular que impede, então, a sobrevivência de células T e B [154,155,156,157]. Em consonância com nossos resultados, no que diz respeito aos efeitos de MPA/MMF sobre as células imunes, foi observado que: (i) a adição de MPA bloqueou a expansão de células de memória, em co-culturas de células T e células B obtidas de doadores saudáveis e de indivíduos com artrite reumatóide [158]; (ii) houve recuperação da depleção de células B em criança submetida a transplante duplo fígado-rim imunossuprimida com TAC e MMF, quando este último foi retirado [159]; (iii) houve associação de MMF com percentagem significativamente maior de células B *naïve* e menor de plasmablastos em pacientes com lupus eritematoso sistêmico, em comparação ao tratamento com azatioprina [160]; (iv) houve redução significativa na contagem de linfócitos B 3 meses após o início de terapia com MMF, em receptores de transplante cardíaco [161].

A pesquisa básica comprovou, nas últimas décadas, que a integridade da função imunológica do baço exige correto equilíbrio do microambiente esplênico, o que é determinado por interações adequadas entre os diferentes grupos celulares que aí residem ou

transitam e os mecanismos moleculares que organizam esse trânsito, sobretudo os que envolvem quimiocinas, fator de necrose tumoral, integrinas, fosfolipídeos e moléculas de adesão [162]. Em modelo animal, estudo de mecanismos de ação do MPA demonstrou que o tratamento *ex vivo* de esplenócitos de camundongos MRL-lpr/lpr com a droga levou à redução da secreção de quimiocinas e da produção de autoanticorpos. Em modelo de aloenxerto de rim, em ratos, o tratamento com MMF reduziu a expressão de uma variedade de quimiocinas. Em humanos saudáveis e em portadores de artrite reumatóide, MPA inibiu a expressão de uma série de quimiocinas, mais especificamente IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-21, e bloqueou a expansão de células de memória, assim como impediu a diferenciação de células plasmáticas e a produção de anticorpos [163]. Assim sendo, a nosso ver, os resultados obtidos refletem as anormalidades celulares e moleculares descritas com MPA/MMF sobre o tecido esplênico e as células B.

Com relação aos efeitos de CsA, TAC e SRL na cinética do MPA, demonstrou-se que indivíduos que receberam TAC ou SRL combinados a MMF apresentaram níveis plasmáticos de MPA mais elevados (aproximadamente 30-40%) do que os que receberam CsA-MMF [164,165,166,167]. A explicação para o achado está no fato de que a secreção biliar do glucoronídeo do ácido micofenólico (MPAG) é inibida pela ação da ciclosporina sobre o transportador de proteína 2 presente na membrana dos hepatócitos, o que leva à redução da circulação entero-hepática do MPAG, com consequente menor exposição ao MPA. Por esta razão, se a dose de CsA é reduzida ou sua administração é interrompida, as concentrações de MPA podem aumentar em 50-100% [168,169].

Em nossa série, os pacientes receberam MMF em diferentes doses: em combinação com CsA-ST (100-250 ng/mL), a dose diária de MMF variou de 11 a 32mg/Kg/dia (média 17.24mg/Kg/dia); com TAC-ST (8-10 ng/mL), de 10 a 34mg/Kg (média = 20.74mg/Kg/dia); e com SRL-ST (6-12 ng/mL), de 6 a 26mg/Kg (média = 14.36mg/Kg/dia). Quando combinado apenas com ST, a dose diária de MMF variou de 13 a 37mg (média = 23.83mg/Kg/dia), a maior registrada. Doses elevadas de MMF, em combinação com TAC ou não, induziram estresse oxidativo e genotoxicidade no baço de ratos Wistar [185]. Esses aspectos não foram aqui investigados, mas consideramos que não seria totalmente impróprio pensar que as elevadas percentagens de HJ que encontramos podem refletir, pelo menos em parte, a possibilidade de neoplasia neste grupo de indivíduos.

A comparação entre subpopulações de células B com HJ, cintilografia e US mostrou que a redução no “*pool*” de células B CD27<sup>+</sup> foi associada à presença de HJ ( $p = 0.05$ ) e forte tendência para redução de células B *switched* ( $p = 0.057$ ) e de células de memória duplamente-

negativas ( $p = 0.052$ ), quando os pacientes apresentaram a combinação HJ positivo-DLB reduzido, resultados que, a nosso ver, sugerem a existência de desarranjo na zona marginal e na polpa branca do baço de RTRs.

Quanto ao tempo de exposição às drogas imunossupressoras, o maior foi observado no grupo MMF-ST (média 4765 dias,  $p < 0.001$ ), razão pela qual acreditamos que o desarranjo no processo de maturação e proliferação celular observado no estudo pode estar na dependência não só de dose elevada de MMF, mas, também, no tempo prolongado de exposição às drogas, ou seja, ao que se convencionou chamar de “imunossupressão cumulativa”.

A prevalência de hipoesplenismo funcional, diagnosticado com base na presença de HJ, foi estimada em 30%; em 29.09%, se identificados HJ presente e hipocaptção do radiocolóide na cintilografia; e em 14.55%, quando observadas, em conjunto, as funções fagocítica e imunológica do baço, expressas pela combinação HJ presente-redução de células B *switched*-redução do DLB.

## CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados obtidos no estudo permitiu: (i) confirmar a existência de hipoesplenismo funcional em fase tardia do transplante renal; (ii) verificar o comprometimento de todas as funções do baço, representado pela presença de corpúsculos de Howell-Jolly (HJ), pela redução na captação de radiocolóide na cintilografia hepato-esplênica, pela redução do diâmetro do baço e da VPS em artéria intraesplênica, na US-Doppler, e pela redução do *pool* de células B de memória, de células B *switched* e de células B duplamente negativas; (iii) comparar os resultados obtidos entre métodos usados no diagnóstico de hipoesplenismo e estabelecer um modelo em que a redução do DLB auxilie na interpretação dos resultados, quando houver divergência entre a pesquisa de HJ (presente) e cintilografia (normal); (iv) estabelecer a prevalência do quadro de hipoesplenismo em RTRs em 30%, se tomada como referência a função fagocítica do órgão, expressa pela presença de HJ; em 29.09%, se considerada a combinação HJ presente-cintilografia alterada; ou em 14.55%, se tomada como referência o conjunto das funções fagocítica e imunológica, expressas pela combinação HJ presente-redução de células B *switched* e de células B duplamente-negativas-redução do DLB. A investigação mostrou redução do volume do baço, em humanos, com o uso de rapamicina, sem que se observasse disfunção esplênica. A associação de um dos esquemas de imunossupressão utilizados na prática clínica (MMF-ST) com redução de células B *switched*, que secretam anticorpos de alta afinidade capazes de reconhecer patógenos previamente encontrados e, assim, proteger o hospedeiro de re-infecções, aspecto crucial para a sobrevivência dos enxertos e dos pacientes, nos leva a recomendar que RTRs sejam, periodicamente, avaliados com US abdominal total e que, diante de achado incidental de baço menor do que o tamanho normal, sejam encaminhados a realizar testes confirmatórios da existência de disfunção esplênica. Assim fazendo, acreditamos, pode-se aumentar a possibilidade de distinguir pacientes com risco de anormalidades no compartimento das células B e de apurar o uso de drogas imunossupressoras, no sentido de alcançar melhores resultados no transplante de rim.

### Limitações do estudo

Este é um estudo observacional, realizado em um único centro e com número reduzido de participantes. Como não há consenso sobre quais parâmetros ou valores farmacocinéticos estão especificamente relacionados a eventos adversos relacionados ao MMF, o monitoramento terapêutico do medicamento não é realizado em nosso Serviço, limitação que é, também, comum a outros centros transplantadores. No entanto, tal prática pode ser útil, pelo menos para pacientes em quem o uso da ciclosporina é descontinuado.

### Pontos fortes do estudo

A comprovação, pela primeira vez na literatura, da ocorrência de hipoesplenismo funcional em série de RTRs. A comprovação, pela primeira vez, de redução do tamanho do baço associado ao uso de rapamicina, em seres humanos, sem comprometimento da função esplênica. E, ao que sabemos, também é a primeira vez que se documenta a redução de células de memória B *switched*, em RTRs.

## REFERÊNCIAS

1. William BM, Thawani N, Sae-Tia S *et al.* Hyposplenism: a comprehensive review. Part II: clinical manifestations, diagnosis, and management. *Hematology* 2007 Apr; 12(2):89–98.
2. Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 1998 Jun; 338(24):1741-51.
3. United Network for Organ Sharing (UNOS database). Disponível em <http://www.unos.org> (2011). 2011.
4. Knecht H, Jost R, Gmür J *et al.* Functional hyposplenism after allogeneic bone marrow transplantation is detected by epinephrine stimulation test and splenic ultrasonography. *Eur J Haematol* 1988 Oct; 41(4):382-7.
5. Kalhs P, Panzer S, Kletter K *et al.* Functional asplenia after bone marrow transplantation. A late complication related to extensive chronic graft-versus-host disease. *Ann Intern Med* 1988 Sep 15; 109(6):461-4.
6. Cuthbert RJ, Iqbal A, Gates A *et al.* Functional hyposplenism following allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Pathol* 1995 Mar; 48(3):257–9.
7. Picardi M, Selleri C, Rotoli B. Spleen sizing by ultrasound scan and risk of pneumococcal infection in patients with chronic GVHD: preliminary observations. *Bone Marrow Transplant* 1999 Jul; 24(2):173–177.
8. Elias M, Bisharat N, Goldstein LH *et al.* Pneumococcal sepsis due functional hyposplenism in a bone marrow transplant patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004 Mar; 23(3):212-4.
9. Hicks RJ, Young W, Shapiro B *et al.* Absent splenic uptake of indium-111-oxine-labeled autologous leukocytes in functional asplenia. *J Nucl Med* 1991 Mar; 32(3):524-6.
10. Bilwani F, Adil SN, Kakepoto GN *et al.* Impaired splenic function in systemic amyloidosis: diagnostic importance of peripheral blood film. *J Pak Med Assoc* 2001 Oct; 51(10):360-2.
11. Pearson HA, Spencer RP, Cornelius EA. Functional asplenia in sickle-cell anemia. *N Engl J Med* 1969 Oct 23; 281(17):923-6.
12. Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG *et al.* Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol* 2010 Nov; 162(2):271-9.

13. Groom AC, Schmidt, EE, MacDonald IC. Microcirculatory pathways and blood flow in spleen: new insights from washout kinetics, corrosion casts, and quantitative intravital videomicroscopy. *Scanning Microsc* 1991 Mar; 5(1):159–73.
14. MacDonald IC, Ragan DM, Schmidt EE *et al.* Kinetics of red blood cell passage through interendothelial slits into venous sinuses in rat spleen, analyzed by *in vivo* microscopy. *Microvasc Res* 1987 Jan; 33(1):118–34.
15. Bratosin D, Mazurier J, Tissier JP *et al.* Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* 1998 Feb; 80(2):173–95.
16. Flo TH, Smith KD, Sato S *et al.* Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 2004 Dec 16; 432(7019):917–21.
17. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 2005 Aug; 5(8):606–16.
18. Cyster JG, Goodnow CC. *Pertussis* toxin inhibits migration of B and T lymphocytes into splenic white pulp cords. *J. Exp. Med* 1995 Aug 1; 182(2):581–6.
19. Kang Y, Kim JY, Bruening SA *et al.* The C-type lectin SIGN-R1 mediates uptake of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* in the marginal zone of mouse spleen. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 Jan 6; 101(1):215–20.
20. Kang, YS, Yamazaki S, Yioda T. SIGN-R1, a novel C-type lectin expressed by marginal zone macrophages in spleen, mediates uptake of the polysaccharide dextran. *Int. Immunol* 2003 Feb 15(2):177–86.
21. Geijtenbeek TB, Groot PC, Nolte MA *et al.* Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens *in vivo*. *Blood* 2002 Oct 15; 100(8):2908–16.
22. Elomaa O, Kangas M, Sahlberg C. Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. *Cell* 1995 Feb 24; 80(4):603–9.
23. Lanoue A, Clatworthy MR, Smith P. SIGN-R1 contributes to protection against lethal pneumococcal infection in mice. *J. Exp. Med* 2004 Dec 6; 200(11):1383–93.
24. Marzi A, Gramberg T, Simmons T. DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* 2004 Nov 78(21): 12090–5.
25. Munday J, Floyd H, Crocker PR. Sialic acid binding receptors (siglecs) expressed by macrophages. *J Leukoc Biol* 1999 Nov; 66(5):705–11.
26. Jones C, Virji M, Crocker PR. Recognition of sialylated meningococcal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to enhanced bacterial uptake. *Mol Microbiol* 2003 Sep; 49(5):1213–25.

27. Eloranta ML, Alm GV. Splenic marginal metallophilic macrophages and marginal zone macrophages are the major interferon- $\alpha/\beta$  producers in mice upon intravenous challenge with herpes simplex virus. *Scand J Immunol* 1999 Apr; 49(4): 391–4.
28. Yu P, Wang Y, Chin RK *et al.* B cells control the migration of a subset of dendritic cells into B cell follicles via CXC chemokine ligand 13 in a lymphotoxin-dependent fashion. *J Immunol* 2002 May 15; 168(10):5117-23.
29. Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2002 May; 2(5):323-35.
30. Nolte MA, Arens R, Kraus M *et al.* B cells are crucial for both development and maintenance of the splenic marginal zone. *J Immunol* 2004 Mar 15; 172(6):3620-7.
31. Crowley MT, Reilly CR, Lo D. Influence of lymphocytes on the presence and organization of dendritic cell subsets in the spleen. *J Immunol* 1999 Nov 1; 163(9):4894-900.
32. Ato M, Nakano H, Kakiuchi T *et al.* Localization of marginal zone macrophages is regulated by C-C chemokine ligands 21/19. *J Immunol* 2004 Oct 15; 173(8):4815-20.
33. Karlsson MC, Guinamard R, Bolland S *et al.* Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone *J Exp Med* 2003 Jul 21; 198(2):333-40.
34. Cinamon G, Matlooubian M, Lesneski MJ *et al.* Sphingosine 1-phosphate receptor promotes B cell localization in the marginal zone. *Nat Immunol* 2004 Jul; 5(7):713-20.
35. Lu TT, Cyster JG. Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone. *Science* 2002 Jul 19; 297(5580):409-12.
36. Lopes-Carvalho T, Kearney JF. Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol Rev* 2004 Feb; 197:192–205.
37. Attanavanich K, Kearney JF. Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *J Immunol* 2004 Jan 15; 172(2):803-11.
38. Ato M, Stager S, Engwerda CR. *et al.* Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nature Immunol* 2002 Dec; 3(12):1185–91.
39. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL *et al.* A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 2000 Jul 20; 406(6793):309-14.
40. Gunn MD *et al.* Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J. Exp. Med* 1999 Feb 1; 189(3):451–60.

41. Förster R *et al.* CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999 Oct 1; 99:23–33.
42. Ngo VN, Korner H, Gunn MD *et al.* Lymphotoxin  $\alpha/\beta$  and tumour necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen. *J Exp Med* 1999 Jan 18; 189(2):403-12.
43. Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT *et al.* A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med* 2001 Jul 2; 194(1):45-56.
44. Garcia de Vinuesa C, Gulbranson-Judge A, Khan M *et al.* Dendritic cells associated with plasmablast survival. *Eu J Immunol* 1999 Nov 29(11):3712-21.
45. Sze DM, Toelner KM, Garcia de Vinuesa C *et al.* Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. *J Exp Med* 2000 Sep 18; 192(6):813-2.
46. Patrick CW, Ash R, Libnoch JA *et al.* Clinical cytometry and immunophenotyping. I. Flow cytometric analysis of normal peripheral blood and bone marrow. *Pathol Immunopathol Res* 1987; 6(1):64-76.
47. Stelzer GT, Robinson JP. Flow cytometric evaluation of leucocyte function. *Diagn Clin Immunol* 1988; 5(5):223-31.
48. Chen X, Hasan M, Libri V *et al.* Automated flow cytometric analysis across large numbers of samples and cell types. *Clin Immunol* 2015 Apr; 157(2):249-60.
49. Spencer RP, Gupta SM. The spleen: diagnosis of splenic diseases using radiolabeled tracers. *Crit Rev Lab Sci* 1989; 27:299-318.
50. Pearson HA, Spencer RP, Cornelius EA. Functional asplenia in sickle-cell anemia. *N Engl J Med* 1969 Oct 23; 281(17):923-6.
51. Spencer RP, Pearson HA, Binder HJ. Identification of cases of “acquired” functional asplenia *J Nucl Med* 1970 Dec; 11(120):763-6.
52. Dillon AM, Stein HB, English RA. Splenic atrophy in systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 1982 Jan; 96(1):40–3.
53. Winkel K, Kluge A. Scintigraphy and the function test of the spleen with altered erythrocytes. *Nucl Med* 1963; 2 Suppl 1:239-48.
54. Peters AM, Ryan PFJ, Klonizakis I *et al.* Measurement of splenic function in humans using heat damaged autologous red blood cells. *Scand J Haematol* 1981 Nov; 27(5):374-80.
55. Taplin GV, Johnson DE, Dore EK *et al.* Suspension of radioalbumin aggregates for photoscanning the liver, spleen, lung and other organs. *J Nucl Med* 1964 Apr; 5:259-75.

56. Méchaly P, Desgrez A, Kellershorn C. Extrahepatic fixation of colloids observed in scintigraphy. I. Frequency, clinical and experimental study. *J Reticuloendothel Soc* 1965 Jul; 2(2):105-22.
57. Sears DA, Udden MM. Howell-Jolly bodies: a brief historical review. *Am J Med Sci* 2012 May; 343(5):407-9.
58. Hutchison HE, Ferguson-Smith MA. The significance of Howell-Jolly bodies in red cell precursors. *J Clin Pathol* 1959 Sep; 12:451-3.
59. Robertson DA, Bullen AW, Hall R *et al.* Blood film appearances in the hyposplenism of coeliac disease. *Br J Clin Pract* 1983 Jan; 37(1):19-22.
60. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the prevention and treatment of infection in patients with an absent or dysfunctional spleen. *BMJ*. 1996; 312:430-4.
61. Sills RH. Splenic function: physiology and splenic hypofunction. *Crit Rev Oncol Hematol* 1987; 7(1):1-36.
62. Corazza GR, Gianaldi L, Zoli G *et al.* Howell-Jolly body counting as a measure of splenic function. A reassessment. *Clin Lab Haematol* 1990; 12(3):269-75.
63. Dhawan V, Spencer RP, Pearson HA *et al.* Functional asplenia in the absence of circulating Howell-Jolly bodies. *Clin Nucl Med* 1977; 2:395-6.
64. Harrod VL, Howard TA, Zimmerman AS *et al.* Quantitative analysis of Howell-Jolly bodies in children with sickle cell disease. *Exp Hematol* 2007 Feb; 35(2):179-83.
65. Holroyde CP, Gardner FH. Acquisition of autophagic vacuoles by human erythrocytes. Physiological role of the spleen. *Blood* 1970; 36:566-75.
66. Holroyde CP, Oski FA, Gardner FH. The "pocked" erythrocyte. Red-cell surface alterations in reticuloendothelial immaturity of the neonate. *N Engl J Med* 1989; 281:516-20.
67. Doll DC, List AF, Yarbrow JW. Functional hyposplenism. *South Med J* 1987 Aug; 80(8):999-1006.
68. Rogers DW, Serjeant BE, Serjeant GR. Early rise in the "pitted" red cell count as a guide to susceptibility to infection in childhood sickle cell anaemia. *Arch Dis Child* 1982 May; 57(5):338-42.
69. Fatunde OJ, Scott RB. Pitted red cell counts in sickle cell disease. Relationship to age, hemoglobin genotype, and splenic size. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1986 Winter; 8(4):329-33.
70. Buchanan GR, Holtkamp CA. Pocket erythrocyte counts in patients with hereditary spherocytosis before and after splenectomy. *Am J Hematol* 1987 Jul; 25(3):253-7.

71. Casper JT, Koethe S, Rodey GE *et al.* A new method for studying splenic reticuloendothelial dysfunction in sickle cell disease patients and its clinical application: a brief report. *Blood* 1976 Feb; 47(2):183-8.
72. Rogers ZR, Wang WC, Luo Z *et al.* Biomarkers of splenic function in infants with sickle cell anemia: baseline data from the BABY HUG Trial. *Blood*. 2011 Mar 3;117(9):2614-7.
73. Rutland MD. Correlation of splenic function with the splenic uptake rate of Tc-colloids. *Nucl Med Commun* 1992 Nov; 13(11):843-7.
74. Lammers AJ, de Porto AP, Bennink RJ, *et al.* Hyposplenism: comparison of different methods for determining splenic function. *Am J Hematol* 2012 May; 87(5):484-9.
75. de Porto AP, Lammers AJ, Bennink RJ *et al.* Assessment of splenic function. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010 Dec; 29(12):1465-73.
76. Kirkineska L, Perifanis V, Vasiliadis T. Functional hyposplenism. *Hippokratia* 2014 Jan; 18(1):7-11.
77. Wollenberg B, Riera-Knorrenschild J, Neubauer A *et al.* Functional hyposplenism after allogeneic bone marrow transplantation: a case report. *Ultraschall Med* 2001 Dec; 22(6):289-92.
78. Gotthardt M, Broker S, Schlieck A *et al.* Scintigraphy with <sup>99m</sup>Tc-labeled heat-altered erythrocytes in diagnosing hyposplenism: prospective comparison to <sup>99m</sup>Tc-labeled colloids and colour-coded duplex ultrasonography. *Nuklearmedizin* 2007 46(4): 135-40.
79. Dittrich M, Milde S, Dinkel E *et al.* Sonographic biometry of liver and spleen size in childhood. *Pediatr Radiol* 1983; 13(4):206-11.
80. McCarville MB, Luo Z, Huang X, *et al.* Abdominal ultrasound with scintigraphic and clinical correlates in infants with sickle cell anemia: baseline data from the BABY HUG Trial. *AJR Am J Roentgenol* 2011 Jun; 196(6):1399-404.
81. Chung JB, Silverman M, Monroe JG. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol* 2003 Jun; 24(6):343-9.
82. Carsetti R, Rosado MM, Wardemann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 2004 Feb; 197:179-91.
83. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008 Sep 1; 112(5):1570-80.
84. Martinez-Gamboa L, Mei H, Loddenkiemper C *et al.* Role of the spleen in peripheral memory B-cell homeostasis in patients with autoimmune thrombocytopenia purpura. *Clin Immunol* 2009 Feb; 130(2):199-212.
85. Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M<sup>+</sup>D<sup>+</sup> peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region

- genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 1998 Nov 2; 188(9):1679-89.
86. L'age-Stehr J, Herzenberg LA. Immunological memory in mice..I.Physical separation and partial characterization of memory cells for different immunoglobulin classes from each other and from antibody-producing cells. *J Exp Med* 1970 Jun 1; 131(6):1093-108.
  87. Agematsu K. Molecules involved in characteristics of naïve/memory B cells. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2004 Oct; 27(5):309-14.
  88. Carsetti R, Rosado MM, Wardemann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 2004 Feb; 197: 179-91.
  89. Sanz I, Wei C, Lee FH *et al.* Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Semin Immunol* 2008 Feb; 20(1):67-82.
  90. Fecteau JF, Côté G, Néron S. A new memory CD27<sup>-</sup>Ig<sup>+</sup> B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J Immunol* 2006 Sep 15; 177(6):3728-36.
  91. Wei C, Anolik J, Cappione A *et al.* A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2007 May 15; 178(10):6624-33.
  92. Kaminski DA, Wei C, Rosenberg AF *et al.* Advances in human B cell phenotypic profiling. *Front Immunol* 2012 Oct 10; 3:302.
  93. San Segundo D, Ballesteros MA, Mons R *et al.* Study of B-cell subpopulations in lung transplant recipients with posttransplant infection. *Transpl Proc* 2012 Nov; 44(9):2676-8.
  94. van de Berg PJ, Hoevenaars EC, Yong SL *et al.* Circulating lymphocyte subsets in different clinical situations after renal transplant. *Immunology* 2012 Jun; 136:2:198-207.
  95. Lanio N, Sarmiento E, Gallego A *et al.* Alterations of naïve and memory B-cell subsets are associated with risk of rejection and infection in heart recipients. *Transpl Int* 2013 Aug; 26(8):800-12.
  96. Podgorny PJ, Liu Y, Dharmani-Khan P *et al.* Immune cell subset counts associated with graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014 Apr; 20(4):450-62.
  97. Morris DH, Bullock FD. The importance of the spleen in resistance to infection. *Ann Surg* 1919 Nov; 70(5):513-21.
  98. King H, Shumacker HB Jr. Splenic studies. I. Susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. *Ann Surg* 1952 Aug; 136(2):239-42.
  99. Dameshek W. Changing concepts regarding splenectomy. *Harofe Haivri Heb Med J.* 1957; 2:188-95.

100. Halbertsma FJ, Neeleman C, Weemaes CM *et al.* The absent and vanishing spleen: congenital asplenia and hyposplenism-two case reports. *Acta Paediatr* 2005 Mar; 94(3):369-71.
101. HersHKovitz E, Rozin I, Limony Y *et al.* Hypoparathyroidism, retardation, and dysmorphism syndrome: impaired early growth and increased susceptibility to severe infections due to hyposplenism and impaired polymorphonuclear cell functions. *Pediatr Res* 2007 Oct; 62(4):505-9.
102. Angelski CL, McKay E, Blackie B. A case of functional asplenia and pneumococcal sepsis. *Pediatr Emerg Care* 2011 Jul; 27(7):639-41.
103. Pollak U, Bar-Sever Z, Hoffer V, Marcus N, Scheuerman O, Garty BZ. Asplenia and functional hyposplenism in autoimmune polyglandular syndrome type 1. *Eur J Pediatr* 2009 Feb; 168(2):233-5.
104. Ward KM, Celebi JT, Gmyrek R *et al.* Acute infectious *purpura fulminans* associated with asplenia or hyposplenism. *J Am Acad Dermatol* 2002 Oct; 47(4):493-6.
105. Suzuki K, Ino K, Mizutani M *et al.* Multiple myeloma accompanying splenic amyloidosis and overwhelming pneumococemia. *Rinsho Ketsueki* 2007 Nov; 48(11):1503-7.
106. Peppas D, Sutton JK, Bin-Reza F, Morris-Jones SD, Miller RF. Focal Salmonella enteritidis infection in a patient with HIV infection and other multiple causes of immunodeficiency. *Int J STD AIDS* 2008 Jul; 19(7):491-2.
107. Schimmelpenninck CA, Henkens IR, Duchateau CS, van Buren M. Austrian syndrome: a patient with meningitis, pneumonia and endocarditis. *Ned Tijdschr Geneesk* 2010; 154:A1480.
108. Williams BM. Hyposplenism associating long-term asbestos exposure. *Rom J Intern Med* 2009; 47(4):415-6.
109. Foster PN, Losowsky MS. Hyposplenism-a review. *J R Coll Physicians Lond* 1987; 21:188-91.
110. Fish JC, Beathard G, Sarles HE *et al.* Circulating lymphocyte depletion: Effect on lymphoid tissue. *Surgery* 1970; 67:658-66.
111. Palmer KR, Barber DC, Sherriff SB *et al.* Reticuloendothelial function in coeliac disease and ulcerative colitis. *Gut* 1983; 24:384-8.
112. Wardrop CA, Dagg JH, Lee FD *et al.* Immunological abnormalities in splenic atrophy. *Lancet* 1975; 2:4-7.
113. Lewis D, Haridy J, Newnham ED. Testint for celiac disease. *Aust Prescr* 2017 Jun; 40(3):105-108.

114. Sarna VK, Skodje GI, Reims HM *et al.* HLA-DQ: gluten tetramer test in blood gives better detection of coeliac patients than biopsy after 14-day gluten challenge. *Gut* 2017 Aug 4 [Epub ahead of print].
115. Corazza GR, Frisoni M, Vaira D *et al.* Effect of gluten-free diet on splenic hypofunction of adult coeliac disease. *Gut* 1983; 24:228-30.
116. Halfdanarson TR, Litzow MR, Murray JA. Hematologic manifestations of celiac disease. *Blood* 2007 Jan 15; 109(2):412-21.
117. Di Sabatino A, Brunetti L, Carnevale Maffè G *et al.* Is it worth investigating splenic function in patients with celiac disease? *World J Gastroenterol* 2013 Apr 21; 19(15):2313-8.
118. Garnett ES, Goddard BA, Markby D *et al.* The spleen as an arteriovenous shunt. *Lancet* 1969; 1:386-8.
119. Spierer Z, Weisman Y, Zakuth V, Fridkin M, Bogair N. Decreased serum tuftsin concentrations in sickle cell disease. *Arch Dis Child* 1980; 55:566-7.
120. Raghupathy R, Haider MZ, Azizieh F *et al.* Th1 and Th2 cytokine profiles in sickle cell disease. *Acta Haematol* 2000; 103:197-202.
121. Di Sabatino A, Carsetti R, Corazza GR. Post-esplenectomy and hyposplenic states. *Lancet* 2011 Jul 2; 378(9785):86-97.
122. Beytout J, Tournilhac O, Laurichesse H. Asplenia and hyposplenism. *Presse Med* 2003 Sep 6; 32(28 Suppl):S5-9.
123. Knecht H, Jost R, Gmür J *et al.* Functional hyposplenic after allogenic bone marrow transplantation is detected by epinephrine stimulation test and splenic ultrasonography. *Eu J Haematol* 1988 Oct; 41(4):382-7.
124. Elias M, Bisharat N, Goldstein LH *et al.* Pneumococcal sepsis due functional hyposplenism in a bone marrow transplant patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004 Mar; 23(3):212-4.
125. Lamb PM, Lund A, Kanagasabay RR *et al.* Spleen size: how well do linear ultrasound measurements correlate with threedimensional CT volume assessments? *Br J Radiol* 2002; 75:573-577.
126. Gotoh K, Inoue M, Masaki T *et al.* Obesity-related chronic kidney disease is associated with spleen-derived IL-10 [epub ahead of print]. *Nephrol Dial Transplant* Accessed Dec 9, 2012.
127. Bamgbola O. Metabolic consequences of modern immunosuppressive agents in solid organ transplantation. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2016 Jun; 7(3):110-27.

128. Zimmermann A, Zobeley C, Weber MM. Changes in lipid and carbohydrate metabolism under mTOR and calcineurin-based immunosuppressive regimen in adult patients after liver transplantation. *Eur J Intern Med.* 2016 Apr; 29:104-9.
129. Marsh GW, Stewart JS. Splenic function in adult coeliac disease. *Br J Haematol* 1970 Oct; 19(4):445-7.
130. Al-Jam'a AH, Al-Dabbous IA, Chirala SK *et al.* Splenic function in sickle cell anemia patients in Qatif, Saudi Arabia. *Am J Hematol* 2000 Feb; 63(2):68-73.
131. Boozari B, Gebel M, Bahr MJ *et al.* Changes of duplex parameters and splenic size in liver transplant recipients during a long period of observation. *World J Gastroenterol* 2005 Nov 21; 11(43):6787-91.
132. Simler NR, Howell DC, Marshall RP *et al.* The rapamycin analogue SDZ RAD attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Eur Respir J* 2002 Jun; 19(6):1124-7.
133. Lui SL, Tsang R, Chan KW *et al.* Rapamycin attenuates the severity of established nephritis in lupus-prone NZB/W F1 mice. *Nephrol Dial Transplant* 2008 Sep; 23(9):2768-76.
134. Mejias M, Garcia-Pras E, Gallego J *et al.* Relevance of the m-TOR signaling pathway in the pathophysiology of splenomegaly in rats with chronic portal hypertension. *J Hepatol* 2010 Apr; 52(4):529-39.
135. Cen O, Longnecker R. Rapamycin reverses splenomegaly and inhibits tumor development in a transgenic model of Epstein-Barr virus-related Burkitt's lymphoma. *Mol Cancer Ther* 2011 Apr; 10(4):679-86.
136. Hattori A, Kunz HW, Gil TJ 3rd *et al.* Thymic and lymphoid changes and serum immunoglobulin abnormalities in mice receiving cyclosporine. *Am J Pathol* 1987 Jul; 128(1):111-20.
137. Nagai Y. Effect of cyclosporin on the thymus and spleen in rats. *Nihon Geka Gakkai Zasshi* 1988; 89(6):906-20.
138. Armas OA, Astarita RW, Wolf PL *et al.* Effects of cyclosporin A on the splenic tissue of rats: a histomorphometric analysis. *Exp Mol Pathol* 1989 Feb; 50(1):92-103.
139. Takai K, Jojima K, Sakatoku J *et al.* Effects of FK506 on rat thymus: time-course analysis by immunoperoxidase technique and flow cytofluorometry. *Clin Exp Immunol* 1990 Dec; 82(3):445-9.
140. House AK, Boak JL, Draper V. *In vitro* spleen leucocyte migration and phytohaemagglutinin-stimulated lymphocyte transformation of immunosuppressed mice cells.II.Cells from mice treated by azathioprine and/or immune stimulation or thymectomy. *Clin Exp Immunol* 1974 May; 17(1):189-9.

141. Blyth WA, Harbour DA, Hill TJ. Effect of immunosuppression on recurrent herpes simplex in mice. *Infect Immun* 1980 Sep; 29(3): 902-7.
142. Matsumoto K, Sekita K, Ochiai T *et al.* Evaluation of immunotoxicity testings using azathioprine-treated rats: the International Collaborative Immunotoxicity Study (Azathioprine). *Eisei Shikenjo Hokoku* 1990;(108): 34-9.
143. Kasiske BL, de Mattos A, Flechner SM *et al.* Mammalian target of rapamycin inhibitor dyslipidemia in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2008 Jul; 8(7): 1384-92.
144. Krumbhaar EB, Lippincott SW. The post-mortem weight of the normal human spleen at different ages. *Am J Med Sci* 1939; 197:344-58.
145. Crespo M, Heidt S, Redondo D *et al.* Monitoring B cell subsets and alloreactivity in kidney transplantation. *Transplant Rev* 2015 Apr; 29(2):45-52.
146. Svachova V, Sekerkova A, Hrubá P *et al.* Dynamic changes of B-cell compartments in kidney transplantation: lack of transitional B cells is associated with allograft rejection. *Transpl Int* 2016 May; 29(5):540-8.
147. Kelton JG. Impaired reticuloendothelial function in patients treated with methyl dopa. *N Engl J Med* 1985 Sep 5; 313(10):596-600.
148. Corazza GR, Addolorato G, Biagi F *et al.* Splenic function and alcohol addiction. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997 Apr;21(2):197-200.
149. Berrón-Ruiz L, López-Herrera G, Ávalos-Martínez CE *et al.* Variations of B cell subpopulations in peripheral blood of healthy Mexican population according to age: Relevance for diagnosis of primary immunodeficiencies. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2016 Nov-Dec; 44(6):571-9.
150. Ademokun A, Wu YC, Dunn-Walters D. The ageing B cell population: composition and function. *Biogerontology* 2010 Apr; 11(2):125-37.
151. Wiederrecht G, Lam E, Hung S *et al.* The mechanism of action of FK-506 and cyclosporine A. *Ann NY Acad Sci* 1993 Nov 30; 696:9-19.
152. Ho S, Clipstone N, Timmermann L *et al.* The mechanism of action of cyclosporine A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol* 1996 Sep; 80(3 Pt 2):S40-5.
153. Traitanon O, Mathew JM, La Monica G *et al.* Differential effects of tacrolimus versus sirolimus on the proliferation, activation and differentiation of human B cells. *PloS One* 2015 Jun 18; 10(6):e0129658.
154. Lee W, Gu L, Miksztal A *et al.* Bioavailability improvement of mycophenolic acid through amino ester derivatization. *Pharm Res* 1990 Feb; 7(2):161-6.
155. Sintchak MD, Fleming MA, Futer O *et al.* Structure and mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase in complex with the immunosuppressant mycophenolic acid. *Cell* 1996 Jun 14; 85(6):921-30.

156. Mele T, Halloran P. the use of mycophenolate mofetil in transplant recipients. *Immunopharmacology* 2000 May; 47(2-3):215-45.
157. Garcia R, Leoni P, Allison A. Control of phosphoribosylpyrophosphate synthesis in human lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1977 Aug 8; 77(3):1067-73.
158. Karnell JL, Karnell FG 3rd, Stephens GL *et al.* Mycophenolic acid differentially impacts B cell function depending on the stage of differentiation. *J Immunol* 2011 Oct 1; 187(7):3603-12.
159. Ganschow R, Lyons M, Kemper MJ *et al.* B-cell dysfunction and depletion using mycophenolate mofetil in a pediatric combined liver and kidney graft recipient. *Pediatr Transplantation* 2001 Feb; 5(1):60-3.
160. Eickenberg S, Mickholz E, Jung E *et al.* Mycophenolic acid counteracts B cell proliferation and plasmablast formation in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2012; 14(3):R110.
161. Weigel G, Griesmacher A, Karimi A *et al.* Effect of mycophenolate mofetil therapy on lymphocyte activation in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2002 Oct; 21(10):1074-9.
162. Nolte MA, Bellén JA, Schadee-Eestermans I *et al.* A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp. *J Exp Med* 2003 Aug 4; 198(3):505-12.
163. Nadeau KC, Azuma H, Tilney NL. Sequential cytokine expression in renal allografts in rats immunosuppressed with maintenance cyclosporine or mycophenolate mofetil. *Transplantation* 1996 Nov 15; 62(9):1363-6.
164. Zucker K, Tsaroucha A, Olson L *et al.* Evidence that tacrolimus augments the bioavailability of mycophenolate mofetil through the inhibition of mycophenolic acid glucuronidation. *Ther Drug Monit* 1999 Feb; 21(1):35-43.
165. Van Gelder T, Klupp J, Barten M *et al.* Comparison of the effects of tacrolimus and cyclosporine on the pharmacokinetic of mycophenolic acid. *Ther Drug Monit* 2001 Apr; 23(2):119-28.
166. Picard N, Prémaud A, Rousseau A *et al.* A comparison of the effect of ciclosporin and sirolimus on the pharmacokinetics of mycophenolate in renal transplant patients. *Br J Clin Pharmacol* 2006 Oct; 62(4):477-84.
167. Smak Gregoor PJ, van Gelder T, Hesse CJ *et al.* Mycophenolic acid plasma concentrations in kidney allograft recipients with or without cyclosporin: a cross-sectional study. *Nephrol Dial Transplant* 1999 Mar; 14(3):706-8.
168. Staatz C, Tett S. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2007; 46(1):13-58.

169. Kobayashi M, Saito H, Tadano K *et al.* Cyclosporin A, but not tacrolimus, inhibits the biliary excretion of mycophenolic acid glucuronid possibly mediated by multidrug resistance-associated protein 2 in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2004 Jun; 309(3):1029-35.
170. Ferjani H, Draz H, Adib S *et al.* Combination of tacrolimus and mycophenolate mofetil induces oxidative stress and genotoxicity in spleen and bone marrow of Wistar rats. *Mutat Res* 2016 Nov 1; 810:48-55.

## ANEXO - Comitê de ética em pesquisa

	<b>HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO/ UNIVERSIDADE DO ESTADO</b>	
--	---	---

---

**PROJETO DE PESQUISA**


---

**Título:** Hipoesplenismo funcional em transplante renal**Área Temática:****Versão:** 1**CAAE:** 07650412.0.0000.5259**Pesquisador:** Suzimar da Silveira Rioja**Instituição:** Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ

---

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**


---

**Número do Parecer:** 115.001**Data da Relatoria:** 19/09/2012**Apresentação do Projeto:**

O transplante renal é considerado a terapia de escolha na substituição da função renal de pacientes em insuficiência renal crônica. Entretanto, há consenso entre a comunidade transplantadora que a sobrevida de enxertos e pacientes está hoje em dia limitada por rejeição tardia mediada por anticorpos e por infecções, sendo estas, em princípio, favorecidas por um estado de imunodepressão que inclui não somente a imunossupressão

exógena, mas também a presença de co-morbidades, algumas ainda parcialmente investigadas, e a pressão epidemiológica que cerca os indivíduos submetidos a tal procedimento/terapia. O hipoesplenismo funcional foi descrito em algumas condições clínicas, com destaque para a anemia falciforme e doença celíaca, e, mais recentemente, em pacientes submetidos a transplante de medula óssea, particularmente nos que desenvolvem doença crônica enxerto vs. hospedeiro. Sua ocorrência, até onde verificamos, não foi ainda registrada em transplante renal. Todavia, temos observado baço reduzido de tamanho na US/Doppler que realizamos, de rotina, no acompanhamento dos pacientes de nosso Serviço e, assim sendo, a existência do fenômeno será o objeto do presente estudo.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:** Estabelecer se pacientes com transplante renal apresentam hipoesplenismo funcional.  
**Objetivo Secundário:** 1. Estabelecer se pacientes com insuficiência renal em estágio terminal apresentam hipoesplenismo funcional. 2. Estabelecer se ocorre hipoesplenismo funcional em pacientes transplantados de rim, com o decorrer do tempo de transplante. 3. Estabelecer se o tipo de esquema imunossupressor associa-se com a ocorrência de hipoesplenismo funcional, em pacientes que recebem transplante renal. 4. Estabelecer se existe diferença na incidência de infecções entre pacientes transplantados conforme apresentem, ou não, hipoesplenismo funcional. 5. Avaliar a eficácia do regime de imunizações a que submetemos os pacientes, no pré e no pós-transplante, conforme rotina de nosso Serviço

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** Os pacientes transplantados já são submetidos, em nosso Serviço, a hemograma completo e US/Doppler do e enxerto. Pesquisa de IgM de células B serão feitas em sangue periférico. A cintigrafia fígado/baço irá utilizar contraste não tóxico para o rim. Não se esperam riscos para os pacientes envolvidos.  
**Benefícios:** O estudo irá prover informações exclusivas e detalhadas que podem ajudar clínicos e transplantadores a tomar medidas mais eficazes na proteção da situação de saúde e da função do enxerto renal de pacientes que apresentem hipoesplenismo.

<b>Endereço:</b> Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo			
<b>Bairro:</b> Vila Isabel	<b>CEP:</b> 20.551-030		
<b>UF:</b> RJ	<b>Município:</b> RIO DE JANEIRO		
<b>Telefone:</b> (21)2868-8253	<b>Fax:</b> (21)2264-0853	<b>E-mail:</b> cep-hupe@uerj.br	

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto está estruturado e obedece as boas práticas em pesquisa.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

bem adequados a pesquisa

**Recomendações:****Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

de acordo para aprovação

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
3. O Comitê de Ética solicita a V. S<sup>a</sup>., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

RIO DE JANEIRO, 04 de Outubro de 2012

---

Assinado por:  
WILLE OIGMAN  
(Coordenador)

**Endereço:** Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo  
**Bairro:** Vila Isabel **CEP:** 20.551-030  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br