Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Denise Segenreich Glasberg

Monitorização dos anticorpos anti-hla após transplante renal e sua correlação com episódios de rejeição aguda

Rio de Janeiro
2014

Denise Segenreich Glasberg

Monitorização dos anticorpos anti-hla após transplante renal e sua correlação com episódios de rejeição aguda

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto

Rio de Janeiro

2014

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

G548 Glasberg, Denise Segenreich.
Monitorização dos anticorpos anti-HLA após transplante renal e sua correlação com episódios de rejeição aguda. / Denise Segenreich Glasberg. – 2014.
59 f.

Orientador: Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto.
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Rins - Transplante – Teses. 2. Rejeição de enxertos – Teses. 3. Imunoglobulinas – Teses. I. Pôrto, Luís Cristóvão de Moraes Sobrino. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.61-089

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

_____ _____

Assinatura Data

Denise Segenreich Glasberg

Monitorização dos anticorpos anti-hla após transplante renal e sua correlação com episódios de rejeição aguda

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 24 de julho de 2014.

Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. Luis Cristóvão de Moraes SobrinoPôrto (Orientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Prof. Dr. Maurilo de Nazaré de Lima Leite Júnior

Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Prof. Dr. Edison Régio de Moraes Souza

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Rio de Janeiro

2014

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que aceitaram participar deste estudo, por tornar este estudo possível.

A Dra. Deise De Boni Monteiro de Carvalho e Dra. Tereza Matuck pela contribuição inestimável para minha atuação como profissional e por terem disponibilizado o serviço de transplante renal do Hospital de Bonsucesso para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Luis Cristóvão Pôrto, pela sua abertura ao acolherminha proposta pesquisa para orientar e pela confiança em mim depositada para testar novos caminhos de tratamento de dados.

Ao serviço de enfermagem do setor de transplante renal do Hospital Federal de Bonsucesso pela fundamental colaboração na coleta de amostras.

Aos colegas Fernando de Souza Santos, Angela dos Santos e Gustavo Milson Fabrício Silva, do Laboratório de Histocompatibilidade (HLA-UERJ), pelo trabalho desenvolvido na análise das amostras.

Aos meus pais, Solly e Stella, exemplos de profissionais, pelo constante estímulo a buscar novos desafios.

A minha mãe, Stella, cujo apoio e dedicação diários tornou possível a conclusão desse trabalho

Ao meu marido, Eduardo, pelo companheirismo, carinho e apoio acadêmico. A sua serenidade e objetividade nos momentos mais difíceis foram inestimáveis.

A vida é curta e muito longo o caminho a percorrer. As oportunidades são passageiras, a experiência traiçoeira e a avaliação difícil.

Hipócrates

RESUMO

GLASBERG, Denise Segenreich. **Monitorização dos anticorpos anti-HLA após transplante renal e sua correlação com episódios de rejeição aguda**. 2014. 59f. Dissertação. (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Introdução: A associação entre a presença de anticorpo anti-HLA doador específico (DSA), em pacientes com prova cruzada negativa por citotoxicidade dependente de complemento (CDC), e a ocorrência de episódios de rejeição mediada por anticorpos (RMA) e menor sobrevida do enxerto já foi demonstrada por diversos autores. Entretanto,estimar a relevância clínica da presença desses anticorpos, em um determinado receptor, é um grande desafio e portanto novas estratégias de monitorização imunológicas são necessárias. Objetivo: O objetivo desse estudo foi monitorar a presença de DSA, bem como a variação dos seus títulos durante o primeiro ano após o transplante renal e correlacionar com episódios de rejeição aguda e função do enxerto ao final desse período. Metodologia: Foram analisados 389 soros de 71 pacientes incluídos no estudo. A pesquisa de DSA foi realizada utilizando os testes LABScreen® single antigenbeads nas amostras correspondentes aos tempos: pré-transplante, 14, 30, 90, 180 e 365 dias após o transplante. Episódios de rejeição aguda comprovados por biópsia foram analisados de acordo com a classificação de Banff 2007. A taxa de filtração glomerular (TFG) ao final do primeiro ano foi estimada utilizando a fórmula *Modificationof Diet in Renal Disease* (MDRD). Os pacientes foram inicialmente separados em 3 grupos de diferentes riscos imunológicos (pré-transplante): A) DSA-, B) DSA+ com MFI >1000 e < 5000 e C) DSA+ com MFI > 5000. Num segundo momento, foram novamente agrupados de acordo com o perfil de mudança nos valores de MFI (intensidade de fluorescência média) ao longo do primeiro ano. Resultados: DSA estavam presentes pré-transplante em 15 pacientes. RMA foi mais frequente no grupo C ($p = 0,02$). De acordo com a variação dos títulos de DSA pós-transplante os pacientes foram novamente agrupados: grupo I) permaneceu DSA- durante todo acompanhamento = 50 pacientes, II) diminuiu ou manteve títulos de DSA em relação ao tempo zero = 13 pacientes e III) aumentou títulos em relação ao tempo zero = 8 pacientes (6 foram DSA de novo). Três pacientes dos grupos I e um paciente do grupo II apresentaram episódios de rejeição aguda celular. Não foi observada oscilação significativa nos títulos de anticorpos durante esses eventos. Nenhum paciente desse grupo apresentou episódio de RMA. Episódio de RMA ocorreu em dois pacientes do grupo III. Em ambos os pacientes foi detectado aumento significativo nos valores de MFI dos DSA em relação ao tempo zero. Não foi observada diferença significativa na TFG entre os grupos analisados nesse estudo. Entretanto, observou-se uma diferença estatisticamente significativa na TFG entre os pacientes que apresentaram episódio de rejeição aguda em relação aos que não tiveram, sendo menor nos primeiros ($p = 0,04$). Conclusão: A monitorização prospectiva dos anticorpos pode ajudar a identificar pacientes em maior risco para ocorrência de RMA e o aumento nos valores de MFI DSA deve ser interpretado como um sinal de alerta, sobretudo em pacientes previamente sensibilizados.

Palavras-chave: Anticorpo doador específico (DSA). Rejeição mediada por anticorpo(RMA). Transplante renal.

ABSTRACT

GLASBERG, Denise Segenreich. **Anti-HLA antibody monitoring after kidney transplantation and correlation with acute rejection episodes**.2014. 59f. Dissertação. (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Background: Pre-transplant donor specific antibodies (DSA) in crossmatch negative kidney transplant recipients have been associated with antibody mediated rejection (AMR) episodes and poor graft survival. However, the clinical relevance of these antibodies in an individual basis is very difficult to estimate, and new immunological monitoring strategies are needed. Objective: To monitor for DSA presence, and longitudinal changes in DSA MFI (mean fluorescence intensity) during the first year post transplant and correlate with acute rejection episodes and with one year graft function. Material and Methods: We analyzed 389 sera from 71 patients included in this study. Sera were obtained pre-transplant and at the 14, 30, 90, 180 and 365 days post transplant. Sera were tested for DSA using LABScreen® single antigen beads assay. Biopsy-proven acute rejection episodes were classified by Banff 2007 criteria. The one year Glomerular Filtration Rate (GFR) was estimated using the *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD) formula. Patients were initially divided in groups according to their pre-transplant immunological status: group A) DSA- ; B) DSA+ with MFI >1000 and < 5000 and C) DSA+ with MFI > 5000. A second analysis was done according to post transplant antibodies profiles along the first year. Results: DSA were present pre-transplant in 15 patients. AMR were more frequent in the C group (p = 0,02). According to different post transplant antibodies profiles patients were classified in 3 groups: group I) DSA- pre and post transplant, n = 50; II) decreased or sustained DSA levels in relation to the first measure, n =13 and III) increased DSA levels in relation to the first measure, n = 8 (6 with DSA *de novo*). Three patients of group I and one patient of group II have experienced acute celular rejection. We didn't observe antibodies levels changes during these episodes. None have experienced AMR in these groups. AMR episodes ocurried in 2 patients of group III. DSA levels significantly increased in both patients. One year GFR was not different between groups. However, one year GFR was statistically lower in patients who have experienced acute rejections episodes (p = 0,04). Conclusion: Prospective monitoring of anti-HLA antibodies could be helpful in identify patients at risk for AMR and increasing values of MFI DSA could be interpreted as a red flag, largely in previous sensitized individuals.

Keywords: Donor specific antibody (DSA). Antibody mediated rejection (AMR). Kidney transplantation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma das coletas de sangue para pesquisa de anticorpos anti-HLA 24

Figura 2- Pacientes incluídos no estudo..... 28

Figura 3- Curvas dos valores de MFI de anticorpos específicos contra o enxerto (DSA) e dos somatórios dos anticorpos inespecíficos em cada loco. (a) paciente SNP, (b) paciente JAP..... 35

Figura 4- Curvas dos valores de MFI de anticorpos específicos contra o enxerto (DSA) (a)e dos somatórios dos anticorpos inespecíficos (b), em cada loco do paciente SSB..... 37

Figura 5 - Curvas dos valores de MFI de anticorpos específicos contra o enxerto (DSA) (a) e dos somatórios dos anticorpos inespecíficos (b), em cada loco do paciente MECS..... 39

Figura 6- Curvas dos valores de MFI de anticorpos específicos contra o enxerto (DSA) (a) e dos somatórios dos anticorpos inespecíficos (b), em cada loco do paciente FSG..... 41

Figura 7 - Curvas dos valores de MFI de anticorpos específicos contra o enxerto (DSA) (a) e dos somatórios dos anticorpos inespecíficos (b), em cada loco do paciente LSG..... 42

Figura 8 - Curvas dos valores de MFI de anticorpos específicos contra o enxerto (DSA) (a) e dos somatórios dos anticorpos inespecíficos (b), em cada loco do paciente JFS..... 44

Figura 9 - Curvas dos valores de MFI de anticorpos específicoscontrao enxerto (DSA) (a) e dos somatórios dos anticorpos inespecíficos (b), em cada loco do paciente ROP..... 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de amostras por intervalo, em dias, entre o dia da coleta da amostra e o dia do transplante..... 24
Tabela 2 - Anticorpos específicos presentes no pré-transplante imediato..... 31
Tabela 3 - Dados demográficos e características clínicas dos pacientes em relação ao risco imunológico pré-transplante..... 32
Tabela 4 - Dados demográficos e características clínicas dos pacientesem relação ao perfil de variação dos títulos de DSA após o transplante..... 34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC	Complement dependent cytotoxicity
DSA	Donor-specific antibody
HFB	Hospital Federal de Bonsucesso
HLA	Humanleukocyteantigens
MDRD	*Modification of Diet in Renal Disease*
MFI	Mean fluorescence intensity
MM	Mismatch
NDSA	non-donor-specific antibody
PBS	Tampão de salinafosfato
PE	*Phycoerythrin*
PRA	PanelReactiveAntibodies
RMA	Rejeição mediada por anticorpos
SAFB	*Single AntigenFlowBeads*
TFG	Taxa de Filtração Glomerular

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	11
1	**REJEIÇÃO MEDIADA POR ANTICORPOS**.....	12
1.1	**Alvos antigênicos na rejeição mediada por anticorpos**.....	12
1.2	**Diagnóstico histológico da rejeição mediada por anticorpos**.....	13
1.3	**Métodos de detecção de anticorpos**.....	14
1.3.1	Prova cruzada contra linfócitos.....	14
1.3.2	PRA.....	15
2	**REVISÃO DE LITERATURA.**.....	17
3	**OBJETIVO**.....	21
4	**METODOLOGIA**.....	22
4.1	**Casuística**.....	22
4.2	**Desenho do estudo**.....	24
4.3	**Ensaio imunológico – Teste das microesferas marcadas - LABScreen®**.....	25
4.4	**Biópsias renais**.....	26
4.5	**Análise estatística**.....	27
5	**RESULTADOS**.....	28
5.1	**Pacientes incluídos**.....	28
5.2	**Anticorpos anti-HLA pré-transplante**.....	30
5.3	**Monitorização dos anticorpos anti-HLApós transplante**.....	33
5.3.1	Estudo imunológico dos grupos.....	35
5.3.2	Sobrevida do enxerto e dos pacientes em um ano.....	46
5.3.3	Valor de creatinina e Taxa de filtração glomerular (TFG) em 1 ano.....	46
6	**DISCUSSÃO**.....	48
	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética.....	59

INTRODUÇÃO

A prevalência da doença renal crônica vem crescendo de forma progressiva no Brasil e no mundo. As opções de tratamento para os pacientes com doença renal crônica em fase avançada são: hemodiálise, diálise peritoneal e transplante renal(1).

O transplante renal, realizado com doador vivo ou falecido, tem se tornado o tratamento de escolha para a maioria dos pacientes com insuficiência renal crônica avançada.No ano de 2013, foram realizados 5.433 transplantes renais em nosso país sendo 1.373 com doador vivo e 4060 com doador falecido, segundo a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (2). No estado do Rio de Janeiro foram realizados 416 transplantes renais em 2013, com um aumento de13 % em relação ao ano de 2012.

Uma análise da*United Network OrganSharing*(UNOS), com mais de 270.000 pacientes submetidos a um transplante renal entre 1988 e 2010, levantou importantes questionamentos (3): houve um enorme progresso na sobrevida dos enxertos a curto prazo, e a isso atribui-se uma diminuição expressiva nos episódios de rejeição aguda na fase inicial do transplante, com o uso de imunossupressores mais potentes. Nas últimas quatro décadas, os linfócitos T foram considerados os principais desencadeadores de processo de rejeição e, portanto, drogas imunossupressoras com capacidade de reduzir a ativação e proliferação de linfócitos T contribuíram para redução das taxas de rejeição aguda. Em contrapartida, a sobrevida a longo prazo dos enxertos não melhorou significativamente nesse período. Dessa forma, conclui-se que há necessidade do desenvolvimento de novos tratamentos eficazes em diminuir a agressão crônica ao enxerto, principalmente de causas imunológicas.

A despeito da melhoria dos protocolos de imunossupressão, considerável número de enxertos ainda é perdido devido à rejeição aguda refratária aos imunossupressores disponíveis, principalmente nos receptores com sensibilização anti-HLA prévia. Já foi demonstrado em estudos anteriores que, além de mecanismos celulares, mecanismos humorais também estão envolvidos na rejeição aguda e crônica do enxerto(4).

1 REJEIÇÃO MEDIADA POR ANTICORPOS

1.1 Alvos antigênicos na rejeição mediada por anticorpos

Os anticorpos dirigidos contra antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe I ou II, do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), presentes no endotélio do enxerto, são os principais mediadores darejeiçãohumoral ao enxerto. As moléculas HLA são glicoproteínas altamente polimórficas, codificadas por genes localizados no braço curto do cromossoma 6 e são classificadas em 2 subgrupos: HLA- classe I e HLAclasse II. As moléculas HLA classe I, codificadas por genes localizadosnos locosA,B e C, são expressos na superfície de todas as células nucleadas e em plaquetas. Os HLA classe II, majoritariamente produtos de genes dos locos DRB1, DQB1 e DPB1, são expressos na superfície das células apresentadoras de antígenos, representadas principalmente pelas células dendríticas, macrófagos, linfócitos B e T e células endoteliais quando ativadas.

Apesar da conhecida relevância do sistema HLA no transplante de órgãos sólidos, anticorpos dirigidos contra outros sistemas antigênicostambém já foram implicados em processos de rejeição. Anticorpos dirigidos contra o sistema VEC (do inglês, *Vascular EndothelialCell System*)denominados de anticorpos anti-célulaendotelial, foram inicialmente descritos comoauto-anticorpos relacionados a doenças auto-imunes(5). Essesanticorpos, entretanto, podem ativar células endoteliais aumentando expressão de moléculas de adesão, levar a um estado pró-coagulante e também induzir apoptose, mecanismos presentes em processos de rejeição (6).Outros anticorpos associados a processos de rejeição já descritos na literatura são: anticorpos anti-receptor tipo I da angiotensina II (7) e anticorpos dirigidos contra antígenos MICA e MICB (do inglês, ***M****HC classe* ***I C****hain related gene* ***A****and****B****,* respectivamente) (8).

A formação de anticorpos anti-HLA denominada sensibilizaçãopode ocorrer após contato de um indivíduo com HLA alogênicosapósgestação e/ou aborto,transfusão de hemoderivados e transplantes de órgãos ou tecidos (9).

1.2 Diagnóstico histológico da rejeição mediada por anticorpos

Em muitos episódios de rejeição os componentes celulares e humorais podem coexistir sendo que os últimos podem não ser identificados utilizando apenas cortes histológicos convencionais. Alguns achados histológicos sugerem a participação de anticorpos no processo de rejeição como: presença de neutrófilos em capilares peritubulares, arteritetransmural, necrose fibrinóide arterial, glomerulite aguda com infiltrado de monócitos e macrófagos e trombos em capilares. Entretanto, esses achados não são específicos para o diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos e portanto outros marcadores diagnósticos devem ser considerados(10, 11).

No início da década de 1990,a descoberta dos depósitos de C4d (produto de clivagem do C4 da via clássica do sistema complemento) em capilares peritubulares por Feucht*etal*(12) aumentou o conhecimento da fisiopatologia da rejeição mediada por anticorpos.

A partir de então muitos estudos tentaram correlacionar a presença de depósitos de C4d em biópsias de enxerto com a presença de anticorpos anti-HLA circulantes. Anticorpos anti-HLA classe I e/ou classe II estão presentes em cerca de 88 a 95% dos pacientes que cursam com rejeição do enxerto e deposição de C4d, enquanto ocorrem em menos de 10% das rejeições sem marcação de C4d (13,14).A presença do C4d em biópsias de enxerto passou a ser um indicativo de ativação humoral e foi incorporado nos critérios diagnósticos da rejeição mediada por anticorpos.

A classificação histopatológica de Banff foi criada para uniformizar a interpretação das biópsias de enxerto. Foi formulada em 1991, na cidade de Banff, no Canadá, e publicada inicialmente em 1993, e é revisada periodicamente no intuito de discutir novos conceitos e incorporá-los à classificação. Revisões posteriores incorporaram odiagnóstico de rejeição mediada por anticorpos e instituiu-se a recomendação para pesquisa de C4d em todas as biópsias de enxerto (10, 11, 15).

Os critérios definidos pela classificação de Banff, para rejeição aguda mediada por anticorpos, são:

1) Evidência morfológica de lesão tecidual aguda

a. Necrose tubular aguda; ou

b. Neutrófilos e/ou células mononucleares em capilares peritubulares e/ou glomérulos e/ou trombose capilar; ou
c. Arteriteintimal/ necrose fibrinóide/ arteriteintramural ou transmural.
2) Evidência imunopatológica da ação de anticorpos, como:
a. Deposição de C4d; e/ou
b. Deposição de imunoglobulinas nos capilares peritubulares (raro); ou
c. Deposição de imunoglobulinas e complemento nas áreas de necrose arterial fibrinóide.
3) Evidência sorológica de anticorpos circulantes, como:
a. Presença de anticorpos anti-HLA do doador;ou
b. Presença de anticorpos contra outros antígenos endoteliais do doador (anticorpos não-HLA).

Para firmar o diagnóstico de rejeição aguda mediada por anticorpos é necessária a presença dos 3 critérios. Nos casos em que apenas 2 critérios estejam presentes a rejeição é dita suspeita.

1.3 **Métodos de detecção de anticorpos**

1.3.1 Prova Cruzada contra linfócitos

O teste para detecção de anticorposanti-HLA em microplacas foi desenvolvido por Patel e Terasaki (16) na década de 1960. O teste CDC clássico, também denominado CDC-NIH (do inglês *ComplementDependentCytotoxicityNationalInstituteof Health*), baseia-se na incubação de linfócitos do doador com soro do receptor, seguida da adição de complemento de coelho e posterior verificação de lise celular por meio de corantes vitais com leitura da reação em microscópio de luz (17). A adição de antiglobulina humana na prova cruzada contra linfócitos T aumentou a sensibilidade do teste, detectando anticorpos em baixos títulos e anticorpos com menor capacidade de fixar complemento (18,19). Para diferenciar anticorpos do isotipoIgM, que na maioria das vezes não são deletérios para o transplante, utiliza-se o agente redutor ditiotreitol

(DTT) que inativa esses anticorpos sem interferir na reatividade dos anticorpos da classe IgG.

Na década de 1990 foi introduzida a técnica da citometria de fluxo, mais sensível que o CDC, que propiciou um aumento da capacidade de detectar anticorpos em baixos títulos e anticorpos não fixadores de complemento. A prova cruzada por citometria de fluxo (FCXM, do inglês *FlowCytometryCrossmatch*) baseia-se na incubação do soro do receptor com linfócitos B e T do doador, seguida da adição de anticorpo conjugado com fluorocromo (20). Por ser uma técnica muito sensível podem ocorrer falsos positivos, e sua interpretação pode ser facilitada com a pesquisa simultânea de anticorpos por ensaios de fase sólida descritos a seguir (21).

1.3.2 PRA

Na avaliação do risco imunológico de um candidato a transplante renal é realizada a pesquisa de anticorpos anti-HLAno soro do paciente através do teste reatividade contra painel ou PRA (do inglês *PanelReactiveAntibodies*). Esse exame indica o grau de sensibilização HLA prévia do paciente e fornece uma estimativa da probabilidade de prova cruzada positiva com um potencial doador.Historicamente esse exame era realizado pela técnica de CDC com a utilização de um painel de linfócitos que expressam,em sua superfície,diferentes HLA, previamente conhecidos, e que deveriam representar os HLA da amostra populacional de possíveis doadores.

Na década de 90, foi desenvolvida nova técnica que utiliza os antígenos das moléculas HLA purificados e aderidos a um meio sólido, chamada, então, ensaio de fase sólida, no lugar de células. Essa técnicaémais sensível e específica uma vez que não sofre interferência de auto-anticorpos e anticorpos contra outros antígenos leucocitários.

O PRA-ELISA (do inglês*PanelReactiveAntibodiesbyEnzime-LinkedImmunoSorbentAssay*) utiliza moléculas HLA solúveis aderidas em placas e anticorpos secundários, ligados a uma enzima, direcionados contra a porção Fc dos anticorpos pesquisados (22).Essa técnicapermite pronta diferenciação entre anticorpos de classe I e II.

Atualmente, a metodologia que utiliza microesferas de poliestireno revestidas com HLApurificadose anticorpos secundários que emitem fluorescência detectados por citometria de fluxovem sendo amplamente difundida(23). Entre os kits comerciais disponíveis estão aqueles que utilizam microesferas revestidas com HLA de classe I e II simultaneamente (LabScreenMixed®), de classe I ou II separadamente (FlowPRA®) e ainda aqueles que utilizam microesferas marcadas com apenas um único alelo HLA (LabScreenSingleAntigen®) que permitem identificar com precisão a especificidade do anticorpo encontrado bem como de avaliar a intensidade do mesmo. A plataformaLuminex detecta e analisa a fluorescência emitida pela microesfera e gera um valor de fluorescência média MFI (do inglês *meanfluorescenceintensity*) sendo considerado um ensaio semiquantitativo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O potencial destrutivo de anticorpos pré-formados, ativadores do complemento, contra os HLA do doador foi estabelecido no fim da década de 1960 por Patel e Terasaki (16). Eles publicaram um trabalho revolucionário demonstrando a importância da prova cruzada (do inglês *"crossmatch"*) pré-transplante, por um ensaio de citotoxicidade dependente de complemento (CDC), prevenindo a ocorrência de rejeição hiperaguda e perda imediata do enxerto. Nessa forma de rejeição, anticorpos pré-formados em altos títulos atacam o endotélio do órgão transplantado ativando o sistema complemento e a cascata de coagulação, promovendo trombose na microcirculação e isquemia do órgão. Esse método é, até hoje, utilizado para a alocação de órgãos e um resultado positivo no teste contraindica o transplante.

Na década de 1990, num trabalho pioneiro, Halloran*etal*(24)descreveram uma forma de rejeição aguda associada à presença de anticorpos anti-HLA. Eles relataram que todos os pacientes que desenvolveram anticorpos anti-HLA de classe I de novo (não estavam presentes no momento do transplante) após os primeiros 3 meses de transplante evoluíram com rejeição aguda enquanto menos da metade dos pacientes que não desenvolveram anticorpos apresentaram rejeição aguda.

A rejeição aguda associada à presença de anticorpos anti-HLA era mais grave que a mediada por células, resistente à terapia imunossupressora convencional e associada à injúria endotelial e vasculite (25).

A partir de então, diversos estudos demonstraram associação entre presença de anticorpos anti-HLA circulantes, tanto pré como após o transplante e a ocorrência de episódios de rejeição aguda (26, 27, 28), rejeição crônica e perda do enxerto (29, 30, 31).Crespo*etal*(26) avaliaram 81 pacientes que apresentaram rejeição aguda nos primeiros 3 meses após transplante renal. Eles observaram que 37% dos pacientes com rejeição resistente a corticosteróides possuíam anticorpos anti-HLA doador específicos (DSA) enquanto nenhum dos pacientes com rejeição que respondeu ao tratamento apresentou esses anticorpos. Em um estudo prospectivo com pacientes de elevado risco imunológico, os autores detectaram anticorpos anti-HLA não doador específico em 38,8% dos pacientes e 22,4% dos pacientes apresentaram anticorpos DSA, estes últimos cursaram com rejeição aguda (27). Em um outro estudo, que

avaliou pacientes com pelo menos um ano de transplante, os autores detectaram DSA em 5,5% deles, anticorpos não doador específicos em 11,3%, enquanto 83% dos pacientes permaneceram sem anticorpos. Houve uma associação significativa entre a presença de anticorpos (específicos ou não) e episódios de rejeição aguda (28).

Em um estudo longitudinal que acompanhou 54 pacientes para detecção de anticorpos pós-transplante, os autores (29)observaram uma forte correlação entre a presença de anticorpos anti-HLA e perda do enxerto principalmente quando estes eram considerados DSA. A utilização de testes sequenciais revelou que o surgimento desses anticorpos precedeu a elevação da creatinina e subsequente perda do enxerto. Em outro estudo (31), com 1.014 pacientes transplantados renais com função renal estável, foram monitorados para pesquisa de anticorpos de forma transversal. Anticorpos foram detectados em 30% dos pacientes, sendo 31% destes caracterizados como DSA. Em uma média de 5 anos de acompanhamento, foi observada uma sobrevida do enxerto significativamente menor nos pacientes que apresentavam DSA (49%) em relação aos que não tinham anticorpos (83%).

Com a introdução dos ensaios de fase sólida, em especial o *Single AntigenFlowBeads*(SAFB) foi possível determinar com precisão as especificidades dos anticorpos encontrados em um determinado receptor. Comparando a tipagem HLA do doador com as especificidades dos anticorpos do receptor, pode-se determinar a presença ou não de DSA de forma virtual sem a realização de prova cruzada com células do doador ("*crossmatch* virtual"). Embora a ausência de DSA-HLA definida por prova cruzada virtual esteja relacionada a um baixo risco de RMA precoce relacionado a anticorpos HLA, de acordo com Bielman*etal* (32), ainda é questionável na literatura se todos DSA detectados apenas por SAFB são clinicamente relevantes.A interpretação da informação dada por esses ensaios, para avaliação de risco imunológico pré-transplante, varia entre os diversos centros, como: listar anticorpos definidos por SAFB acima de um determinado valor de MFI como inaceitável, listar anticorpos definidos por SAFB de acordo com o valor de MFI (baixo, moderado e alto) ou fornecer o MFI de todos os anticorpos definidos por SAFB(33). Além disso, os valores de MFI que se correlacionam a desfechos clínicos relevantes são muito variáveis na literatura e, portanto, um valor de *cutoff*para positividade do teste ainda não foi estabelecida.

Em um estudo retrospectivo com 60 pacientes submetidos aum transplante com doador vivo, com prova cruzada por CDC e citometria de fluxo para linfócito T e B negativos pré-transplante, Patel*etal*(34)demonstraram a presença de DSA pré-transplante por ensaios de fase sólida em 20 pacientes. Destes, quatro (20%) evoluiram com Rejeição Mediada por Anticorpos (RMA), sendo três casos no primeiro mês após o transplante. Dentre os 40 pacientes sem DSA pré-transplante, um (2,5%) apresentou episódio de RMA.

Num estudo retrospectivo com 334 pacientes, Amico*etal* (35)reportaram uma incidência acumulada de 55%de RMA em pacientes com DSA detectados por SAFB, técnica de Luminex, contra 6% (p< 0,0001) nos pacientes sem DSA. Nesse estudo o número, a classe, a intensidade do anticorpo bem como a presença de eventos de sensibilização prévia não foram preditivos para ocorrência de RMA. Além disso, esses autores também demonstraram que a sobrevida do enxerto censurada por morte foi semelhante entre os grupos com DSA que não apresentaram RMA e o grupo sem DSA, e foi 20% pior no grupo com DSA que evoluíram com RMA. Lefaucher*etal*(36)avaliaram 402 receptores de transplante com doador falecido e observaram uma pior sobrevida do enxerto em 8 anos, seguida de incidência elevada de RMA entre os pacientes que apresentavam DSA pré-transplante detectados por SAFB.Eles também demonstraram que a prevalência de RMA aumentou significativamente conforme aumento da intensidade do DSA imunodominantepré-transplante respectivamente: 0,9% para MFI < 465, 18,7% entre466 e 3000, 36,4% para MFI entre 3001 e 6000 e 51,3% para MFI >6000.Em contrapartida, Vlad*et a*l (37)não demonstraram pior sobrevida do enxerto no curto prazo, em pacientes com baixos títulos de DSA detectados pela mesma técnica já mencionada. Hirai*eta*l (38) publicaram um estudo comparando a incidência de rejeição humoral e a sobrevida do enxerto em 5 anos entre duas coortes de receptores com DSA pré-transplante detectados apenas por SAFB em momentos históricos distintos, entre 2001 e 2004 e após 2005. Após 2005, os receptores com DSA, foram submetidos a protocolos de dessensibilização com sessões de plasmaferese e rituximab com redução significativa nos episódios de rejeição por anticorpos.

Everly*etal* (39)demonstraram que a presença de DSA no momento do diagnóstico da rejeição aguda é um fator preditivo de mau prognóstico para função do enxerto a longo prazo com aumento em 6 vezes na taxa de perda do enxerto. Os

mesmos autores demonstraram que uma redução nos títulos de DSA < 50% após 14 dias da biópsia foi significativamente relacionada a uma pior sobrevida do enxerto quando comparada a uma redução > 50%. Em um estudo subseqüente, eles avaliaram 28 pacientes com diagnóstico de RMA que foram tratados com plasmaferese,timoglobulina e corticosteróides e observaram que 22 pacientes não apresentaram queda dos títulos de DSA > 50% (não respondedores) e evoluíram com sobrevida do enxerto significativamente menor (40).

Com o atual progresso das técnicas de detecção de anticorpos, e o conhecimento de que os anticorpos anti-HLA estão relacionados à perda tardia do enxerto, recentemente foram publicados estudos prospectivos com monitorização seriada para detecção de anticorpos *de novo* após o transplante (41, 42, 43).Gill *et al* (41) observaram uma correlação positiva entre presença de anticorpos *de novo* no primeiro ano após o transplante e episódios de rejeição, porém em todos os casos os anticorpos apareceram no momento ou após o diagnóstico clínico de rejeição. Em contrapartida, Everly*etal* (42)demonstraram que 75% dos anticorpos *de novo* foram detectados antes da rejeição. Nesse estudo, a incidência acumulada de anticorpos de novo foi de 20% em 5 anos, sendo 11% só no primeiro ano. Eles concluíram também que após o surgimento dos anticorpos 24% dos pacientes irão perder o enxerto em 3 anos. Wiebe*etal*(43)publicaram um elegante estudo com monitorização de DSA *de novo* e sua correlação clínico-patológica. Esses autores observaram que em 10 pacientes, de um total de 14 que apresentavam função estável do enxerto no momento da detecção dos anticorpos, foi evidenciado sinais de injúria mediada por anticorpos na biópsia protocolar. Eles sugerem que a presença de DSA *de novo*está relacionada à inflamação mediada por anticorpos subclínica durante o período de latência anterior à disfunção do enxerto (44).

Considerando que os DSA poderiam ser detectados antes da rejeição ou da falência do enxerto, sugere-se que a sua monitorização prospectiva possa ser um marcador precoce e não invasivo auxiliando no diagnóstico e tratamento precoce da rejeição. A disponibilidade das novas técnicas para pesquisa de anticorpos, já mencionadas, que caracterizam de forma precisa a especificidade do anticorpo e também a sua intensidade oferecem novas perspectivas de monitorização imunológica principalmente em pacientes previamente sensibilizados.

3 OBJETIVO

O objetivo desse estudo é monitorar a presença de DSA, bem como a variação dos seus títulos durante o primeiro ano após o transplante renal e correlacionar com episódios de rejeição aguda.

Os objetivos secundários são: avaliar as especificidades dos anticorpos de classe I e classe II, avaliar o impacto da presença dos anticorpos na função do enxerto ao final do primeiro ano.

4 METODOLOGIA

4.1 Casuística

Este foi um estudo prospectivo e observacional com pacientes submetidos a transplante renal isolado com doadores vivos ou falecidos realizados na Unidade de Transplante Renal do Hospital Federal de Bonsucesso (HFB), Rio de Janeiro, durante os dois anos de vigência do projeto – janeiro de 2012 a janeiro de 2014.Os pacientes foram acompanhados por um período de 1 ano ou até a perda do enxerto.

A avaliação para inclusão no estudo foi realizada no momento da internação do paciente para o transplante. Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão no estudo e que não tinham critérios de exclusão foram convidados a participarem do estudo e assinaram um termo de consentimento informado. Este estudo é uma continuidade de um projeto aprovado pelo Conselho de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (1141-CEP/HUPE CAAE: 0071.228.000-5 - Anexo A).

Critérios de inclusão: pacientes com 18 anos ou mais, receptores de transplante renal isolado primário ou retransplante com doadores vivos ou falecidos.

Critérios de exclusão: transplante de outro órgão anterior que não rim e/ou transplante de múltiplos orgãos.

Todos os pacientes incluídos no estudo receberam rim de doador com tipagemABO compatível e com prova cruzada pré-transplante por citotoxicidade dependente de complemento (CDC) negativa.

No momento da inclusão, foram registradas informações sobre possível sensibilização prévia: transplantes prévios, gestações/abortos, transfusões sanguíneas, reatividade contra painel (PRA).Nesse estudo foram avaliadas características demográficas entre pares de doador/receptor como idade, etnia, sexo e relacionamento; eventos de possível sensibilização anterior ao transplante, compatibilidade entre doador/receptor nos locos A, B e DRB1.

Os pacientes transplantados foram avaliados periodicamente em consultas clínicas, e a função do enxertofoimonitorada seguindo os protocolos vigentes no serviço pela equipe clínica responsável.

O esquema imunossupressor foi definido pela equipe clínica responsável. O esquema padrão de manutenção consistiu em terapia tríplice com inibidor de calcineurina (preferencialmente tacrolimus), prednisona e micofenolato sódico. A indução com anticorpo monoclonal anti-receptor IL-2 (basiliximab) ou comtimoglobulina, um anticorpo policlonaldepletor de linfócitos, foi avaliada de acordo com o risco imunológico do receptor seguindo o protocolo vigente na instituição. Esquemas alternativos com a substituição de um ou mais imunossupressores do esquema padrão por inibidores da mTOR (rapamicina ou everolimus) foram utilizados em casos selecionados definidos pela equipe clínica responsável. O nível sérico dos inibidores de calcineurina, bem como da rapamicina e/ou everolimus, nos pacientes utilizando essas medicações, foram monitorados de acordo com a rotina do serviço.As biópsias do enxerto foram realizadas por indicação da equipe médica responsável quando havia suspeita clínica ou laboratorial de rejeição.

No seguimento dos pacientes foram avaliados: imunossupressão, presença de função retardada do enxerto definida como necessidade de diálise durantea primeira semana após o transplante, episódios de rejeição aguda clínica e/ou comprovada por biópsia, infecção por citomegalovírus, creatinina sérica com 3, 6 e 12 meses e cálculo da depuração de creatinina pela fórmulas*Modificationof Diet in Renal Disease*(MDRD).

Episódios de rejeição aguda foram levantados a partir dos prontuários. Os critérios para diagnóstico de rejeição foram estabelecidos pela equipe clínica assistente, baseado em achados clínicos e laboratoriais como diminuição do débito urinário, aumento da creatinina, dor e/ou aumento do volume do enxerto e achados histopatológicos da biópsia renal.

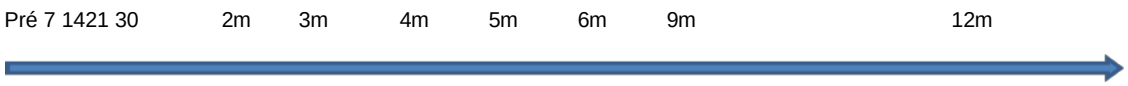
De acordo com a prática vigente no Serviço de Transplante do HFB as rejeições agudas são tratadas com pulsos de metilprednisolona 10 a 12mg/Kg/dia por 3 dias. As rejeições córtico-resistentes são tratadas com timoglobulina na dose de 1,0 mg/Kg/dia por 7 dias. As rejeições humorais comprovadas por biópsia e com a presença de DSA circulante, são tratadas com sessões de plasmaferese e imunoglobulina.

Pacientes que retornaram ao programa de diálise, submetidos ou não à transplantectomia, foram considerados perda do enxerto. Pacientes que foram a óbito com enxerto funcionante não foram considerados como perda do enxerto.

4.2 Desenho do Estudo

Foram coletadas seqüencialmenteamostras de soro de cada paciente incluído no estudo para pesquisa de anticorpos anti-HLA. A primeira amostra foicoletadapré-transplante, e as demais em torno dos7, 14, 21 e 30dias e, 2, 3, 4, 5, 6, 9 e 12 meses após o transplante, conforme demonstrado na Figura 1.

Figura 1 – Fluxograma das coletas de sangue para pesquisa de anticorpos anti-HLA



Fonte: O autor (2014)

Para esse estudo foram realizados os testes em 345 amostras correspondentes a mediana de intervalo de tempo em relação ao transplante: 0, 15, 30, 90, 185 e 387 dias (Tabela 1) e outras 44 amostras suplementares nesses intervalos ou associadas a episódios de rejeição. Em cada intervalo de tempo foi selecionada apenas uma amostra com a menor diferença em relação a mediana.

Tabela 1 –Número de amostras por intervalo, em dias, entre o dia da coleta da amostra e o dia do transplante

Amostra	n	Mediana em dias	Minimo	Maximo	Suplementares	n	Mediana em dias	Mínimo	Maximo
0	71	0	-160*	0					
1	70	15	6	24	s1	5	10	6	22
2	66	30	19	42	s2	5	34	19	48
3	52	90	55	131	s3	9	69	57	125
4	45	185	132	294	s4	7	150	135	165
5	41	387	246	565	s5	18	289	240	556
Total	345					44			

* - considerado valor do PRA do soro histórico (SLG=-160d, TSB=-130d e JCCB= -125d) oudomomento da realização da prova cruzada com doador vivo (ABL=-43d,ESO=-32d,JFS=-19d e JFS=-15d).
Fonte: O autor (2014)

A realização dos testes nas amostras selecionadas se deu em dois momentos diferentes no decorrer do estudo. Na primeira fase de realização dos testes, analisamos amostras de 51 pacientes incluídos no estudo, que já tinham coletado as amostras correspondentes até6 meses.

A pesquisa de anticorpos anti-HLAfoi realizada pelostestesLABScreen®(One Lambda, Canoga Park, CA, EUA) que baseia-se na utilização de microesferas revestidas com antígenos HLA purificados.O kit utilizado nessa primeira fase foi o *Single Antigen*® (One Lambda, CanogaPark, CA, EUA) que utiliza microesferas revestidas com um único HLA (SFAB). Os resultados foram considerados positivos para um determinado anticorpo com um valor de fluorescência média (MFI) ≥ 1000. Os anticorpos detectados foram classificados como DSA comparando as suas especificidadessorológicas correspondentes àtipagem do doador nos locos A, B e DRB1, previamente conhecida.

Na segunda fase de processamento das amostras, os testes foram realizados em 2 etapas: na primeira foi realizado um teste de triagem com o kit LS1A04 (LABScreen®Mixed),que detecta simultaneamente a presença de anticorpos anti-HLA de classe I, II e MICA.Os resultados destes testes foram categorizados em função da razão normalizada do*background*(NBG - do inglês, *Normalized Background*) e valores de NBG acima de 10,5 foram considerados elegíveis para realização do teste específico (segunda etapa) com o kit LS2A01(*Single Antigen®)*.A interpretação dos testes foi realizada no *software* HLA Fusion 2.0.9.

4.3 Ensaio Imunológico –Teste das microesferas marcadas - LABScreen®

O soro foi obtido através da coleta de 10 ml de sangue periférico em tubos*vacuntainer* sem anticoagulante. Os tubos foram deixados em repouso até a completa retração do coágulo. Após centrifugação, o soro foi aliquotado em tubos Eppendorf e armazenados a – 70º C até a realização dos ensaios.

Em uma placa com 96 poços, foram incubados 2,5 µl de microesferas com 10 µl de soro-teste em cada poço, durante 30 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz e sob homogeinização constante. Para cada conjunto de testes, foi

utilizado um soro-controle negativo. Todos os dados foram normalizados para cada esfera, de acordo com os resultados do controle negativo.

Após a incubação, foram adicionados 150 µl de tampão de lavagem previamente diluído. A placa foi selada e submetida à homogenização, seguida de centrifugação a 1300 rpm durante 5 minutos. Depois, o tampão da lavagem foi removido com movimento súbito e o procedimento de lavagem foi repetido mais duas vezes.

Foram diluídos anticorpos IgG caprino anti-humano conjugado com PE em tampão de lavagem na diluição de 1:100 (0,5 µl de anticorpo IgG caprino anti-humano conjugado com PE com 49,5 µl de tampão de lavagem para cada poço). Foram adicionados 50 µl dessa solução por poço seguida de homogenização e, só então, foi iniciada a incubação durante 30 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz e sob homogenização constante. Após nova lavagem, foram adicionados 70 µl de PBS. A seguir, o conteúdo da placa de reação foi transferido para a placa de aquisição, com fundo em U, para iniciar a leitura do teste.

A leitura do teste foi realizada em LABScan™100 (Luminex Corporation, Austin, Texas, EUA) que analisa a fluorescência emitida pela PE, bem como, a intensidade colorimétrica emitida por cada microesfera, permitindo a aquisição de dados em tempo real.

A interpretação dos testes foi realizada no software HLA Fusion 2.0.

4.4 **Biópsias Renais**

As biópsias do enxerto foram realizadas pelo Serviço de Nefrologia do HGB, preferencialmente pela via percutânea, e com o auxílio de ultrassonografia. As colorações utilizadas para microscopia óptica foram: hematoxilina-eosina, tricômico de Masson, método de impregnação por sais de prata (PAMS) e com ácido periódico de Schiff (PAS). Os resultados foram classificados de acordo com os critérios da classificação de Banff 2007(45).A pesquisa de C4d foirealizada por imunofluorescência indireta, sendo considerada negativa, mínima, focal ou difusa respectivamente: sem marcação, 1 a 10% dos capilares peritubulares,de 11 a 50% dos capilares peritubulares e > 50% dos capilares peritubulares.

A rejeição aguda mediada por anticorpos foi definida quando estiveram presentes os seguintes critérios além da disfunção aguda do enxerto: lesão histológica compatível com rejeição, depósito de C4d difuso ou focal em capilar peritubular e anticorpo doador específico (DSA) circulante.

4.5 **Análise estatística**

A associação entre variáveis qualitativas foi realizada através do teste Qui-Quadrado ou do teste Exato de Fisher quando as frequências esperadas foram menores que cinco.

As comparações das frequências e médias das variáveis entre os grupos foram realizadas com o teste Qui-Quadrado e considerado $p<0,05$ como estatisticamente significante. Os dados foram analisados utilizando o programa EPI-info (versão 3.5.3).

Os pacientes foram classificados em 3 grupos (Grupo A, Grupo B e Grupo C) de acordo com o risco de desenvolver rejeição mediada por anticorpos (RMA) baseado nos resultados do teste PRA-SAB de classe I e II na amostra do tempo zero (pré-transplante imediato):

Grupo A) receptor de baixo risco: sem DSA;

Grupo B) receptor de médio risco: DSA +, com MFI > 1000 e < 5000; e

Grupo C) receptor de alto risco: DSA +, com MFI >5000 (46).

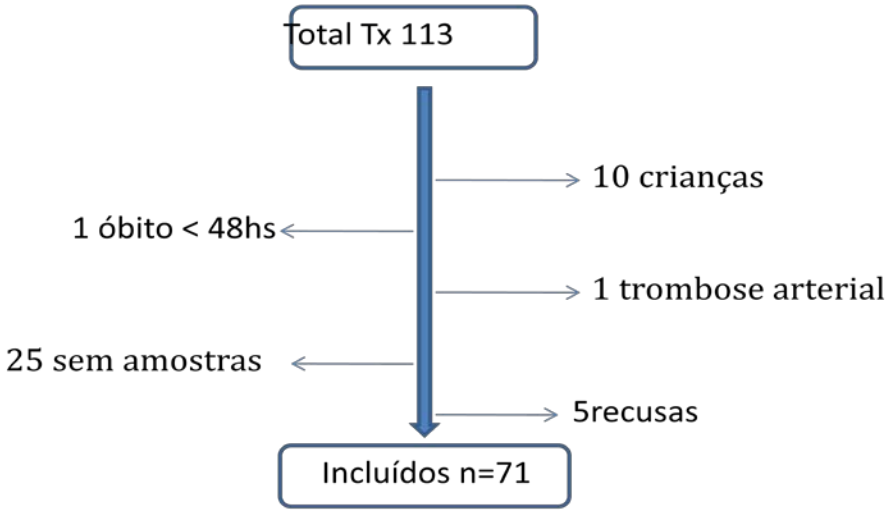
Numa segunda etapa, os pacientes foram novamente divididos em grupos baseados no perfil de mudança nos títulos de anticorpos ao longo do primeiro ano.

5 RESULTADOS

5.1 Pacientes incluídos

No período de inclusão de pacientes no estudo, de março de 2012 a dezembro de 2012, foram realizados 113 transplantes isolados de rim no HFB. Desse total, 42 pacientes não foram incluídos: 10 crianças; 1 paciente com óbito em 48h; 1 com trombose arterial do enxerto nas primeiras 24h;25 sem amostras de soro pré-transplante; e 5recusas.Foram incluídos no estudo 71 pacientes, nesse período, que respeitavam os critérios de inclusão e que consentiram em participar do estudo (Figura 2).

Figura 2 - Pacientes incluídos no estudo



Fonte: O autor (2014)

Foram estudados 45 pacientes do sexo masculino e 26 pacientes do sexo feminino com idade média de 42,8 ± 12,46 anos. Trinta e três (46,4%) foram considerados da raça branca e 38 (53,6%) não brancos[1]. Cinquenta e quatro pacientes (76%) receberam rim de doador falecido enquanto 17 (24%) receberam rim de doador vivo, sendo 13 destes com doador parente e 4 com doador não-

[1]Não foi realizada distinção de negros e mestiços, devido a não padronização dos registros.

parente. As doenças de base mais frequentes foram, respectivamente, nefropatia hipertensiva em 26 (36,6%) pacientes, glomerulonefrite crônica em 17 (23,9%) pacientes e doença indeterminada em 9 (12,7%) pacientes. A nefropatia diabética foi a causa em 5 (7%)pacientes.

Dos 71 pacientes apenas 2 não receberam nenhum tipo de terapia de indução por tratar-se de irmãos HLA idênticos, todos os outros receberam terapia de indução a saber: 52 (73,2%) receberam anticorpo anti-receptor de IL-2 (basiliximab) e 17 (23,9%) receberam anticorpo depletor de linfócitos (timoglobulina). Nos pacientes que foram induzidos com timoglobulina, a indicação foi por maior risco imunológico em 7 pacientes (retransplante, sensibilização prévia PRA> 50%) e por tempo de isquemia prolongada >24hs e/ou características do doador nos 10 pacientes restantes.

Em relação à presença de incompatibilidades (MM - *mismatch*) HLA nos locos A, B e DRB1 foi observada a seguinte distribuição considerado o grupo alélico (0MM, 1 MM e 2 MM): Loco A (4/37/30), Loco B (8/40/23) e Loco DRB1 (31/27/13). Quando comparamos a presença de incompatibilidades entre os grupos de doador vivo e falecido observamos uma melhor compatibilidade estatisticamente significativano loco DRB1 no grupo falecido (p = 0,04).

A taxa de função retardada do enxerto foi de 23% nesse estudo. Infecção por citomegalovírus comprovada com antigenemia positiva foi observada em 11 pacientes (15,5%).

Foram observados episódios suspeitos de rejeição aguda em 14 pacientes, destes obteve-se material para análise histológica em 7 casos. Em 2 casos o diagnóstico foi de rejeição aguda mediada por anticorpos e nos outros cinco casos foram respectivamente: necrose tubular aguda isolada com C4d negativo em 3 casos, infiltrado inflamatório intersticial focal com C4d negativo em 1 caso e nefrite intersticial aguda + necrose tubular aguda com C4d negativo em 1 caso. Nos 7 casos sem material para análise histológica, o diagnóstico de rejeição aguda foi presumido em 4 casos que obtiveram resposta favorável ao pulso de corticosteróide.

Durante o período de observação, 6 pacientes evoluíram com perda do enxerto; 4 pacientes evoluíram para óbito, sendo 1 por causa cardiovascular com enxerto funcionante e 3 por infecção generalizada. Infecção por citomegalovírus comprovada com antigenemia positiva foi observada em 11 pacientes (15,5%).

5.2 **Anticorpos anti-HLApré-transplante**

Em relação à sensibilização imunológica pré-transplante avaliada através de soro histórico: 10 pacientes tinham PRA positivo (≥ 10%) para classe I, sendo em 1 paciente ≥ 50%; 8 pacientes tinham PRA positivo para classe II sendo em 4 pacientes ≥ 50% e 8 pacientes apresentavam PRA positivo simultaneamente para classe I e II. Trinta e seis pacientes (50,7%) tinham transfusão sanguínea prévia com média de 2,8 transfusões por paciente. Do total de 26 pacientes do sexo feminino, 18 (69,2%) tinham gestação prévia com média de 2,4 gestações por paciente. Três pacientes (4,2%) tinham um transplante prévio. Quando comparados receptores de doador vivo ou falecido em relação a esses parâmetros não encontramos diferença estatisticamente significativa.

Dos 51 pacientes avaliados na primeira fase, onde foi aplicado inicialmente o teste *Single Antigen®,*13 apresentavam anticorpos específicos contra doador (DSA). Dentre estes,10 apresentavam somente DSA de classe I, 2 somente DSA de classe II e apenas 1 apresentava DSA de ambas as classes. Dos 20 pacientes avaliados na segunda fase do estudo, 9 pacientes apresentavam positividade no teste de triagem (NBG >10,5), destes 7 realizaram o teste *Single Antigen®.* Dentre estes 7 pacientes,1 apresentou DSA de classe I e 1 de classe II.A média de MFI dos DSA de classe I foi de 6.018 ± 4.958e de classe II foi de 6.673 ± 8.167. As especificidades estão demonstradas na tabela2.Seis pacientes apresentaram DSA anti-HLA-A de 5 especificidades com MFI que variaram de 1.572 a 10.605, sendo que apenas 1 paciente possuía 2 anticorpos anti-HLA-A (antiA2 e A-23), eo anti-A2 estava presente em 3 desses pacientes. Cinco pacientes apresentaram DSA anti-HLA-B de 6 especificidades com MFI que variaram de 1.972 a 19.550, 2 pacientes apresentaram reatividade para os 2 antígenos do doador e o anti-B57 estava presente em 2 pacientes. Dos 4 pacientes que apresentavam anti-HLA-DR, 2 tinham anti-DR52, 1 anti-DR51 e 1 anti-DR53.

Em 2 pacientes não se realizou o teste Single Antigen® pelos seguintes motivos: paciente ABL (HLA idêntico), CSN (óbito precoce por sepse).

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa da presença de DSA entre receptores de doador vivo ou falecido.

Tabela 2 – Anticorpos específicos presentes no pré-transplante imediato

Paciente	Incompatibilidades HLA	DSA	MFI
ASR	A2, A24, DR8	A2	10.605
CMS	A30, A68, B53	A68	5.756
DLS	A2, A30, B15, B18	A30	1.572
FRR	A2, A23, DR7, DR53	A2	1.925
		A23	8.161
		DR7	24.956
		DR53	3.162
JFS	A2, A3, B35, B48, DR9, DR11, DR52	DR11	6.197
		DR52	3.383
JMS	A30, B53, B57, DR13	B53	4.384
		B57	1.979
MECF	A24, B35, DR15	A24	2.887
NCB	B39, DR1	B39	3.342
NMR	A23, B44, DR13	B44	5.220
NRPP	A24, B44, DR1	A24	4.393
ROP	A2, A11	A2	3.821
RCF	A11, A26, B14, B35, DR7, DR14, DR 52	DR7	2.548
		DR52	4.196
SSB	A2, B50, B51	B50	13.010
		B51	19.550
TLSP	A27, B7, DR15, DR51	DR51	2.268
VLMJ	A24, B57	B57	3.658

Single Antigen®

Fonte: O autor (2014)

A divisão dos pacientes nos 3 grupos (Grupo A, Grupo B e Grupo C) de acordo com o risco de desenvolver rejeição mediada por anticorpos (RMA) baseado nos resultados do teste PRA-SAB de classe I e II na amostra do tempo zero (pré-transplante imediato) ficou como segue:

Grupo A) receptor de baixo risco: sem DSA; (N = 56)

Grupo B) receptor de médio risco: DSA +, com MFI > 1000 e < 5000; (N = 9)

Grupo C) receptor de alto risco: DSA +, com MFI >5000; (N = 6)

Os dados demográficos bem como as características clínicas dos pacientes do estudo alocados em seus respectivos grupos estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Dados demográficos e características clínicas dos pacientesem relação ao risco imunológico pré-transplante

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	P
N	56	9	6	
Gênero (F/M) %	28,6/ 71,4	66,7/33,3	66,7 33,3	**0,02**
Raça (branco/não branco) %	50,0/ 50,0	33,3/66,7	33,3/ 66,7	0,51
Média de idade e DP	43,2 ± 12,8	40,7 ± 12,0	42,5 ± 11,0	0,83
Primeiro Tx %	96,4	88,9	100	0,50
Doador (Falecido) %	78,6	66,7	66,7	0,63
Indução %				
Sem	3,6	0,0	0,0	
Basilixmab	75,0	66,7	66,7	0,85
Thimoglobulina	21,4	33,3	33,3	
Mismatch Loco A %				
0	5,4	11,1	0,0	
1	53,5	56,6	33,3	0,67
2	41,1	33,3	66,7	
Mismatch Loco B %				
0	8,9	11,2	33,3	
1	60,7	44,4	33,3	0,36
2	30,4	44,4	33,3	
Mismatch Loco DRB1%				
0	46,4	33,3	33,3	
1	35,7	44,5	50,0	0,91
2	17,9	22,2	16,7	
Gestação prévia (sim %)	19,6	55,6	66,7	**0,01**
Pelo menos 1 Transfusão prévia (sim) %	48,2	77,8	33,3	0,17
Pelo menos 1 Rejeição aguda (clínica) (não/sim)	53/3	8/1	4/2	0,06
RMA (não/sim)	56/0	8/1	5/1	**0,02**

RMA, Rejeição Mediada por Anticorpo. p valor calculado entre os grupos com teste x^2, valores < 0,05 mostrados em negrito.

Fonte: O autor (2014).

Os pacientes dos grupos A, B e C foram semelhantes em relação à idade do receptor, tipo de doador, número de transplantes prévios, tipo de indução, número de incompatibilidades nos Locos A, B e DRB1 e antecedentes de transfusão de hemoderivados. Foi observada uma maior prevalência, estatisticamente significativa, de pacientes do sexo feminino nos grupos B e C (p = 0,02) e de gestações prévias no grupo C (p = 0,01).

Dos 71 pacientes, 56 foram classificados no grupo A. Destes 3 apresentaram episódio de rejeição aguda clínica com resposta ao pulso de metilprednisolona e nenhum apresentou RMA. Dos 9 pacientes alocados no grupo B, um paciente

apresentou episódio de RMA confirmada por biópsia. No grupo C, de um total de 6 pacientes um apresentou episódio de rejeição aguda clínica com resposta ao pulso de corticosteróide e um paciente apresentou RMA confirmada por biópsia. Episódios de RMA foram significativamente mais frequentes no grupo C (p = 0,02).

5.3 **Monitorização dos anticorposanti-HLApós-transplante**

Após a análise dos testes, os pacientes foram divididos em grupos de acordo com o perfil longitudinal de variação nos títulos de anticorpos específicos durante o primeiro ano após o transplante.

Em 50dos 71 (70,4%) pacientes incluídos no estudo a pesquisa de anticorpos específicos contra doador foi negativa durante todo o primeiro ano após o transplante (grupo I).

Vinte e um pacientes (29,6%) dos 71 analisados apresentaram positividade na pesquisa de anticorpos específicos durante o estudo:13 pacientes dos 15 que apresentavam anticorpos pré-transplante diminuíram (n=10) ou mantiveram (n=3) os valores de MFI de anticorpos durante o seguimento (grupoII); dos 8 pacientes que tiveram valores de MFI de anticorpos aumentados ao longo do estudo (grupo III), 6 pacientes não apresentavam anticorpos pré-transplante e considerados, portanto, como anticorpos *de novo.*

Os dados demográficos bem como as características clínicas dos pacientes do estudo alocados em seus respectivos grupos estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados demográficos e características clínicas dos pacientes em relação ao perfil de variação dos títulos de DSA após o transplante

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	P
N	50	13	8	
Gênero (F/M) %	32,0/68,0	61,5/38,5	25,0 / 50,0	0,11
Raça (branco/não branco) %	48,0/52,0	38,5/61,5	0,0/100,0	0,80
Média de idade e DP	43,1 ± 12,5	42,6 ± 11,6	41,6 ± 15,0	0,96
Primeiro Tx %	98,0	92,3	87,5	0,30
Doador (Falecido %)	80,0	69,2	62,5	0,45
Indução %				
Sem	4,0	0,0	0,0	
Basilixmab	76,0	61,5	25,0	0,39
Thimoglobulina)	20,0	38,5	75,0	
Mismatch Loco A %				
0	6,0	7,7	0,0	
1	56,0	53,8	25,0	0,64
2	38,0	38,5	75,0	
Mismatch Loco B %				
0	8,0	15,4	25,0	
1	66,0	46,1	12,5	0,07
2	26,0	38,5	62,5	
MismatchLocoDRB1%				
0	50,0	30,8	25,0	
1	36,0	53,8	25,0	0,10
2	14,0	15,4	50,0	
Gestação prévia (sim) %				
Pelo menos 1	22,0	53,8	25	0,07
Transfusão prévia (sim) %				
Pelo menos 1	48,0	61,5	50	0,68
Rejeição aguda (clínica) (não/sim) %	47/3	12/1	6/2	0,19
RMA (não/sim) %	50/0	13/0	6/2	**0,0003**

RMA, Rejeição Mediada por Anticorpo. p valor calculado entre os grupos com teste x^2, valores< 0,05 mostrados em negrito.

Fonte: O autor (2014).

Os pacientes dos grupos I, II e III foram semelhantes em relação ao gênero, idade, tipo de doador, número de transplantes prévios, tipo de indução, número de incompatibilidades nos Locos A, B e DRB1, antecedentes de gestações e

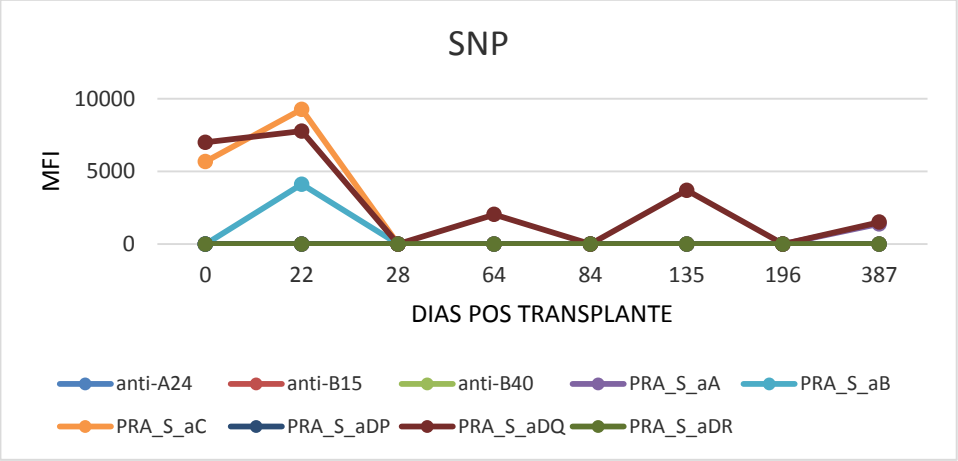
transfusões de hemoderivados.A incidência de RMA foi significativamente maior no grupo III.

5.3.1 Estudo Imunológico dos grupos

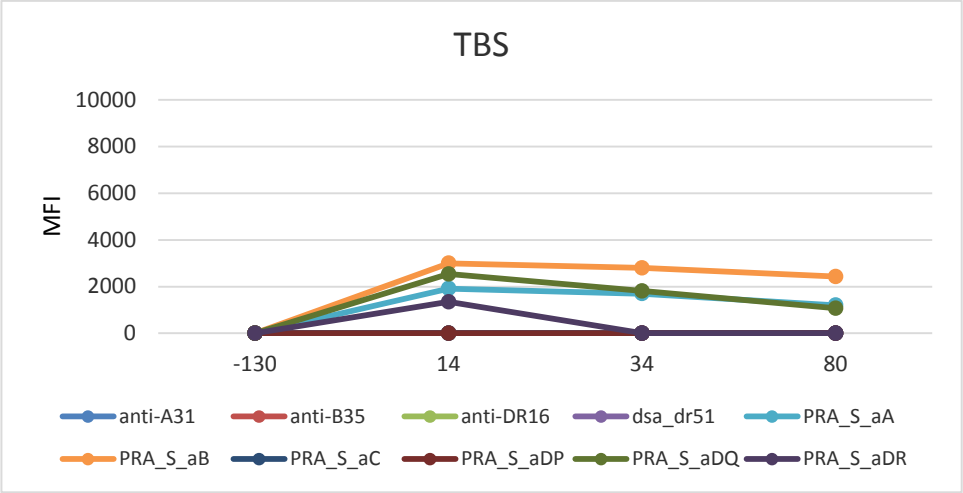
Grupo I

Dos 50 pacientes incluídos nesse grupo, 1 apresentou positividade para DSA de classe I em uma amostra isolada ao longo do estudo com MFI de 463 (<1.000), e portanto considerado negativo.Nesse grupo, 3 pacientes tiveram diagnóstico de rejeição aguda clínica com resposta a pulsoterapia com metilprednisolona. Nos 3 casos o episódio de rejeição ocorreu nos primeiros 30 dias após o transplante. Não foi observada, nesses casos, oscilação significativa no somatório de anticorpos de classe I e/ou II no período. Nenhum paciente apresentou diagnóstico de rejeição humoral. As curvas de valores de MFI dos anticorpos anti-HLA desses 3 pacientes estão representadas na Figura 3.

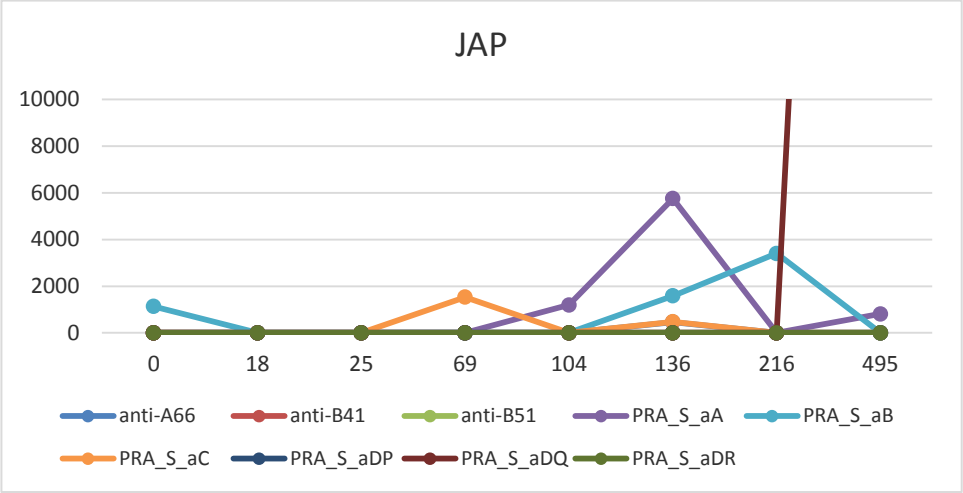
Figura 3 - Curvas dos valores de MFI de anticorpos específicos contra o enxerto (DSA) e dos somatóriosdosanticorpos inespecíficos em cada loco



(a)



(b)



(c)

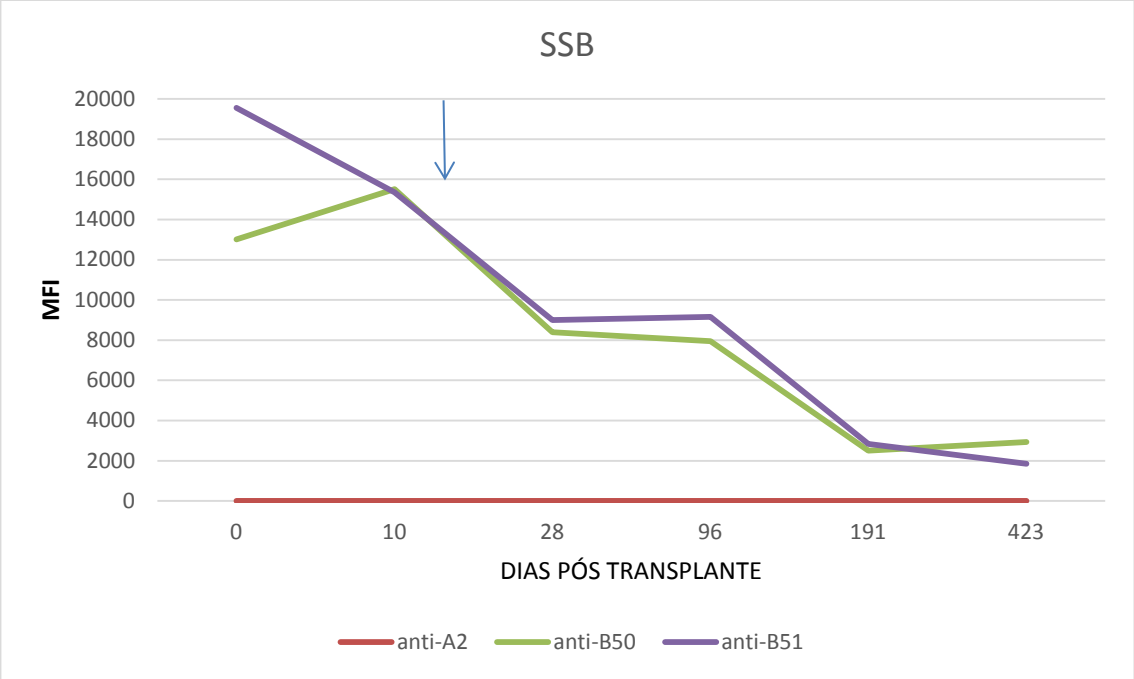
Legenda: (a) paciente SNP, (b) paciente TBS e (c) paciente JAP
Notas: Somatório de MFI anti HLA-DQ não específico de JAP na amostra 216d = 84.934, Valores de MFI na amostra -130d de TBS assumidos como zero a partir do teste LabscreenMixed<4,5NBG.

Grupo II

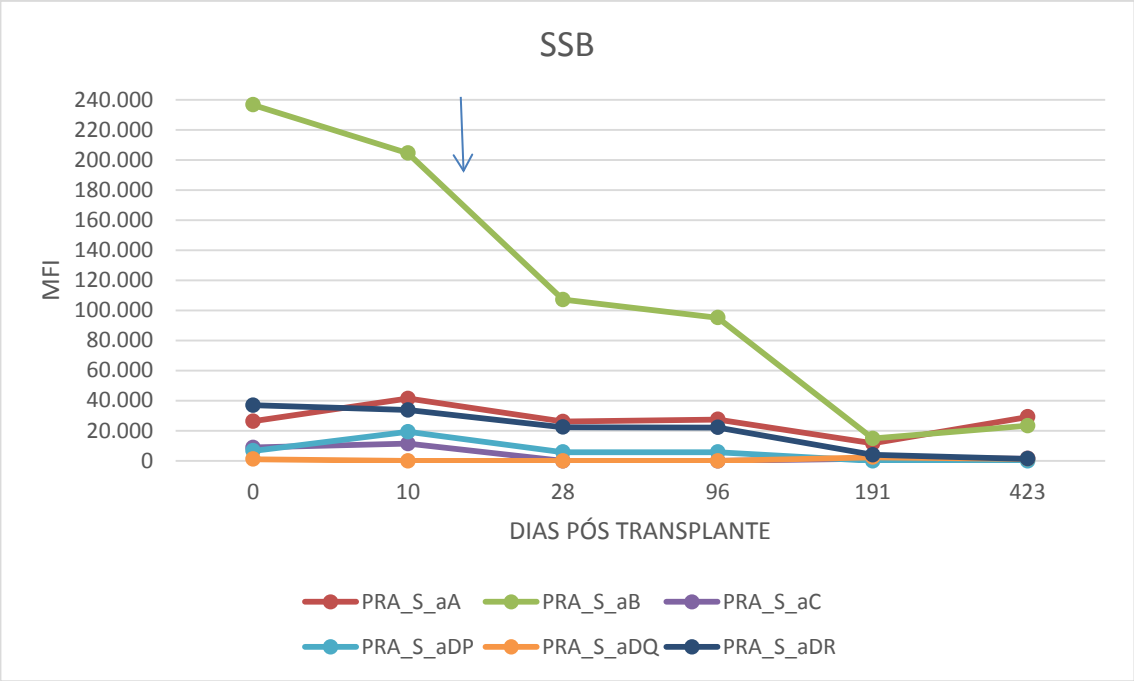
Dez pacientes alocados nesse grupo obtiveram redução dos títulos de DSA durante o acompanhamento. Em 8 pacientes os DSA negativaram (1 com 14d; 3 com 30d; 1 com 2m; 2 com 3m e 1 com 12m). Um paciente evoluiu com perda do enxerto após 45 dias do transplante e a biópsia do enxerto foi compatível com necrose tubular aguda isolada com pesquisa de C4d negativa. Um paciente desse grupo (FRR) teve um aumento no valor de MFI de um anticorpo (DR53) na amostra referente a 14d enquanto os demais DSA, bem como os anticorpos não específicos, diminuíram significativamente até negativarem com 3m. Em outro momento (125d)

houve um novo rebote dos anticorpos porém com valor de MFI muito menor do que no tempo zero e depois voltou a negativar, mostrando que apesar de pequenas flutuações a tendência foi de queda progressiva ao longo do estudo.Um paciente (SSB) apresentou um episódio de rejeição aguda 15 dias após o transplante com resposta favorável ao pulso de metilprednisolona. Os títulos de DSA no momento do diagnóstico da rejeição apresentavam valores semelhantes ao tempo zero (pré-transplante) e depois diminuíram ao longo do estudo permanecendo detectáveis na amostra correspondente a 12m (Figura 4). Pela resposta favorável ao tratamento com corticóide, o episódio foi considerado como rejeição celular aguda.

Figura 4 - Curvas dos valores de MFI de anticorpos específicos contra o enxerto (DSA) (a) e dos somatórios dos anticorpos inespecíficos (b), em cada loco do paciente SSB



(a)



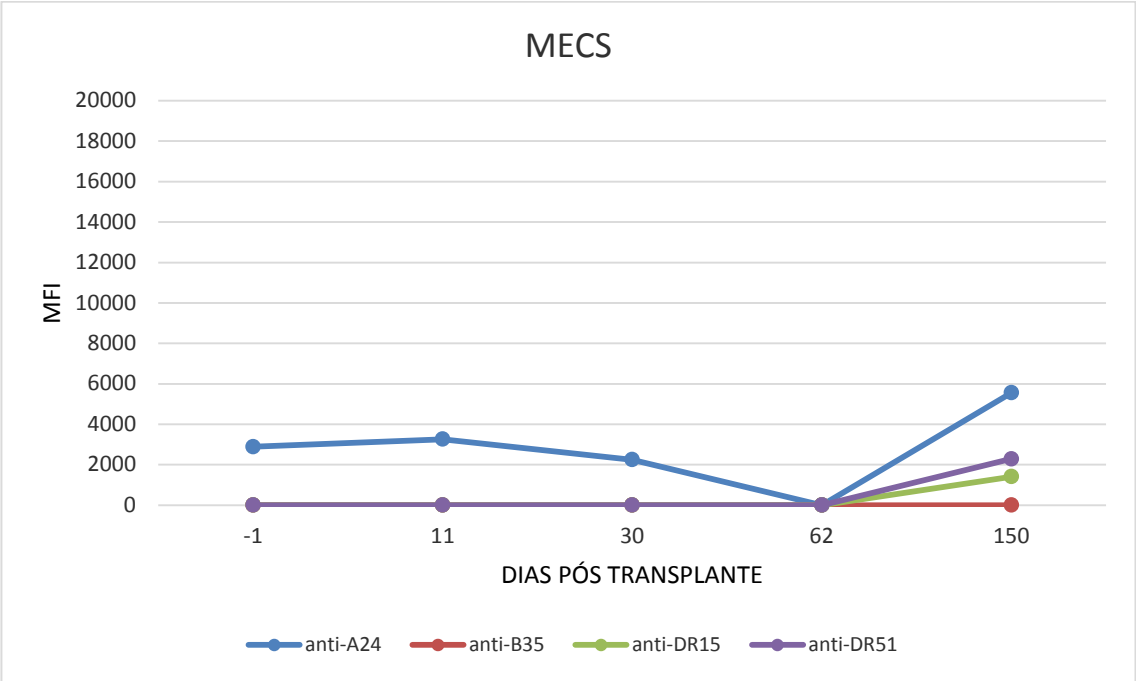
(b)

Nota:As setas indicam o momento do diagnóstico da rejeição

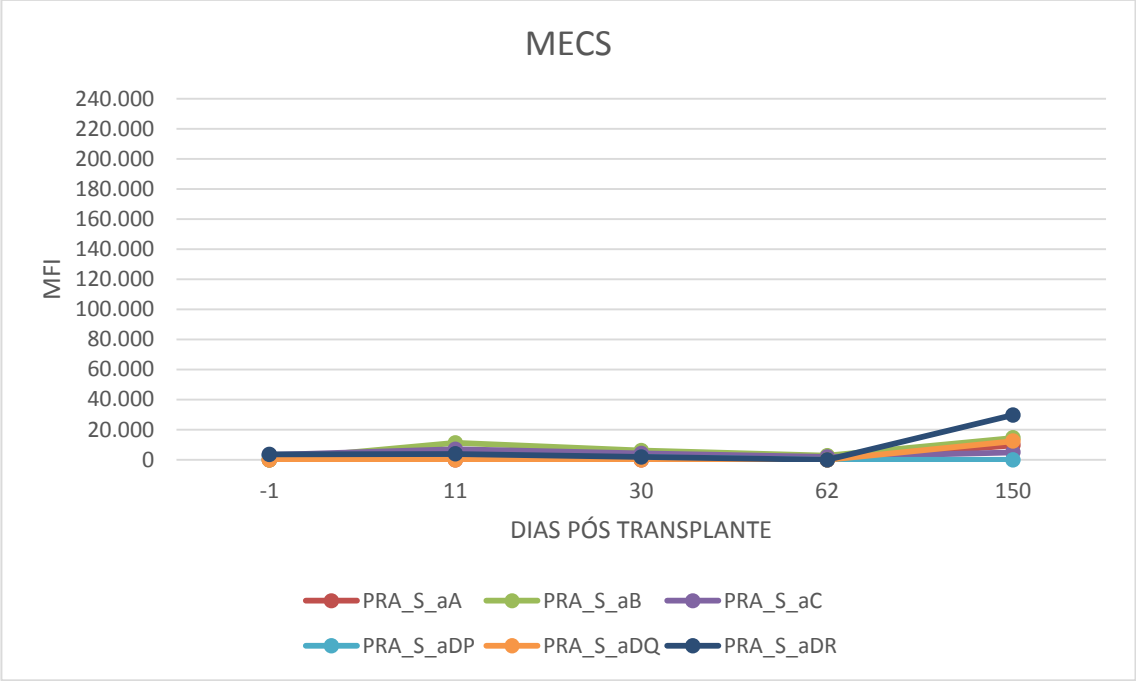
Em 3 pacientes alocados nesse grupo os títulos de DSA permaneceram detectáveis até o fim do acompanhamento em valores semelhantes ao inicial, isto é, sem diminuição dos seus títulos após o transplante. Em 2 pacientes os anticorpos encontrados eram de classe I (A2 e A24) e em 1 paciente de classe II (DR7). Um paciente (MECS) desse grupo retornou para diálise após três meses do transplante com diagnóstico de não função primária do enxerto (Figura 5). A biópsia renal revelou apenas necrose tubular aguda com pesquisa de C4d negativa. Na última amostra coletada desse paciente referente a um tempo de 5meses após o transplante observou-se um aumento tanto dos títulos de DSA quanto de anticorpos não específicos, provavelmente secundário a retirada da imunossupressão. Em nenhum destes 3 pacientes foi observado episódios de rejeição aguda clínica ou comprovada por biópsia.

Nenhum paciente do grupo II apresentou episódio de RMA.

Figura 5 - Curvas dos valores de MFI de anticorpos específicos contra o enxerto (DSA)(a) e dos somatórios dos anticorpos inespecíficos (b), em cada loco do paciente MECS



(a)



(b)

Grupo III

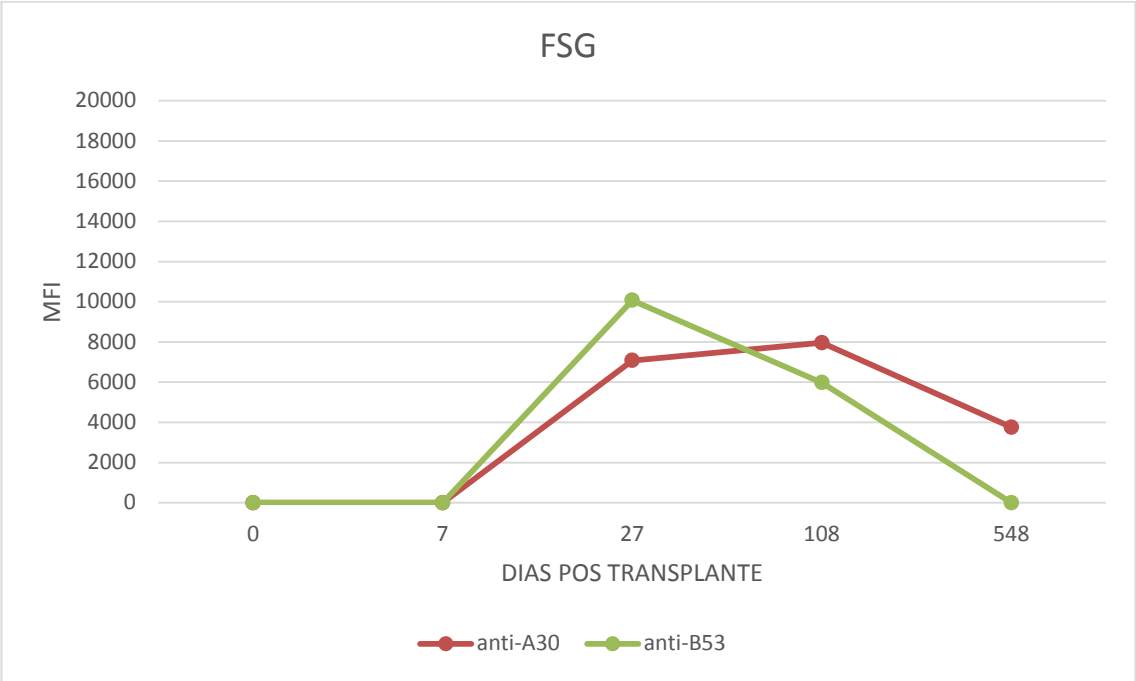
DSA *de novo*

Seis pacientes apresentaram anticorpos DSA *de novo* durante o seguimento.

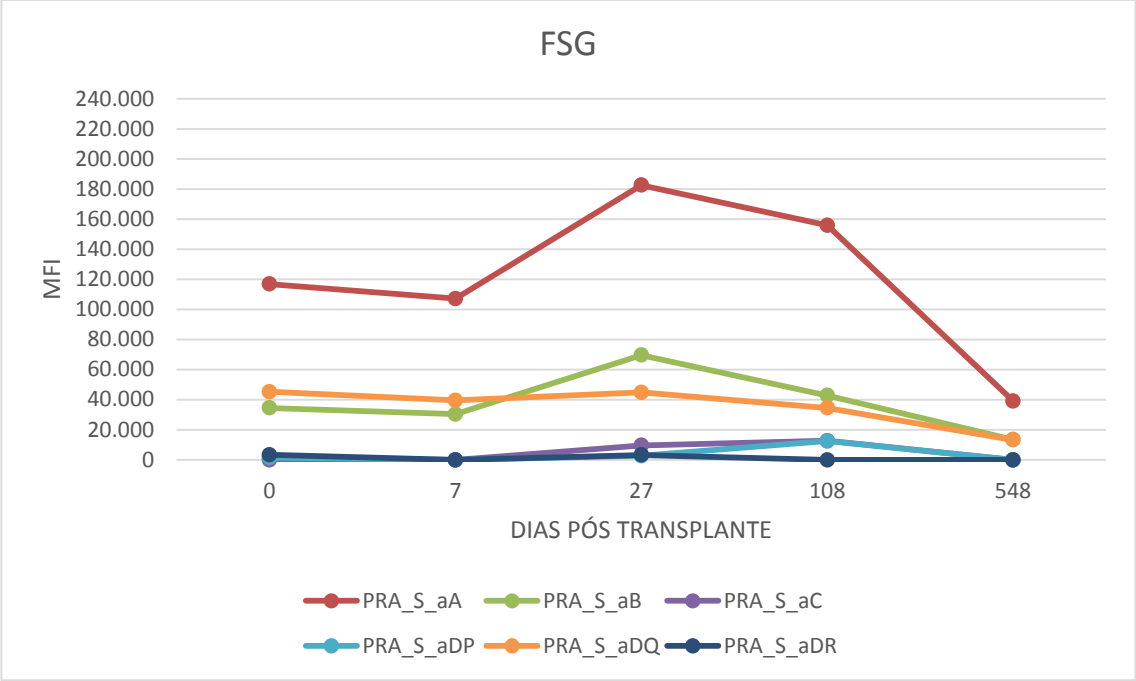
Em 4 pacientes (JNCN, JCCB, WSP e JHLF) os anticorpos foram detectados em apenas uma amostra ao longo do estudo.Paciente JNCN apresentou um anti-B44 (MFI 1.250) com 14d acompanhado de aumento em anticorpos não específicos anti-B e -DQ. Paciente JCCB também apresentou com 14d um anti-B50 (MFI 2.700) acompanhado de aumento em anticorpos não específicos anti-B. O paciente WSP apresentou um anti-B8 (MFI 1.397) com 30d acompanhado de aumento de anticorpos não específicos anti-B, -C e -DP. Nesse paciente o aumento de anticorpos anti-B e DP foram transitórios apenas na amostra de 30d enquanto os anticorpos anti-C permaneceram elevados nas amostras subsequentes. O paciente JHLF apresentou anticorposespecíficosde classe II com 50 dias (DR11 MFI 4.362 e DR14 MFI 4.462) acompanhado de aumento dos anticorpos não específicosanti-B, -C, -DQ, -DP e -DR também transitórios.

Em 2 pacientes os anticorpos foram detectados em mais de uma amostra. No primeiro paciente (FSG) os anticorpos encontrados foram anti-A30 (MFI 7.080) e anti-B53 (MFI 10.089) detectados na amostra com 27 dias (30d). Na amostra do dia 108 (3m) permaneciam presentes em títulos altos MFI 7.096 e 5.977 respectivamente, e na amostra de 548 dias (12m) os títulos diminuíram para MFI 3.753 e 0. A variação nestas datas, foi acompanhada pela elevação em anticorpos não específicos anti-HLA-A, -B e também anti-HLA-C, -DP. O paciente apresentava na amostra pré-transplante títulos muito altos (MFI > 10.000) para anti-DQ2, DQ4 e DQ7, porém, houve queda dos valores de MFI para anticorpos inespecíficos para anti-HLA-DR e mesmo para os anti-DQ (Figura 6).

Figura 6 - Curvas dos valores de MFI de anticorpos específicos contra oenxerto (DSA) (a) e dos somatórios dos anticorpos inespecíficos (b), em cada loco do paciente FSG



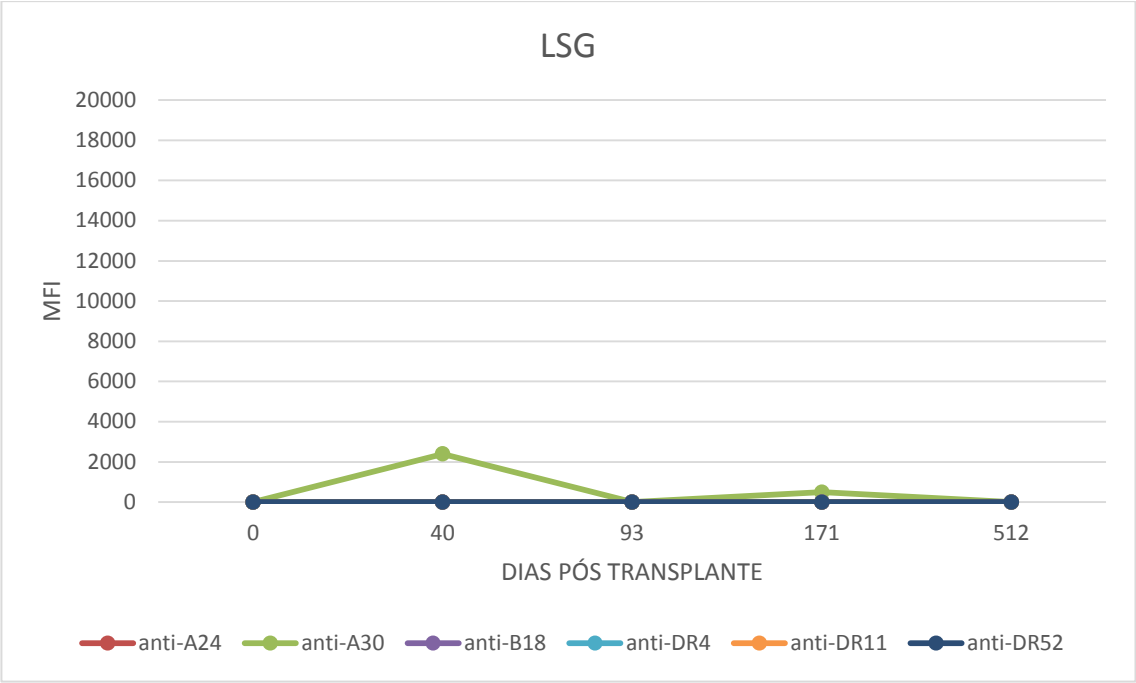
(a)



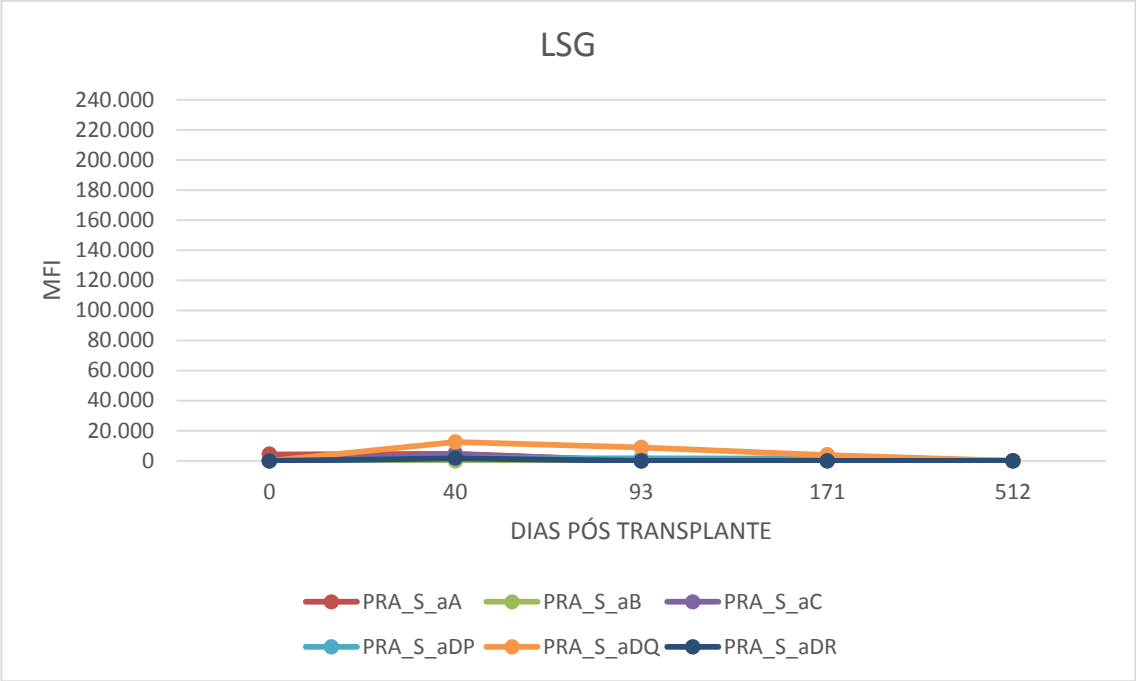
(b)

No segundo paciente (LSG), o anticorpo detectado foi um anti-A30 (MFI 2.393) na amostra de 43 dias (30d). Na amostra de 93 dias (3m) o anticorpo não foi mais detectado e na amostra de 171 dias (6m) foi detectado, porém, em título baixo (MFI 496). A presença de anticorpos anti-HLA-C, -DQ e –DP, com elevação também na amostra de 43 dias, foi também detectada e acompanhou a queda das amostras subseqüentes (Figura 7).

Figura 7 - Curvas dos valores de MFI de anticorpos específicos contra o enxerto (DSA) (a) edos somatórios dos anticorpos inespecíficos (b), em cada loco dopacienteLSG



(a)



(b)

Nenhum dos pacientes apresentou episódio de rejeição aguda no primeiro ano após o transplante.

<u>Elevação dos títulos de DSA em pacientes com DSA na amostra pré-transplante</u>

Os dois pacientes nessa categoria apresentaram aumento nos títulos de DSA durante o estudo observados na amostra referente a 14d pós transplante.

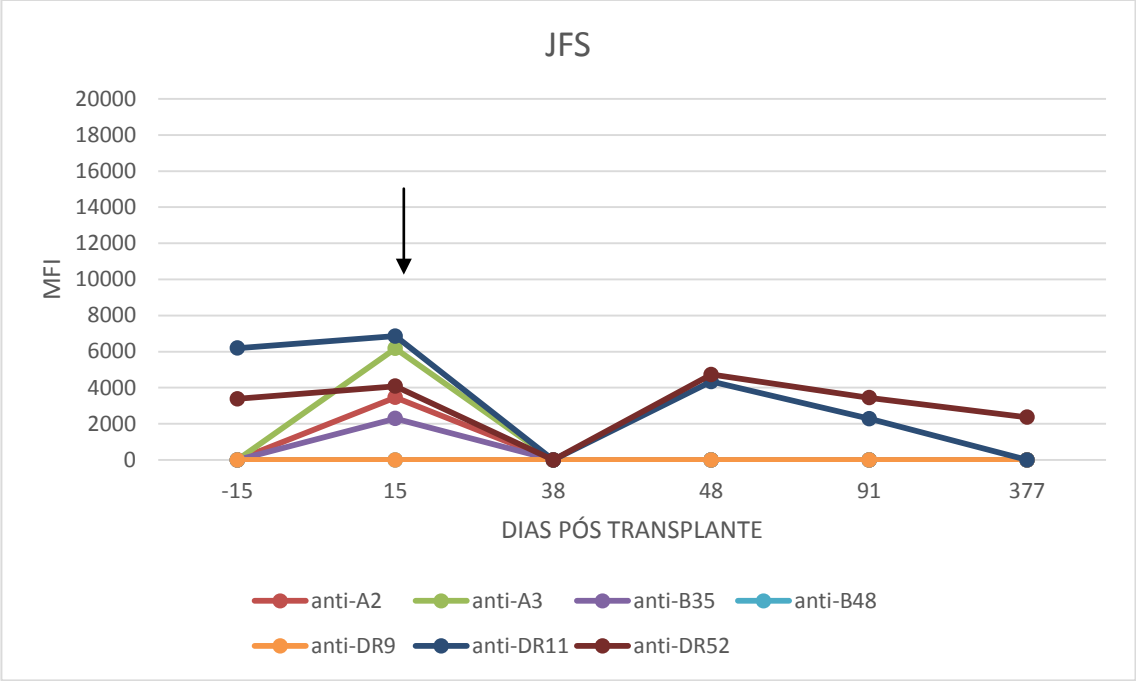
A primeira paciente (JFS) apresentava na amostra pré-transplante apenas DSA de classe II (DR11 e DR52), no seguimento apresentou aumento nos títulos do DSA - DR11 bem como surgimento de DSA de classe I (A2, A3 e B35). A presença de reatividade na amostra de 15 dias para DQ7, 8 e 9, sugere a presença de anti-DQ*de novo.*

A segunda paciente (ROP) apresentava apenas um DSA de classe I (A2), e no seguimento evoluiu com aumento no título do DSA - A2 bem como surgimento de outro DSA também de classe I (A11). Os valores de MFI já eram elevados para anti-HLA-C (anti-Cw7, MFI 3.608), -DQ (anti-DQ4, DQ-5 e DQ-6, MFI 2.000, 6.322 e 6.722, respectivamente) e –DP (anti-DP23, MFI 1.402) na amostra pré-transplante que se elevaram nas amostras subseqüentes, com o surgimento de novas

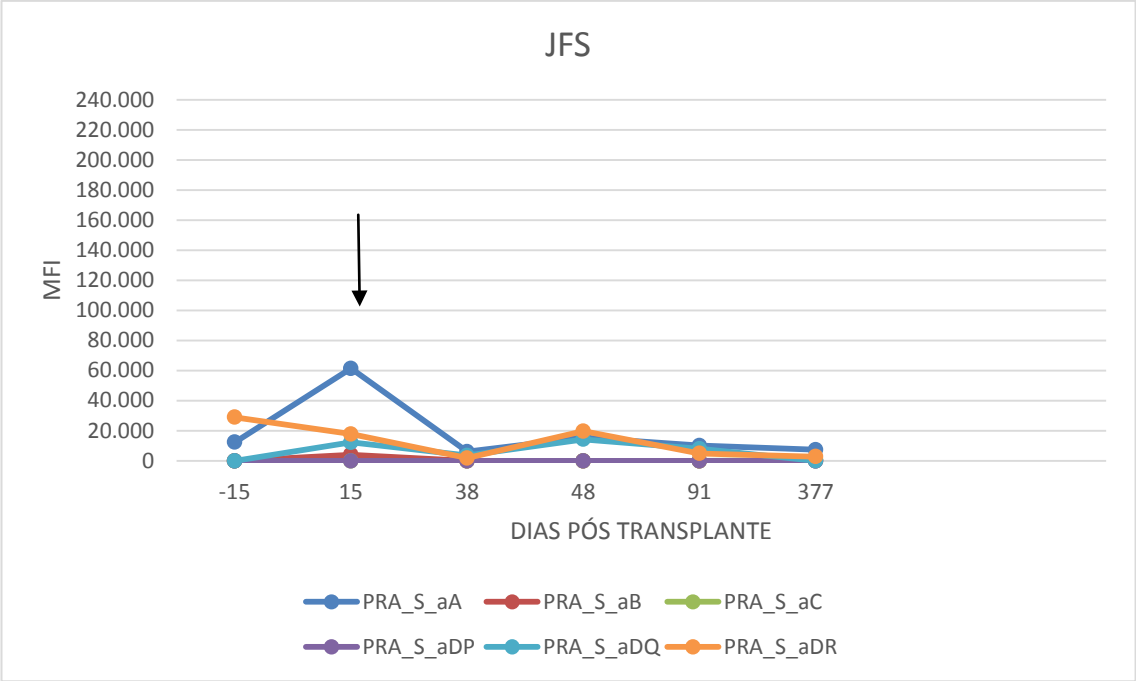
especificidades. Na amostra do dia 469 (12m), a reatividade para DQ5 e DQ6 foi respectivamente de 3.153 e 6.846.

Ambas as pacientes evoluíram com disfunção aguda do enxerto sendo realizado biópsia renal com diagnóstico de rejeição aguda mediada por anticorpos, com pesquisa de C4d positiva difusa em capilar peritubular. Os pacientes foram tratados de acordo com protocolo de tratamento de rejeição humoral do serviço que consistiu de sessões de plasmaferese e imunoglobulina. Ambas obtiveram boa resposta ao tratamento com diminuição progressiva dos títulos de anticorpos DSA e recuperação da função do enxerto. A relação temporal entre a variação dos títulos de DSA e o episódio de rejeição aguda podem ser observados na Figura 8 e 9.

Figura 8 - Curvas dos valores de MFI de anticorpos específicos contrao enxerto (DSA) (a) e dos somatórios dos anticorpos inespecíficos (b), em cada loco do paciente JFS



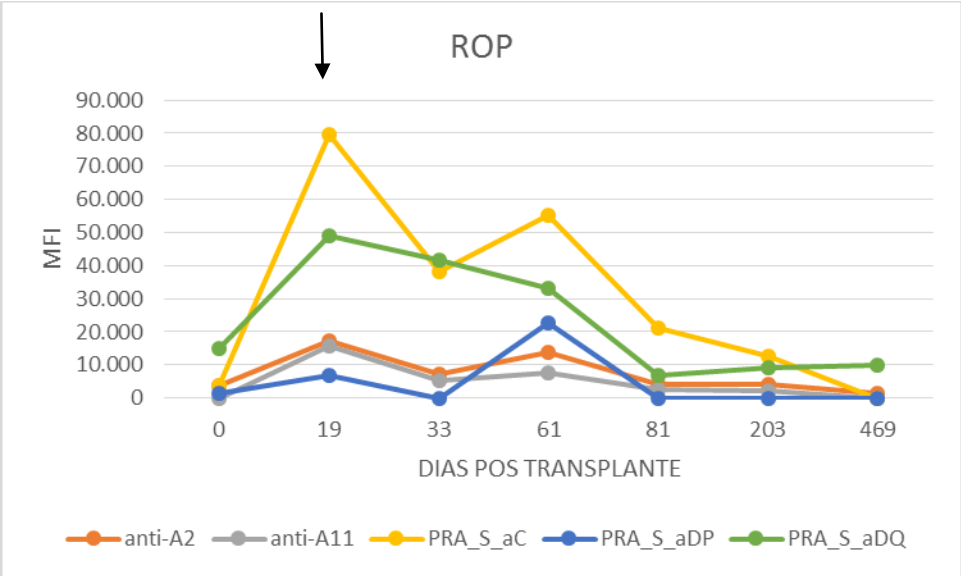
(a)



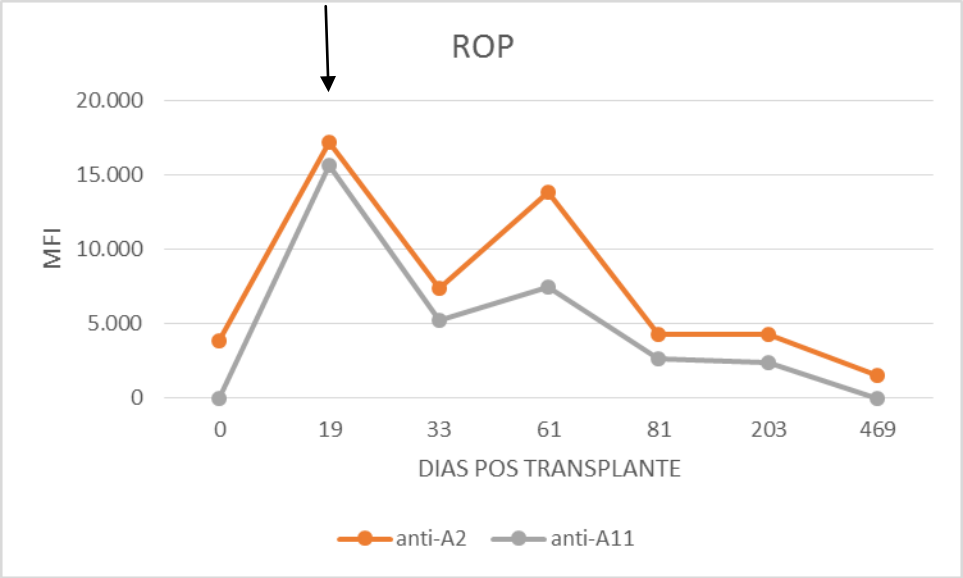
(b)

Notas: As setas indicam o momento do início do tratamento após o diagnóstico da rejeição

Figura 9 - Curvas dos valores de MFI de anticorposespecíficos contra o enxerto (DSA)(a) e dos somatórios dos anticorpos inespecíficos (b), em cada loco do paciente ROP



(a)



(b)

Notas: As setas indicam o momento do início do tratamento após o diagnóstico da rejeição.

5.3.2 Sobrevida do enxerto e dos pacientes em 1 ano

Durante o período de observação, 6 pacientes evoluíram com perda do enxerto; 4 pacientes evoluíram para óbito, sendo 2 por causas cardiovasculares com enxerto funcionante e 2 por sepse em diálise. A sobrevida global dos pacientes no período de acompanhamento foi de 94,3%. A sobrevida do enxerto em 1 ano foi de 88,2%. Quando comparamos a sobrevida do enxerto nos diferentes grupos A, B e C não encontramos diferença significativa (p = 0,40). O mesmo aconteceu quando comparamos a sobrevida do enxerto nos grupos I, II e III (p = 0,69).

5.3.3 Valor de creatinina e Taxa de Filtração Glomerular (TFG) em 1 ano

Quando comparamos a média da creatinina sérica e a depuração de creatinina avaliada pela fórmula MDRD aos 12 meses entre os grupos A, B e C não encontramos diferença estatisticamente significativa, respectivamente p = 0,45 e p =

0,24. Em relação aos grupos I, II e III também não encontramos diferença estatisticamente significativa, respectivamente p = 0,27 e p = 0,42.

Ao final de um ano de acompanhamento detectamos uma diferença estatisticamente significante na depuração de creatinina entre os pacientes que tiveram episódios de rejeição aguda e os que não tiveram (38,99 ± 20,64 ml/min/ 1,73 m^2vs 56,74 ± 12,76 ml/min/ 1,73 m^2; p = 0,04).

6DISCUSSÃO

O diagnóstico de rejeição aguda do enxerto renal é habitualmente realizado pela elevação da creatinina seguida da identificação de sinais de lesão imunológica na biópsia renal. A ocorrência de episódios de rejeição aguda está relacionada a uma menor sobrevida do enxerto e, portanto, a identificação de marcadores biológicos que permitam o diagnóstico precoce da rejeição podem ser úteis nesse contexto. Já foi demonstrado anteriormente (29) que a detecção dos anticorpos anti-HLA, em muitos casos, precedeu a elevação da creatinina e perda do enxerto e, com esse propósito, muitos centros transplantadores estão instituindo protocolos de monitorização de anticorpos anti-HLA no pós transplante renal (47).

Nesse estudo nós acompanhamos pacientes transplantados renais com doadores vivos e falecidos durante o primeiro ano após o transplante. Embora classicamente os receptores de transplante renal com doador vivo sejam menos sensibilizados e apresentem melhor compatibilidade HLA (48), não encontramos diferença estatisticamente significativa entre receptores de doador vivo ou falecido, em relação à sensibilização pregressa. Já em relação à compatibilidade HLA, observamos uma maior compatibilidade no loco DRB1 nos receptores de doador falecido. A provável explicação para esse achado reflete a atual política de alocação de rins de doador falecido; a seleção do melhor receptor é baseada numa pontuação que leva em consideração a compatibilidade HLA entre a dupla doador e receptor nos locos A, B e DRB1, sendo que, a compatibilidade no loco DRB1 é aquela que recebe a maior pontuação (49).

Um achado interessante do estudo foi o registro da presença de anticorpos anti-HLApré-transplante em 10 pacientes, que na avaliação inicial não se identificaram registros de possível sensibilização prévia. Dentre esses pacientes, 4 apresentavam anticorpos anti-HLA classificados como DSA e em 3 destes pacientes os DSA permaneceram detectáveis durante o estudo com valores de MFI semelhantes aos iniciais. Embora uma explicação possível seja a presença de erros nos registros de prontuário, a utilização de SAFB para detecção de anticorpos anti-HLA pode revelar presença de anticorpos em indivíduos sem sensibilização prévia (50). Esse estudo avaliou a presença de anticorpos anti-HLA em pacientes em fila para transplante renal e, revelou que, enquanto 84% dos pacientes com

antecedentes de sensibilização eram SAFB positivos, 77% dos pacientes sem esses antecedentes também eram SAFB positivos. Esses resultados sugerem que muitas reações detectadas por esse método são, na verdade, falso positivos, possivelmente pela ligação de anticorpos com moléculas de HLA desnaturadas presentes no ensaio (51). O fato desses anticorpos persistirem detectáveis após o transplante, no nosso estudo, poderia ser interpretado como falso positivos e por isso não tenham sofrido influência dos imunossupressores. Dessa forma, uma análise conjunta dos resultados destes testes com outros métodos de detecção de anticorpos e da história de sensibilização prévia é fundamental para uma melhor avaliação do risco imunológico de um potencial receptor. Por outro lado, foi demonstrado em um estudo recente (52) que a presença de anticorpos anti-HLA, em pacientes sem sensibilização prévia,esteve associada a episódios de RMA, porém com desfechos favoráveis em um ano. No nosso estudo estes pacientes não apresentaram episódios de rejeição.

Observamos um risco aumentado de RMA em pacientes com títulos elevados de DSA pré transplante (alto risco imunológico). Entretanto, três pacientes com títulos considerados muito elevados de DSA pré-transplante (>10.000 de MFI) apresentaram evolução livre de RMA. Em contrapartida, uma das pacientes que evoluiu com RMA não apresentava títulos considerados muito elevados de DSA pré-transplante (MFI de 3.821). Esse achado demonstra que a RMA pode ocorrer com vários níveis de DSA pré-transplante, e que embora níveis crescentes de anticorpos geralmente se associem a um maior risco de RMA a sua ocorrência ainda é imprevisível.

Nesse estudo nós observamos que a minoria dos pacientes com DSA, detectados apenas por SAFB, pré-transplante evoluíram com RMA e, portanto, a utilização desses resultados isoladamente na tomada de decisão clínica não é recomendado . Esse achado está em acordo com resultados de estudos anteriores (53).

Um achado interessante do estudo foi que os dois pacientes que apresentaram RMA tiveram elevação dos títulos de DSA, em relação ao tempo zero (pré-transplante). Em ambos os casos a RMA ocorreu precocemente na evolução do transplante, por volta da segunda semana após o transplante, momento em que foi também realizada a biópsia do enxerto para confirmação diagnóstica. Nestes dois casos procedemos à pesquisa de DSA na amostra de 7 dias e observamos também

elevação dos títulos de DSA em relação à amostra do tempo zero. Esse aumento dos títulos de DSA poderia ser explicado pelo recrudescimento da memória imunológica a partir da geração de células B de memória que se diferenciam em plasmócitos secretores de anticorpos. Estudos anteriores (54) demonstraram uma correlação linear entre títulos de DSA circulantes e grau de lesão histológica no enxerto e também sugerem que exista um nível de DSA acima do qual a ocorrência de RMA pode ser esperada. Um outro estudo (55) aplicou o SAFB em eluatos obtidos de biópsias de enxerto realizadas por indicação para detecção *in situ* de DSA. Os autores observaram uma correlação significativa entre a presença de DSA *in situ* e marcadores histológicos de RMA. Essa associação não foi observada naqueles que apresentavam apenas DSA circulante no soro. Entretanto, nem todos os pacientes que desenvolvem anticorpos após o transplante evoluem com rejeição. Alguns enxertos podem entrar num processo de acomodação (56) em que, mesmo com a ligação de anticorpos ao endotélio do enxerto, não ocorre injúria imunológica. Os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão totalmente esclarecidos, mas parecem envolver uma interrupção da ativação da cascata de complemento. A partir dessas observações, nós acreditamos que a pesquisa seriada de DSA poderia revelar um perfil imunológico de alto risco para ocorrência de RMA, naqueles pacientes com elevação progressiva dos valores de MFI dos anticorpos. Nossos resultados também sugerem que a monitorização dos anticorpos anti-HLA deva ser iniciada já nos primeiros dias após o transplante, principalmente nos pacientes previamente sensibilizados.

Quando avaliamos a variação dos anticorpos anti-HLA totais (NDSA) percebemos que ela acompanhou, na maioria das vezes, a curva do DSA. Isso pode ser explicado pela reatividade cruzada contra epítopos da molécula de HLA de classe I e II presentes no doador (57).

Também observamos que a maioria dos pacientes com DSA pré-transplante apresentaram redução progressiva dos seus títulos ao longo do acompanhamento, inclusive com o desaparecimento dos anticorpos em 8 pacientes (53%). Essa redução dos títulos de anticorpos poderia ser explicada pela ação das medicações imunossupressoras. No entanto, os esquemas de imunossupressão convencionais tem pouco impacto na atividade de plasmócitos produtores de anticorpos e uma outra explicação possível seria a absorção de anticorpos pelo enxerto (58) ou o bloqueio desses anticorpos por anticorpos antidiotípicos (59). Em um paciente

enquadrado nesse perfil (redução dos títulos de anticorpos) foi diagnosticado um episódio de rejeição aguda celular. Nenhum episódio de RMA foi diagnosticado nesse grupo.

Em relação à classe do DSA encontrado, nosso estudo observou uma maior prevalência de anticorpos de classe I (13 dos 15 pacientes com DSA pré-transplante e 5 dos 6 pacientes com anticorpos *de novo*). Embora alguns autores (60, 61) já tenham mostrado o impacto da presença de anticorpos de classe II na sobrevida do enxerto a longo prazo, no nosso estudo apenas DSA de classe II detectados simultaneamente com DSA de classe I foram associados a episódios de RMA. A primeira paciente (JFS) com diagnóstico de RMA apresentava apenas DSA de classe II na amostra pré-transplante. No momento do diagnóstico da rejeição foram detectados anticorpos de classe I *de novo* e apareceram novas reatividades de classe II sugerindo presença de DSA de classe II *de novo* também. Na segunda paciente (ROP), foram detectados apenas DSA de classe I tanto pré-transplante como no momento do diagnóstico da rejeição. Entretanto, devido ao número reduzido de episódios de RMA detectados neste estudo não podemos tirar conclusões deste achado.

O surgimento de anticorpos *de novo* no pós-transplante está relacionado a episódios de rejeição aguda, crônica e menor sobrevida do enxerto (29, 62, 63). No nosso estudo, não foram detectados episódios de rejeição aguda nospacientes que desenvolveram DSA *de novo*. Como possíveis explicações para esse achado destacamos: a não realização de biópsias protocolares que poderia deixar de diagnosticar a presença de rejeição subclínica e o tempo de exposição curto a esses anticorpos, uma vez que na maioria dos pacientes, foi detectado em apenas uma ocasião e portanto considerados transitórios. O acompanhamento de um ano, realizado nesse estudo, é um período curto para detecção de rejeição crônica e para avaliação de sobrevida do enxerto.

Nesse estudo a sobrevida global dos pacientes foi de 94,3% e sobrevida do enxerto em um ano de 88,2%. Dos 4 óbitos registrados, 3 ocorreram precocemente no primeiro mês, e um no quarto mês. Nenhum paciente que evoluiu com óbito apresentou rejeição aguda. Quando comparamos a TFG ao final de um ano entre os grupos avaliados não encontramos diferença estatisticamente significativa. Embora pudéssemos argumentar que a presença isolada do anticorpo no pós transplante não tenha sido determinante para impactar na função do enxerto, o tempo curto de

acompanhamento não é suficiente para tirarmos conclusões deste achado. Por outro lado, quando avaliamos os pacientes que apresentaram ou não rejeição aguda, observamos uma diferença estatisticamente significativa com valores de TFG mais baixos nos primeiros já no fim do primeiro ano. Esse achado está em acordo com estudos anteriores corroborando o impacto negativo da rejeição aguda na função do enxerto (64).

Por fim, observamos nesse estudo que os dois casos de RMA que foram tratados com sessões de plasmaferese e imunoglobulina tiveram evolução favorável com recuperação da função do enxerto. Esse tratamento é atualmente considerado o padrão ouro para tratamento da RMA (65). Em ambos os casos, houve uma redução progressiva dos títulos de DSA com o tratamento que se manteve durante o período de acompanhamento. A monitorização seriada dos anticorpos também se mostrou útil no acompanhamento do tratamento da RMA.

CONCLUSÃO

a) A presença de DSA pré-transplante, detectada por SAFB em pacientes com prova cruzada por CDC negativa, está associada a um maior risco de RMA.
b) A monitorização prospectiva desses anticorpos após o transplante pode indicar pacientes com maior risco de evoluir com RMA de acordo com a variação nos títulos de anticorpos:aumento nos valores de MFI DSA pode ser interpretado como um sinal de alerta. Os pacientes que se enquadram nesse perfil podem ser elegíveis à realização de procedimentos diagnósticos para identificação de sinais de injúria imunológica no enxerto e a mudanças no esquema imunossupressor.Os pacientes que evoluem com redução progressiva nos títulos de anticorpos,ao longo do primeiro ano, apresentam baixo risco de desenvolver RMA.
c) A monitorização deve ser iniciada logo nos primeiros dias após o transplante nos pacientes previamente sensibilizados.
d) A presença de DSA isoladamente não foi associada à pior função do enxerto ao final de um ano.

REFERÊNCIAS

1. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. Lancet.2012; 379:165-180.

2. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO). *Registro Brasileiro de* Tranplantes.[acesso em 12 abr. 2014].2013. Disponível em:www.abto.org.br.

3. Amico P. Evolution of graft survival in kidney transplantation: an analysis of the OPTN/UNOS Renal Transplant Registry. ClinTranspl.2010: 1-15.

4. Mauiyyedi S, Colvin RB. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. CurrOpinNephrolHypertens.2002; 11:609-18.

5.Moraes JR, Stastny P. A new antigen system expressed in human endothelial cells.JClin Invest. 1977; 60(2): 449-54.

6 .Glotz D, Lucchiari N, Pegaz-Fiornet B et al. Endothelial cells as targets of allograft rejection.Transplantation. 2006;82(1 Sppl): S19-21.

7. Dragun D, Müller MD, Bräsen JH et al. Angiotensin II type 1-Receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. N Engl J Med. 2005; 352(6):558-69.

8. Zwirner NW, Marcos F, Mirbaha F et al. Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. Hum Immunol. 2000;61(9): 917-24.

9. Scornik JC, Ireland JE, Howard RJ et al. Assessment of the risk for broad sensitization by blood transfusion. Transplantation,1984; 37 (3): 249-53.

10. Racusen LC, Colvin RB, Solez K et al. Antibody- mediated rejection criteria: An addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. Am J Transplant.2003; 3: 708-14.

11. Racusen LC, Halloran PF, Solez K. Banff 2003 meeting report: new diagnostic insights and standards. Am J Transpl. 2004; 4(10): 1562-6.

12. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. Kidney Int. 1993; 43 (6): 1333-8.

13. Bohmig GA, Exner M, HabichtA et al.Capillary C4d deposition in kidney allografts: A specific marker of alloantibody-dependent graft injury. J Am SocNephrol.2002;13: 1091-9.

14. Haas M, Rahman MH, Racusen LC et al. C4d and C3d staining in biopsies of ABO- and HLA-incompatible renal allografts: Correlation with histologic findings. Am J Transplant.2006;6: 1829-40.

15. Solez K, Racusen LC, Sis B et al. Banff ’05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy (‘CAN’). Am J Transplant.2007; 7(3): 518-26.

16. Patel R, TerasakiPI.Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. N Engl J Med. 1969; 280 (14): 735-9.

17. Amos DB, Bashir H, Boyle W et al. A simple microcytotoxicitytest.Transplantation. 1969; 7(3): 220-3.

18. Johnson AH,Butler WT. Detection of alloantibodies using a sensitive antiglobulinmicrocytotoxicity test: identification of low levels of pre-formed antibodies in accelerated allograft rejection. Tissue Antigens. 1972;2(3): 215-26.

19. Zachary AA, Klingman L, Thorne N et al. Variations of the lymphophocytotoxicity test. An evaluation of sensitivity and specificity.Transplantation. 1995; 60(5): 498-503.

20. Bray RA. Flow citometrycrossmatching for solid organ transplantation. Methods Cell Biol. 1994; 41: 103-19.

21. Susskind B. Methods for histocompatibility testing in the early 21st century. CurrOpin Organ Transplant.2007; 12: 393-401.

22. Worthington JE, Robson AJ, Sheldon S et al.A comparison of enzyme-linked immunoabsorbent assays and flow cytometry techniques for the detection of HLA specific antibodies.Hum Immunol.2001;62: 1178–84.

23. Sumitran-Karuppan S, Moller E. The use of magnetic beads coated with soluble HLA classI and II proteins in antibody screening and for specificity determination of donor- reactive antibodies.Transplantation. 1996; 61(10): 1539-45.

24. Halloran PF, Schlaut J, Solez K etal.The significance of the anti-class I antibody response. II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class Ilike antibody. Transplantation.1992; 53: 550–5.

25. Trpkov K, Campbell P, Pazderka F et al. Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody, analysis using the Banff grade schema. Transplantation.1996;61(11):1586-92.

26. Crespo M, Pascual M,Tolkoff-Rubin N et al. Acute humoral rejection in renal allograft recipients: I. Incidence, serology and clinical characteristics. Transplantation.2001; 71: 652-8.

27. Zhang Q, Liang LW, Gjertson DW et al. Development of posttransplantantidonor HLA antibodies is associated with acute humoral rejection and early graft dysfuntion. Transplantation. 2005; 79(5): 591–8.

28. Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI et al. Frequency and clinical implications of development of donor specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. J Am SocNephrol. 2005; 16(9): 2804-12.

29. Mao Q, TerasakiPI, Cai J et al. Extremely high association between appearance of HLA antibodies and failure of kidney grafts in a five-year longitudinal study. Am J Transplant.2007; 7:864-71.

30. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation.Am J Transplant. 2003;3(6): 65-73.

31. Lashmann N, Terasaki PI, Budde K et al. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminexposttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. Transplantation.2009; 87:1505-13.

32. Bielmann D, Honger G, Lutz D et al. Pretransplant risk assessment in renal allograft recipients using virtual crossmatching. Am J Transplant.2007; 7: 626-32.

33. Taylor CJ, Kosmoliaptsis V, Summers DM et al. Back to the future: application of contemporary technology to long-standing questions about the clinical relevance of HLA-specific alloantibodies in renal transplantation. Hum Immunol.2009; 70: 563.

34. Patel AM, PancoskaC,Mulgaonkar S et al. Renal transplantation in patients with pre-transplant donor-specific antibodies and negative flow cytometrycrossmatches. Am J Transplant.2007; 7: 2371-77.

35. Amico P, Honger G, Mayr M et al. Clinical relevance of pretransplant donor-specific HLA antibodies detected by single-antigen flow-beads. Transplantation.2009; 87: 1681-88.

36. Lefaucher C. Loupy A, Hill GS et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. J Am SocNephrol.2010; 21:1398-1406.

37. Vlad G, Ho EK, Vasilescu ER et al. Relevance of different antibody detection methods for the prediction of antibody-mediated rejection and deceased-donor kidney allograft survival. Hum Immunol.2009; 70: 589-94.

38. Hirai T, Kohei N, Omoto K et al.Significance of low-level DSA detected by solid-phase assay in association with acute and chronic antibody-mediated rejection. Transpl Int. 2012; 25: 925–33.

39. Everly MJ, Everly JJ, Arend IJ et al. Reducing de novo donor-specific antibody levels during acute rejection diminishes renal allograft loss. Am J Transplant. 2009; 9 (5): 1063-71.

40. Everly MJ, Rebellato LM, Ozawa M et al. Beyond histology: Lowering human leukocyte antigen antibody to improve renal allograft survival in acute rejection. Transplantation. 2010; 89 (8):962-67.

41. Gill JS, Landsberg D, Johnston O et al. Screening for de novo antihuman leukocyte antigen antibodies in nonsensitized kidney transplant recipients does not predict acute rejection. Transplantation.2010; 89:178–84.

42. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE et al. Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. Transplantation.2013; 95:410–7.

43. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. Am J Transplant.2012; 12:1157–67.

44. Wiebe C, NickersonP.Posttransplant monitoring of de novo human leukocyte antiantigen donor-specific antibodies in kidney transplantation CurrOpin Organ Transplant.2013; 18:470–7.

45. Solez K, Colvin RB, Racusen LC etal.Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. Am J Transplant.2008; 4:753-60.

46. Kimball PM, Baker MA, Wagner MB et al. Surveillance of alloantibodies after transplantation identifies the risk of chronic rejection. Kidney International.2011; 79: 1131-7.

47. Tait BD, Süsal C, Gebel HM et al. Consensus Guidelines on the Testing and Clinical Management Isses Associated With HLA and Non-HLA Antibodies in Transplantation. Transplantation.2013; 95: 19-47.

48. Sayegh MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later: progress, challenges and promises. N Engl J Med. 2004; 351: 2761-6.

49. Brasil, Ministério da Saúde. Portaria n° 2600, de 21 de outubro de 2009.Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes. [acesso em 15 fev 2014]. Disponível em:http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt2600_21_10_2009.html.

50. GombosP,OpelzG,Scherer S et al. Influence of technique on sensibilization status of patients on the kidney transplant waiting list. Am J Transplant. 2013; 13;2075-82.

51. Morales-BuenrotroLE,Terasaki PI, Marino-Velasquez LA et al.” Natural human leukocite antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. Transplantation.2008; 86:1111-5.

52. Sicard A, Amrouche L, Suberbielle C et al. Outcome of kidney transplantations performed with preformed donor-specific antibodies of unknown etiology. Am J Transplant. 2014; 14(1): 193-201.

53. Wu P, Jin J, Everly MJ et al. Impact of alloantibody strength in crossmatch negative DSA positive kidney transplantation. ClinBiochem. 2013; 46(15): 1389-93.

54. Burns JM, Cornell LD, Perry DK, et al. Alloantibody levels and acute humoral rejection early after positive crossmatch. Am J Transplant.2008; 8: 2684-94.

55. Bachelet T, Couzi L, Lepreux S et al. Kidney intragraft donor-specific antibodies as determinant of antibody-mediated lesions and poor graft outcome. Am J Transplant, 2013; 13(11): 2855-64.

56. Williams JM, Holzknecht ZE, Plummer TB et al. Acute vascular rejection and accommodation: divergent outcomes of the humoral response to organ transplantation. Transplantation. 2004; 78(10): 1471-8.

57. El-Awar N, Lee JH, Tarsitani C et al. HLA class 1 epitopes: recognition of binding sites by mAbseluted alloantibody confirmed with single recombinant antigens. Hum Immunol. 2007; 68(3):170-80.

58. Martin L, Guinier F, Mousson C et al. Detection of donor-specific anti-HLA antibodies with flow cytometry in aluates and sera from renal transplant recipients with allograft nephropathy. Transplantation.2003; 76: 395-400.

59. Hardy MA, Suciu-Foca N, Reed E et al. Immunomodulation of kidney and hert transplants by anti-idiotypic antibodies. Ann Surg.1991; 214:522-8

60. Campos EF, Tedesco-Silva H, Machado PG et al. Post-transplant anti-HLA class II antibodies as risk factor for late kidney allograft failure. Am J Transplant. 2006; 6(10): 2316-20.

61. Ntokou IS, Iniotaki AG, Kontou EN et al. Long-term follow up for anti-HLA donor specific antibodies postrenal transplantation: high immunogenicity of HLA class II graft molecules. Transpl Int. 2011; 24(11): 1084-93.

62. McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation.Transplantation. 2000; 69(3): 319-26.

63. Dieplinger G, Ditt V, Arns W et al. Impact of *de novo* donor specific HLA antibodies detected by Luminex solid-phase assay after transplantation in a group of 88 consecutive living-donor renal transplantations. Transpl Int. 2014; 27(1): 60-8.

64. Cooper JE, Gralla J, Cacle L et al. Inferior Kidney Allograft Outcomes in Patients With De Novo Donor-Specific Antibodies Are Due to Acute Rejection Episodes. Transplantation. 2011; 91(10): 1103-9.

65. Archdeacon P, Chan M, Neuland C et al. Summary of FDA Antibody-Mediated Rejection Workshop. Am J Transplant. 2011; 11: 896-906.

ANEXO -Aprovação do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESOUISA

Rio de Janeiro, 08 de junho de 2005

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof.: Wille Oigman
Para: Aut. Elizabeth Guerrero M. Figueredo
Orient. Prof. Luis Cristovão M. S. Porto

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (1141-CEP/HUPE – CAAE: 0071.0.228.000-05) "INVESTIGAÇÃO DE MARCADORES DE REJEIÇÃO PRÉ E PÓS - TRANSPLANTE RENAL" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

p/ Patrícia

Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO, 77 TÉRREO - VILA ISABEL - CEP 20551-030
TEL: 21 2587-6353 – FAX: 21 2264-0853 - E-mail: cep-hupe@uerj.br