

ERICK ACERB BARBOSA

Cinética dos anticorpos anti-HLA no pós-transplante renal -
impacto na rejeição aguda do enxerto

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de
título em Doutor em Ciências

Programa de concentração: Nefrologia

Orientadora: Dra. Maria Cristina Ribeiro de Castro

São Paulo
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Barbosa, Erick Acerb

Cinética dos anticorpos anti-HLA no pós-transplante renal – impacto na
rejeição aguda do enxerto / Erick Acerb Barbosa. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.

Orientadora: Maria Cristina Ribeiro de Castro.

Descritores: 1.Anticorpos 2.Antígenos HLA 3.Cinética 4.Rejeição de
enxerto 5.Transplante de rim

USP/FM/DBD-334/14

Dedico essa tese aos pacientes que participaram do estudo e a todos os meus mestres que me ensinaram a arte da medicina.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Cristina Ribeiro de Castro por me orientar nessa tese, por me ensinar todos os dias a arte da Imunologia do transplante renal e pela amizade.

Aos meus mestres do Serviço de Transplante Renal: Dr. Elias David Neto, Dr. Flávio Jota de Paula, Dra. Maria Cristina Ribeiro de Castro, Dr. Luiz Sérgio Azevedo, Dra. Francine Lemos, Dr. David Machado, Dra. Patrícia Soares de Souza e a todos assistentes desse serviço, pessoas que me ensinaram muito.

A Hélcio Rodrigues e Nicolas Panajotopoulos pela contribuição na tese e pelos importantes ensinamentos na área da Imunologia.

Aos amigos da Pesquisa Clínica do Serviço de Transplante Renal: Fabiana Agena, Joana Pedrosa, Ana Heloisa Triboni, Fernanda Ramos, Margarete e Marilza pelo convívio do dia a dia e por me ajudarem a executar esse estudo.

Aos amigos do Laboratório de HLA: Renata Souza, Carlos Sérgio, Filipe Marques, Germano Preughes, Sandra Regina, Célia Yamaguti, Olga Morita, Marcelo Barrocal, Jonas Klein, Karina Blanez, Carol Borba pelo excelente convívio e pela contribuição com esse trabalho.

Às amigas Renata Souza e Gabriella Maciel que tiveram uma participação de muito empenho nesse trabalho.

Às enfermeiras e amigas Maiza dos Santos Lazinho e Fabiana Agena que me ajudaram de forma direta na abordagem dos pacientes.

À minha família:

Ao meu pai, Miguel Arcanjo Barbosa, exemplo de trabalho, simplicidade e que, em todo momento nesse árduo caminho da vida e da Medicina, esteve sempre ao meu lado.

À minha mãe, Eliane Acerb Barbosa, meu modelo de simplicidade e dedicação à família, por sempre também estar ao meu lado dando todo apoio necessário, pela confiança e pelo amor!

Ao meu irmão: sempre estivemos lado a lado para tudo!

À minha vó Nisbet pelo carinho e começo dessa família maravilhosa.

A Deus por sempre me iluminar e nunca permitir que eu desista dos sonhos.

Esse projeto foi fomentado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Projeto auxílio à Pesquisa n° 2011/18420-0.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia. Pois o triunfo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante.”

Charles Chaplin

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese segue as seguintes normas em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver);

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, tese e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro de Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Cestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Prova cruzada contra linfócitos	4
1.2 Reatividade contra painel	5
1.3 Revisão de literatura	7
2. OBJETIVOS	16
3. METÓDOS	17
3.1 Casuística	17
3.2 Desenho do estudo	18
3.3 Tipificação HLA	21
3.4 Avaliação da resposta humoral	23
3.5 Teste de citotoxicidade dependente de complemento (CDC)	24
3.6 Prova-cruzada contra linfócitos por citometria de fluxo	25
3.7 Teste de microesferas marcadas (Luminex®)	26
3.8 Estudo histológico	27
3.8.1 Microscopia óptica	27
3.8.2 Imunofluorescência indireta para C4d	27
3.8.3 Imunoperoxidase para C4d	28
3.9 Análise clínica	28
3.10 Análise estatística	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Pacientes incluídos	30
4.2 Reatividade contra painel do pré-transplante renal	32
4.3 Dados demográficos e características clínicas dos pacientes	32
4.4 Monitorização dos anticorpos anti-HLA no pós-transplante renal	34

4.5 Estudo imunológico dos grupos	35
4.6 Associação entre anticorpos anti-HLA e rejeição agudas	44
4.7 Evolução clínica	49
4.7.1 Tratamento e reversibilidade das rejeições agudas	49
4.7.2 Função renal	52
4.7.2.1 Relação urinária proteína/creatinina	52
4.7.2.2 Creatinina sérica	52
4.7.2.3 Função renal em MDRD	54
4.7.3 Sobrevida do enxerto	55
4.7.3.1 Rejeição aguda	56
4.7.3.2 Rejeição mediada por anticorpos	57
4.7.3.3 Perda de enxerto	58
4.8 Monitorização dos anticorpos anti-HLA	59
4.8.1 Monitorização dos anticorpos anti-HLA em pacientes não sensibilizados	59
4.8.2 Monitorização dos anticorpos anti-HLA em pacientes sensibilizados	60
5. RESUMO DOS ACHADOS	62
6. DISCUSSÃO	64
7. CONCLUSÕES	67
8. REFERÊNCIAS	68
9. ANEXO I	75

LISTA DE ABREVIATURAS

- AC ANTI-IL-2R: Anticorpo anti-receptor de Interleucina 2
- ADCC: Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo
- ADE: Anticorpo Doador Específico
- AGH: Antiglobulina Humana
- APC: Célula Apresentadora de Antígenos
- CAPPesq: Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
- CDC: Citotoxicidade Dependente de Complemento
- CDC-AGH: Citotoxicidade Dependente de Complemento – Antiglobulina Humana
- CDC-NIH: Citotoxicidade Dependente de Complemento – *National Institute of Health*
- CF: Citometria de Fluxo
- DTT: Ditioneitol
- ELISA: *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*
- FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- FCXM: Prova Cruzada por Citometria de Fluxo, do inglês “Flow Cytometry Crossmatch”
- FITC: Isotiocianato de Fluoresceína
- HE: Hematoxilina-eosina
- HLA: Antígenos Leucocitários Humanos
- IF: Imunofluorescência
- INF: Interferon
- IL: Interleucina
- IP: Immunoperoxidase
- IVIg: Imunoglobulina polivalente humana
- MFI: Intensidade Média de Fluorescência, do inglês “Mean Fluorescence Intensity”
- NK: Célula *Natural Killer*
- NTA: Necrose Tubular Aguda

TCR: Receptor de células T, do inglês "T Cell Receptor"

TNF: Fator de Necrose Tumoral

PAS: Ácido Periódico de Shiff

PBS: Tampão de Salina Fosfato

PCR-SSO: Reação de Polimerização em Cadeia utilizando Sequência Específica de Oligonucleotídeos

PCR-SSP: Reação de Polimerização em Cadeia utilizando Sequência Específica de Primers

PE: Ficoeritrina

PO: Pós Operatório

PRA: Reatividade dos Anticorpos Contra Painel, do inglês "Panel Reactive Antibodies"

RAMA: Rejeição Aguda Mediada por Anticorpos

RAMC: Rejeição Aguda Mediada por Células

MDRD: *Modification of Diet in Renal Disease*

STR-HC-FMUSP: Serviço de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

TFG: Taxa de Filtração Glomerular

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Ilustração de moléculas de HLA aderidas à microesfera	6
FIGURA 2 – Ilustração da técnica Luminex	7
FIGURA 3 – Fluxograma de execução das coletas de sangue	19
FIGURA 4 – Divisão dos grupos	20, 34
FIGURA 5 – Pacientes incluídos no estudo	30
FIGURA 6 – Pacientes incluídos na análise	31
FIGURA 7 - Distribuição percentual dos transplantados quanto aos doadores.	34
FIGURA 8 - Aparecimento de anticorpos anti-HLA doador específico de <i>novo</i> em pacientes não sensibilizados	36
FIGURA 9 – Cinética do aparecimento de anticorpos anti-HLA doador específico <i>de novo</i> nos pacientes sensibilizados	37
FIGURA 10 – Cinética dos anticorpos anti-HLA doador específico em receptores de rim de doadores vivos	38
FIGURA 11 – Cinética dos anticorpos anti-HLA doador específico em receptores de rim de doadores falecidos	38
FIGURA 12 – Comportamento expresso em medianas dos anticorpos anti-HLA doador específico	39
FIGURA 13 - Box-plot dos MFI-ADE no momento do transplante	39
FIGURA 14 - Médias dos MFI-ADE	40
FIGURA 15 - Correlação entre evolução MFI-ADE e creatinina ao final de 1 ano	42
FIGURA 16 - Distribuição dos pacientes quanto ao gênero	43
FIGURA 17 – Época do diagnóstico das rejeições mediadas por anticorpos .	44
FIGURA 18 - Época do diagnóstico das rejeições mediadas por células	44
FIGURA 19 – Incidência de rejeição aguda entre os grupos do pré-transplante	46
FIGURA 20 – Tipos de rejeição aguda nos grupos do pré-transplante	46

FIGURA 21 - Pacientes que transplantaram com ADE e evoluíram com rejeição aguda	47
FIGURA 22 – Pacientes que transplantaram com ADE e evoluíram com RAMA	48
FIGURA 23 - Cinética dos ADE nas rejeições mediadas por anticorpos antes e no momento da rejeições	51
FIGURA 24 - Médias com desvio padrão da creatinina sérica	53
FIGURA 25 - Médias com desvio padrão da função renal (MDRD)	54
FIGURA 26 - Análise de sobrevivência livre de rejeição aguda	56
FIGURA 27 - Análise de sobrevivência para a rejeição aguda mediada por anticorpos	57
FIGURA 28 - Análise de sobrevivência livre de perda do enxerto	58
FIGURA 29 - Aparecimento dos anticorpos anti-HLA doador específico <i>de novo</i> em pacientes não sensibilizados	60
FIGURA 30 - Aparecimento dos anticorpos anti-HLA doador específico <i>de novo</i> em pacientes sensibilizados sem ADE no pré-transplante..	60
FIGURA 31 - Cinética dos ADE dominantes de todos os pacientes transplantados com anticorpos doador específico	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Dados demográficos e características clínicas dos 150 pacientes segundo os grupos de pré-transplante	33
TABELA 2 – MFI-ADE dos pacientes que transplantaram com anticorpos doador específico	39
TABELA 3 - Médias e desvios padrão dos MFI-ADE	40
TABELA 4 - Médias e desvios padrão da variação do MFI-ADE entre o pré-tx e 7 ^a PO	41
TABELA 5 - Médias e desvios padrão da variação do MFI-ADE entre o 4 ^a e o 7 ^a PO	41
TABELA 6 - Área Sob a Curva para as Curvas ROC	42
TABELA 7 - Tipos e frequência de rejeições segundo os grupos do pré-transplante	45
TABELA 8 - Distribuição dos pacientes quanto à presença de ADE no momento do transplante e a evolução para RAMA	47
TABELA 9 - Tipos e frequência de rejeições nos grupos segundo a cinética do pós-transplante	49
TABELA 10 - Tratamento e reversibilidade das rejeições agudas mediadas por anticorpos	50
TABELA 11 - Distribuição dos pacientes quanto à perda pela gravidade histológica	51
TABELA 12 - Medidas da relação urinária proteína/creatinina	52
TABELA 13 - Medidas das creatininas séricas	53
TABELA 14 - Níveis descritivos para o teste de Kruskal-Wallis – creatinina sérica	53

TABELA 15 - Medidas para a função do enxerto pela fórmula MDRD	54
TABELA 16 - Níveis descritivos para o teste de Kruskal-Wallis –MDRD	55
TABELA 17 - Função renal entre os pacientes com e sem RAMA	55
TABELA 18 - Distribuição dos pacientes quanto à rejeição aguda	59

RESUMO

Barbosa EA. *Cinética dos anticorpos anti-HLA no pós-transplante renal - impacto na rejeição aguda do enxerto* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;2014.76p.

INTRODUÇÃO: O objetivo do estudo foi avaliar, através de técnicas muito sensíveis, a presença e a cinética dos anticorpos anti-HLA antes e após o transplante renal, bem como sua influência no aparecimento e na gravidade de episódios de rejeição aguda.

MÉTODOS: Estudo prospectivo, observacional que avaliou 1350 soros de 150 pacientes. Esses pacientes foram acompanhados durante um período de 12 meses após o transplante ou até a perda do enxerto. Foram utilizados soros para pesquisa de anticorpos anti-HLA isotipo IgG pela técnica do Luminex® e tipagem HLA classe I para locci A, B e C e classe II para os locci DR e DQ.

RESULTADOS: Foram estudados 82 pacientes do gênero masculino e 68 do gênero feminino, com idade média de 46,4 anos. A idade média dos doadores foi 43,6 anos. Noventa e nove pacientes receberam rins de doadores falecidos, sendo 45,5% sensibilizados; enquanto 51 receberam rim de doadores vivos, sendo 29,5% sensibilizados. Entre os não sensibilizados pré-transplante, a taxa de rejeição aguda foi mais baixa (13,5% x 36,4%, $p < 0,001$). Os pacientes que transplantaram com ADE tiveram OR 17,7 para rejeição aguda mediada por anticorpos. O MFI-ADE do pré-transplante dos pacientes que rejeitaram foi igual ao dos que não rejeitaram ($p = 0,458$). Os pacientes que apresentaram rejeição tiveram um aumento do nível de MFI médio de 22% entre o pré-transplante e o 7º PO. Os que não apresentam rejeição tiveram um descenso médio de 28%. Quanto maior a queda do MFI ao longo do 1º ano, menor foi a creatinina sérica ao final de 1 ano ($p = 0,053$). Encontramos fatores que aumentaram o risco de elevação do MFI-ADE ao longo do transplante: ser mulher (OR=19,7), gestação prévia (OR=4,6), transfusão de sangue (OR=3), rim de doador falecido (OR=3,4) e retransplante (OR=1,5). Pacientes que não desenvolveram RAMA tiveram melhor função renal pela fórmula MDRD ($p = 0,0245$).

CONCLUSÃO: A monitorização frequente e prospectiva dos anticorpos anti-HLA no pós-transplante renal é importante e pode identificar os pacientes com maior risco para rejeição. Não encontramos evidências de benefício na monitorização rotineira dos anticorpos anti-HLA em pacientes não sensibilizados, porém pacientes sensibilizados se beneficiaram da monitorização frequente, especialmente no primeiro mês.

Descritores: 1.Anticorpos 2.Antígenos HLA 3.Cinética 4.Rejeição de enxerto 5. Transplante de rim

SUMMARY

Barbosa AE. *The kinetics of anti-HLA antibodies after kidney transplantation - the impact on acute rejection* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo";2014.76p.

INTRODUCTION: The aim of the study was to evaluate, using sensitive techniques, the presence and the kinetics of the anti-HLA antibodies pre and post kidney transplantation and their influence on the occurrence and severity of the episodes of acute rejection.

METHODOLOGY: Prospective and observational study that evaluated 1350 sera of 150 patients. Patients were followed over a period of 12 months after transplantation or until graft loss. Sera were used for detection of anti-HLA IgG antibodies by testing LABScreen® Mixed and Single Antigen®. HLA typing included determination of loci A, B, C, DR and DQ.

RESULTS: Eighty two patients were male and mean age at the transplant was 46.4 years old. The mean donor age was 43.6 y-old. Ninety-nine received a kidney from a deceased donor (45.5% sensitized) and fifty one received a living donor kidney (29.9% sensitized). The non-sensitized patients presented lower acute rejection rates (13.5% vs. 36.4%, $p < 0.001$). For those who transplanted with DSA, the odds ratio for AMR was 17.7. Patients who transplanted with a DSA and had AMR had a mean pre-transplant MFI of 5232 and those who did not develop it had a mean MFI of 6478 ($p = 0.458$). The patients that presented AMR had a 22% increase on and those who did not present it had a mean decrease of 28% from the pre-transplant to the 7th PO. The greatest the fall of MFI-DSA, the lower Scr was at one year ($p = 0.053$). Some factors predicted the increase on DSA levels: female gender (OR=19.7), previous pregnancies (OR=4.6), blood transfusions (OR=3), deceased donor kidney (OR=3.4) and retransplants (OR=1.5). Patients without antibody-mediated rejection had better one year graft function than those with AMR ($p=0,0245$).

CONCLUSION: The serial and frequent monitoring of anti-HLA antibodies after transplantation can identify patients at higher risk for rejection. We could not show any benefit in monitoring routinely nonsensitized patients. Sensitized patients should be monitored frequently specially during the 1st month.

Descriptors: 1.Antibodies 2.HLA antigen 3.Kinetics 4.Graft rejection 5.Kidney Transplantation.

1. INTRODUÇÃO

O transplante renal é atualmente a terapia de escolha para a maioria dos pacientes com doença renal crônica grau V. Dados do Sistema Estadual de Transplantes do Estado de São Paulo mostram que, nos dias atuais, a taxa de mortalidade em lista de espera para o transplante é de 7%. Nas últimas décadas, a sobrevida do enxerto aumentou substancialmente. Segundo dados da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de São Paulo, a sobrevida do enxerto renal entre os anos de 1998 a 2012 foi de 84% no primeiro ano, 72% para o quinto e de 60% no décimo ano (1). Os dados da UNOS (*United Network Organ Sharing*) mostram que a sobrevida do enxerto no primeiro, quinto e décimo ano (transplantes realizados entre 2002-2012) são, respectivamente, 92%, 70% e 44% para doador falecido e de 96%, 84% e 60% para doador vivo (2).

A respeito da melhoria dos protocolos de imunossupressão, alguns enxertos ainda são perdidos devido à rejeição aguda refratária aos tratamentos imunossupressores disponíveis, principalmente em pacientes com anticorpos anti-HLA pré-transplante. Apesar da evidente melhora na sobrevida dos enxertos nas últimas décadas, pouco se alteraram as taxas de perda tardia do enxerto por rejeições crônicas, sendo a principal causa de perda ao longo prazo. Dados recentes sugerem que, além de mecanismos celulares, mecanismos humorais também estariam envolvidos tanto na rejeição aguda como na rejeição crônica do enxerto (3).

O processo de rejeição tem início quando os linfócitos T do receptor reconhecem antígenos do doador expressos no enxerto. Ao reconhecerem esses antígenos como não-próprios, os linfócitos T são ativados e desencadeiam mecanismos efetores celulares e humorais da rejeição (4). O alorreconhecimento é o evento central e primário no desencadeamento da resposta imune. Pode ocorrer principalmente por duas vias distintas: a via direta e a via indireta. Ambas as vias de alorreconhecimento são importantes no processo de rejeição, uma vez que não são excludentes entre si e podem ocorrer simultaneamente (5).

No alorreconhecimento direto, as células T alorreativas do receptor (via receptor de célula T, do inglês, *T Cell Receptor - TCR*) reconhecem o complexo peptídeo/HLA expresso na superfície das APCs do doador (6). O complexo peptídeo-molécula HLA do doador é reconhecido como não-próprio pelo TCR do receptor e inicia-se o mecanismo primário de indução de citotoxicidade. A via direta é

considerada via dominante e envolve resposta imune precoce e intensa, principalmente devido à presença de APCs passageiras no enxerto.

No alorreconhecimento indireta, as células T alorreativas do receptor reconhecem aloantígenos processados e apresentados na forma de peptídeos presentes na superfície celular das APCs do receptor, geralmente junto à molécula HLA classe II. Esta via pode amplificar a resposta da via direta e é predominante na rejeição crônica (7).

Uma nova via descrita é a semi-direta de alorreconhecimento. Nesta via, moléculas intactas da superfície celular, incluindo molécula HLA, poderiam ser transferidas entre as células do sistema imune e, desta forma, o complexo HLA-célula do receptor tornar-se-ia hábil para estimular uma resposta imune das células T alorreativas. Este mecanismo envolve contato célula-célula ou, ainda, distribuição e captação de vesículas exossomais (8).

Após interação do TCR com o peptídeo alogênico, inicia-se a alorresposta com ativação dos linfócitos T CD8⁺ e de linfócitos T CD4⁺. Os antígenos HLA de classe I ativam os linfócitos T citotóxicos CD8⁺, dando-se início à expansão clonal de células alorreativas que, por sua vez, induzem a citotoxicidade através da liberação de grânulos citotóxicos, de perforinas e granzimas, culminando em apoptose e lise celular. Os antígenos HLA de classe II ativam principalmente os linfócitos T auxiliares CD4⁺ dando início à produção de citocinas com perfil Th1 e Th2 (4).

A terminologia da Th1 e Th2 é utilizada para identificar dois subtipos de células T auxiliares (CD4⁺), conforme perfil de citocinas produzidas e seus respectivos perfis funcionais. As células T auxiliares CD4⁺ Th1 produzem, principalmente, interleucina-2 (IL-2) que potencializa o estímulo para expansão clonal de linfócitos T citotóxicos CD8⁺, além de estimular produção de INF- γ e de TNF- α , o que incentiva a imunidade celular pró-inflamatória através da ativação de monócitos, macrófagos e células NK. Estas células efetoras podem infiltrar o enxerto.

As células T auxiliares CD4⁺ Th2, que regulam a ativação de linfócitos B, produzem interleucina 4 (IL-4), 5 (IL-5), 10 (IL-10) e 13 (IL-13). Estão envolvidas na resposta humoral do transplante de órgãos e têm, principalmente, ação anti-inflamatória (9). No entanto, a IL-2 também é uma citocina fundamental para as células reguladoras que têm ação anti-inflamatória.

As interleucinas de perfil Th2, principalmente a IL-4, por serem fatores de crescimento de linfócitos B, levam à expansão clonal de plasmócitos e produção de

anticorpos cuja interação com aloantígenos específicos ativam resposta inflamatória envolvendo complemento. Anticorpos podem também mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (do inglês, *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity-ADCC*) com ativação de células NK (do inglês, *Natural Killer*) ou macrófagos promovendo lise da célula-alvo (4).

Nos casos mais graves, com lesão endotelial intensa, pode ocorrer ativação da cascata do complemento, como também do sistema de coagulação, fazendo migrar polimorfonucleares, plaquetas com formação de trombos e obstrução vascular, evoluindo, muitas vezes, com rejeição grave e perda do enxerto. Esta cascata de eventos culmina com a lesão tecidual do enxerto e manifestações clínicas variadas, podendo levar à rejeição aguda ou crônica.

Vários critérios morfológicos para classificação da rejeição aguda e crônica foram propostos (10, 11). Estas classificações visam padronizar a interpretação da biópsia renal após o transplante e guiar o seu tratamento, sendo a Classificação de Banff 97 universalmente aceita para essa finalidade (11). Revisões periódicas e mais recentes incorporaram o diagnóstico de *Rejeição Mediada por Anticorpos* à Classificação de Banff (12,13). Na Conferência de Banff, realizada em 2005, foram definidos critérios patológicos para o diagnóstico de rejeição crônica mediada por anticorpos. Assim, as rejeições de transplante renal passaram a ser classificadas como agudas ou crônicas, podendo ser mediadas por anticorpos ou por células T (13). Em agosto de 2009, no Canadá, foi realizada a 10ª Conferência de Banff, onde foram atualizados novos conceitos, tornando-se, portanto, a classificação usada atualmente (14). A classificação de Banff para rejeições do transplante renal pode ser vista no ANEXO I.

É consenso que tanto células quanto anticorpos possam levar à lesão arterial aumentando ainda mais a necessidade de critérios que diferenciem o dano arterial mediado por células daquele mediado por anticorpos. Esses dois tipos de rejeição aguda - aceitos internacionalmente - são muito mais complexos na prática clínica do que na teoria, enquanto a ação de anticorpos no processo pode se manifestar com diferentes quadros histológicos da rejeição aguda ou crônica (12).

Recentemente, Lefaucheur et al. descreveram diferentes formas histológicas de rejeição que não estão bem definidas nos consensos atuais. Trata-se de rejeições com diferentes fenótipos: rejeição vascular mediada por células T, rejeição vascular mediada por células T sem vasculite, rejeição vascular mediada por anticorpos e rejeição vascular mediada por anticorpos sem vasculite, todas com impacto na

sobrevida do enxerto. As rejeições mediadas por anticorpos com e sem vasculite tiveram um risco para a perda do enxerto de 9.07 e 2.93 quando comparadas à rejeição mediada por células T sem vasculite, respectivamente (16).

Para avaliação das respostas humorais no transplante renal necessitamos das seguintes técnicas:

1.1 Prova-cruzada contra linfócitos

Desde os primórdios dos transplantes, sabe-se que receptores com anticorpos anti-HLA de isotipo IgG pré-formados e direcionados contra antígenos HLA do doador têm maior risco de cursar com rejeição hiperaguda (15). Após a introdução, por Patel e Terasaki, da prova-cruzada por citotoxicidade dependente de complemento (CDC) para a seleção do par doador-receptor, a incidência de rejeição hiperaguda diminuiu drasticamente, de modo que quase desapareceu do dia-a-dia do transplante (17).

O teste CDC clássico, também denominado CDC-NIH (do inglês, *National Institute of Health*), baseia-se na incubação de linfócitos do doador e do soro do receptor, seguida de adição de complemento de coelho e posterior verificação da lise celular por meio de corantes vitais, através de leitura da reação em microscópio óptico (18). No decorrer dos anos, surgiram modificações da técnica CDC-NIH a fim de aumentar sua sensibilidade. A adição de anti-globulina humana (AGH; do inglês, *anti human globulin- AHG*), na prova-cruzada contra linfócitos T (CDC-AGH), aumentou a sensibilidade do teste, propiciando a detecção de anticorpos em baixos títulos e de anticorpos não fixadores de complemento (19, 20). Como os linfócitos B expressam em sua superfície imunoglobulinas, o uso de AGH não é preconizado na prova-cruzada contra este tipo celular, pois o AGH pode se ligar à imunoglobulina de superfície celular e fixar complemento independentemente de anticorpos reativos contra antígenos do doador, levando a um resultado falso-positivo.

Pela técnica de CDC, pode-se detectar tanto anticorpos do isotipo IgM quanto IgG. Para caracterizar o isotipo do anticorpo, utiliza-se o agente redutor ditiotreitól (DTT) o qual destrói as pontes dissulfeto das moléculas de IgM, inativando-as, sem interferir na reatividade dos anticorpos da classe IgG (19).

A respeito do uso de CDC-AGH, a técnica de citometria de fluxo (CF) foi introduzida na década de 90, é capaz de detectar anticorpos em baixos títulos e não fixadores de complemento. A prova-cruzada por citometria de fluxo baseia-se na incubação do soro do receptor com linfócitos totais do doador, seguida da adição de anticorpo secundário conjugado com fluorocromo (21). Tem a vantagem de propiciar a avaliação, independente e simultânea, da prova-cruzada contra os linfócitos T e B do doador, como também é mais sensível que a prova-cruzada CDC-AGH. A desvantagem, por ser muito sensível, é que podem ocorrer resultados falso-positivos.

Vale ressaltar que provas-cruzadas positivas contra linfócitos T são indicativas de anticorpos anti-HLA classe I. No entanto, provas-cruzadas positivas contra linfócitos B são indicativas de anticorpos anti-HLA classe I ou classe II, uma vez que os linfócitos B expressam constitutivamente em sua superfície moléculas HLA classe I e II, ao passo que as moléculas HLA classe I estão presentes em alta densidade. Ainda em relação com a prova-cruzada por citometria de fluxo, a relevância clínica da sua positividade é aumentada pela interpretação combinada com pesquisa de anticorpos pelos ensaios de fase sólida (22).

Com o desenvolvimento e implementação dos ensaios de fase sólida, nos quais se utilizam moléculas HLA purificadas e aderidas em placas ou microesferas, houve melhora da identificação dos anticorpos anti-HLA. Essas técnicas são muito sensíveis e mais específicas do que ensaios de citotoxicidade para identificar anticorpos anti-HLA classe I e II (23). As provas-cruzadas por ELISA e por microesferas (plataforma Luminex®) são análogas aos testes de painel por estas técnicas, conforme discutido a seguir.

O padrão de cada teste deve ser considerado, uma vez que todos apresentam limitações. Apesar de a técnica de CDC propiciar informações úteis a respeito do perfil de anticorpos do receptor, o uso de ensaios de fase sólida pode fornecer informações adicionais de relevância clínica, de modo a aumentar a sensibilidade dos testes utilizados e, ainda, melhorar a definição de riscos (24).

1.2 Reatividade contra painel

A reatividade contra painel ou PRA (do inglês, *Panel Reactive Antibody*) indica o grau de sensibilização HLA do receptor de transplante de órgãos em relação à população de possíveis doadores. No passado, era avaliada pela técnica de CDC

utilizando-se um painel de linfócitos com especificidades HLA previamente definidas e que representavam a distribuição das moléculas HLA da população estudada.

Com o passar do tempo, surgiram novas técnicas mais específicas e mais sensíveis para analisar a reatividade contra painel, com isso, a técnica por CDC foi caindo em desuso.

O PRA-ELISA baseia-se na utilização de moléculas HLA solúveis aderidas em placas. Na realização deste ensaio, utilizamos anticorpos secundários que podem detectar anticorpos dos isotipos IgM ou IgG a depender da análise de interesse (25). Sua sensibilidade é semelhante a do teste de citotoxicidade e tem a vantagem adicional de permitir a diferenciação dos anticorpos anti-HLA em classe I e classe II. Além disso, como a detecção de anticorpos anti-HLA é específica, este teste não sofre interferência de auto-anticorpos, tampouco de anticorpos anti-linfocitários (26).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, novos ensaios foram introduzidos, permitindo uma análise mais sensível e específica ao avaliar a reatividade contra painel. Estes ensaios baseiam-se no uso de moléculas HLA extraídas de células recombinantes que, por sua vez, podem ser de classe I ou classe II e são aderidas à micro-esferas de modo a determinar a especificidade do anticorpo encontrado (27, 28), (Figura 1). Dentre os testes disponíveis estão aqueles que utilizam micro-esferas marcadas com HLA classe I e II (LabScreen Mixed), micro-esferas revestidas ou com HLA classe I ou Classe II (LabScreen Flow PRA) ou, ainda, micro-esferas marcadas individualmente com o alelo HLA de interesse (LabScreen Single Antigen).

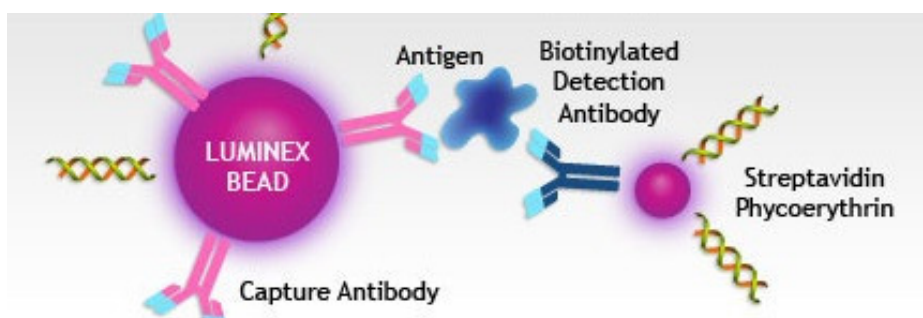


Figura 1: Ilustração de moléculas de HLA aderidas à microesfera.

Os testes LabScreen compõe-se de um painel de esferas codificadas com cores e revestidas com antígenos HLA purificados. O soro de teste é incubado com as micro-esferas. Quaisquer anticorpos HLA presentes no soro do teste ligam-se aos

antígenos nessas micro-esferas e são posteriormente marcados com IgG de cabra anti-humana, conjugada com R-Ficoeritrina (PE). O analisador de fluxo detecta a emissão fluorescente do anticorpo, permitindo uma aquisição de dados em tempo real. A análise da reatividade do soro é avaliada pelo sinal fluorescente obtido em cada esfera revestida com HLA (Figura 2).

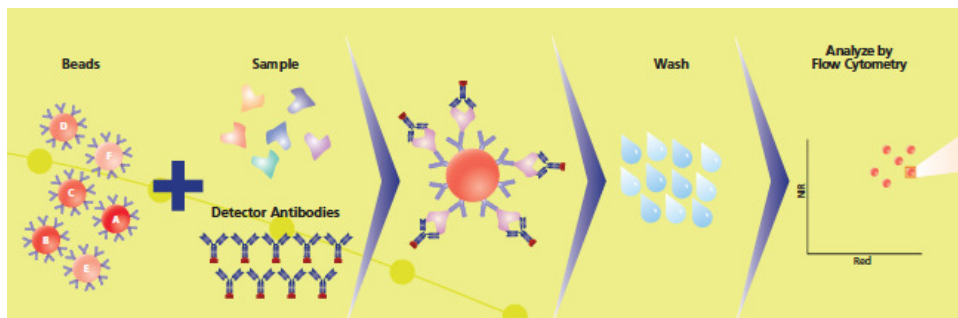


Figura 2: Ilustração da técnica do Luminex.

Esses testes são de alta sensibilidade, o que traz o benefício na monitoração dos anticorpos de baixos títulos. Entretanto, também podem detectar anticorpos que seriam irrelevantes ao transplante renal. O teste independe da disponibilidade de células do doador, o que o torna mais prático. No entanto, trata-se de metodologia de alto custo.

1.3 Revisão de literatura

Pacientes podem ser sensibilizados contra antígenos HLA através de exposição prévia a transplantes, gestações e hemotransfusões (29).

Muito já se sabe sobre o papel dos anticorpos anti-HLA quando detectados antes do transplante renal. A presença de anticorpos anti-HLA no pré-transplante é um fator de risco independente para rejeição e para falência do enxerto (30, 31). A detecção de anticorpos anti-HLA classe I e classe II, pela técnica de ELISA, em amostras de soro de pacientes no pré-transplante renal associou-se à sobrevida do enxerto. Pacientes sem sensibilização HLA apresentaram sobrevida do enxerto de 84%; pacientes com sensibilização isolada, classe I ou classe II, apresentaram respectivamente, sobrevida de 77% e 79%, enquanto que pacientes sensibilizados

anti-HLA classe I e II evoluíram com menor sobrevida do enxerto em 2 anos (70%), especialmente aqueles com mais de 3 incompatibilidades HLA (32).

Em nosso centro, cerca de 40% dos pacientes em lista de espera para transplante renal são sensibilizados e uma forma de diminuir o risco de rejeição nestes casos é o uso de terapia de indução. Castro *et al* compararam o uso de terapia de indução, grau de sensibilização anti-HLA pré-transplante e a ocorrência de rejeição aguda e observaram que o uso de terapia de indução com agentes biológicos, como o anticorpo monoclonal anti IL-2R (Basiliximab, Simulect®, Novartis) ou policlonal anti-timocitário (Timoglobulina, Genzyme Corporation) em pacientes com PRA entre 10 e 50% diminuiu a taxa de rejeição aguda quando comparado com o grupo que não recebeu indução ($p=0,02$) (33).

A dessensibilização de pacientes com imunoglobulina polivalente humana (IVIg) está sendo utilizada com o intuito de diminuir o título dos anticorpos anti-HLA doador-específicos de modo à negativar a prova-cruzada de pacientes altamente sensibilizados e, desta forma, tornar viável o transplante dos mesmos (34, 35). Outro protocolo de dessensibilização proposto é o uso combinado de plasmaferese e imunoglobulina com ou sem adição de anticorpos anti linfócitos B (Rituximab, Mabthera®, Roche) (36).

Halloran *et al* atraíram a atenção dos pesquisadores para a importância dos anticorpos anti-HLA após o transplante e seu impacto na sobrevida do enxerto (37). Estes autores relataram que 13 entre 64 pacientes (20%) não sensibilizados no pré-transplante desenvolveram anticorpos anti-HLA classe I nos primeiros três meses após a cirurgia. Neste grupo, todos os pacientes cursaram com rejeição aguda, enquanto que somente 41% dos pacientes sem anticorpos apresentaram este evento, ($p<0,0005$). Os elevados níveis de anticorpos foram associados à gravidade da rejeição aguda: lesão vascular, glomerulite e infarto renal foram achados histológicos predominantes entre os pacientes com anticorpos, enquanto tubulite predominou naqueles pacientes sem anticorpos (38).

Em nosso centro, Castro *et al* avaliaram, retrospectivamente, 339 transplantes renais, dos quais 21 pacientes (6%) evoluíram com rejeição aguda Banff III. Dentre os pacientes que evoluíram com perda do enxerto (38%), houve aumento do PRA, por citotoxicidade, de 5% no pré-transplante para 40% no pós-transplante, sugerindo que estes pacientes teriam anticorpos anti-HLA em baixos títulos no pré-transplante, e ainda, que a imunidade humoral anti-HLA estaria implicada na patogênese deste tipo de rejeição no pós-transplante (39).

Apesar de a teoria de rejeição mediada por células ter predominado nos últimos 40 anos, a introdução das técnicas que melhor identificam anticorpos circulantes reacendeu a necessidade de avaliar a importância da produção de anticorpos após o transplante e seu impacto sobre rejeição e sobrevida do enxerto. Tanto estudos *in vivo* quanto *in vitro* expandiram o atual entendimento das lesões mediadas por anticorpos e do complemento, e, atualmente aceita que a contribuição dos anticorpos para rejeição é maior do que previamente avaliado.

Monteiro *et al* estudaram, em nossa instituição, soros pré e pós-transplante renal de 124 pacientes. Mostraram que a presença de anticorpos anti-HLA isotipo IgG classe I no pós-transplante, detectados pela técnica de ELISA, foi o principal fator de risco para diminuição da sobrevida do enxerto em 1 ano (40). Outros autores avaliaram, retrospectivamente, por técnica de ELISA, 112 receptores de transplante renal que evoluíram com perda do enxerto e foram reinscritos para novo transplante. Estes pacientes foram comparados com 123 pacientes que foram transplantados na mesma ocasião, mas que permaneceram com o enxerto funcionando durante um período de 5 anos. Dentre os pacientes que cursaram com perda do enxerto, os autores puderam detectar anticorpos anti-HLA em 50,9% (57/112) deles, enquanto que estes anticorpos foram detectados em apenas 1,6% (2/123) dos pacientes do grupo controle. Anticorpos anti-HLA doador específico foram detectados em 60% (34/57) dos pacientes com anticorpos e precederam a falência do enxerto, sugerindo que a produção de anticorpos pós-transplante é fator preditor para falência do enxerto (41).

Crespo *et al* estudaram 81 pacientes que cursaram com rejeição aguda nos primeiros 3 meses após o transplante e mostraram que nenhum dos pacientes com rejeição córtico-sensível apresentou anticorpos anti-HLA doador específico, enquanto que estes anticorpos foram detectados em 37% dos pacientes com rejeição córtico-resistente (42).

Em um estudo prospectivo no qual 49 pacientes com risco imunológico elevado foram estudados, Zhang *et al* (43) detectaram que 38,8% dos pacientes apresentaram anticorpos anti-HLA não doador específico e em 22,4% os anticorpos anti-HLA foram doador específico, sendo que estes cursaram com rejeição mediada por anticorpo. Em outro estudo no qual foram avaliados anticorpos anti-HLA pelas técnicas de CDC, ELISA e micro-esferas em 1.229 receptores de transplante de rim com pelo menos 1 ano de transplante, os autores demonstraram que 5,5% dos pacientes apresentaram anticorpos anti-HLA doador específicos, 11,3% anticorpos não doador específicos e 83% permaneceram sem anticorpos. Na análise multivariada, incompatibilidade HLA-

DR, sensibilização pré-transplante e rejeição aguda associaram-se significativamente com anticorpos doadores específicos e não doadores específicos e pacientes com anticorpos tiveram pior sobrevida do enxerto, pior função renal e mais proteinúria (44).

Everly *et al.* mostraram que diminuindo o nível do anticorpo doador específico (ADE) *de novo* durante rejeições agudas, diminui a perda dos enxertos renais. Eles analisaram múltiplas variáveis como: raça, PRA, C4d, ADE *de novo* e retransplante, e viram que a única variável que influenciou de forma significativa na sobrevida do rim transplantado era o ADE *de novo*. Pacientes que tiveram redução de ADE *de novo* maior que 50% no período de 14 dias após o diagnóstico da rejeição aguda, tiveram uma melhor sobrevida quando comparado àqueles enxertos em que não houve essa redução nos títulos de ADE. Com isso eles sugerem que a redução de ADE deveria ser considerada como um objetivo terapêutico na rejeição do transplante (66).

A prevalência de anticorpos anti-HLA no pós-transplante em 2.278 transplantados renais foi de 20,9% conforme demonstrado por Terasaki *et al* em um estudo multicêntrico. Pacientes que desenvolveram anticorpos pós-transplante tiveram 8,3% de falência do enxerto em um ano quando comparados com 3,3% de falência naqueles sem anticorpos (45). Os autores sugerem que o aparecimento de anticorpos circulantes precede o episódio de rejeição, não só em transplante renal, mas também em transplantes de coração, pulmão e fígado e que estes anticorpos podem estar envolvidos na rejeição crônica. Neste estudo, entre outros, a pesquisa dos anticorpos foi aleatória (em qualquer ocasião pós-transplante) e a especificidade dos mesmos não foi definida.

Gill *et al.*, realizaram um estudo observacional e prospectivo colhendo exames de sangue de forma seriada e biopsiaram os enxertos no 3º mês e no 1º ano após o transplante. Na tentativa de identificar ADE *de novo* em pacientes não sensibilizados e diagnosticar rejeição aguda antes da evidência clínica da disfunção do enxerto pela técnica FLOW PRA, eles encontraram uma fraca associação entre anticorpos anti-HLA e rejeição aguda. Nem todos que desenvolveram anticorpos *de novo* anti-HLA tiveram a experiência de rejeição aguda (67).

Enquanto a importância dos anticorpos anti-HLA classe I é bem conhecida, a determinação da relevância dos anticorpos anti-HLA classe II ainda não foi totalmente estabelecida, uma vez que grande número de pacientes desenvolvem anticorpos classe I e II simultaneamente. Em um estudo, a incidência de anticorpos anti-HLA classe II, mas não classe I, detectada pós-transplante, aumentou conforme o aumento da incidência de rejeição aguda. A análise multivariada demonstrou que anticorpos

classe II foram fatores de risco para rejeição crônica em pacientes com antecedente de rejeição (46).

A presença de anticorpos anti-HLA classe II isotipo IgG a partir do 3º ano pós-transplante também tem sido associada à perda do enxerto por rejeição crônica, sendo fator de risco independente das demais variáveis em análise multivariada. Os anticorpos anti-HLA puderam ser detectados antes da rejeição crônica ou da falência do enxerto sugerindo que podem ser responsáveis pela disfunção do enxerto, que sua monitorização prospectiva pode ser um marcador precoce e não invasivo, ajudando no diagnóstico e na terapêutica precoce da rejeição (47-51).

Eng *et al.*, mostraram em seu estudo, realizado pela técnica Luminex, que mais da metade do grupo que tinha ADE pré-transplante desenvolveu glomerulopatia do transplante em 2 anos e perdeu seus enxertos em 5 anos. Para comparar, em 14 pacientes que tinham glomerulopatia do transplante em suas biópsias e nunca desenvolveram ADE, apenas 1 perdeu o enxerto em 5 anos de acompanhamento. Assim os autores definem como importante a monitorização do ADE por Luminex devido à sua alta sensibilidade e especificidade em identificar anticorpos *de novo* em baixos títulos que estão associados com o desenvolvimento da glomerulopatia do transplante, visto que é um significativo preditor da perda do enxerto. Reforçam, ainda, o custo-benefício da monitorização precoce do ADE pós-transplante por Luminex no médio e longo prazo (68).

A incorporação do marcador C4d na avaliação histológica de enxertos renais está auxiliando no entendimento da patologia no transplante renal. O C4d é um produto da degradação do fator C4 da via clássica do sistema complemento. Liga-se covalentemente (ligação forte e estável) à superfície da célula endotelial o que facilita sua detecção por imuno-histoquímica e é um indicador indireto de presença de anticorpos no tecido renal.

O estudo pioneiro utilizando biópsias renais marcadas com C4d foi o de Feucht *et al* (52). Neste estudo, 51 de 93 biópsias de rins transplantados com disfunção foram positivas para C4d, sendo a sobrevivência do enxerto após um ano de 57% nos pacientes com depósitos difusos de C4d, e de 90% nos pacientes com biópsias sem deposição de C4d. Sua deposição em capilares peritubulares é preditiva da sobrevivência do enxerto independentemente da lesão histológica encontrada e dos demais fatores prognósticos. A detecção de C4d tem especificidade de 96% e sensibilidade de 95% quando a presença de anticorpos anti-HLA doador específico circulantes são considerados padrão-ouro para o diagnóstico de rejeição mediada por anticorpo.

O C4d praticamente não é detectado em doença renal primária, mas está presente em cerca de 30% das biópsias realizadas após o transplante renal. Ocorre em 24 a 43% das biópsias renais com rejeição aguda Banff I; em 45% na rejeição aguda Banff II e em 50% das rejeições Banff III; em 50 a 60% das glomerulites e somente em 14% das biópsias sem evidência histológica de rejeição (12, 59). Sua detecção é limitada a órgãos transplantados e diante de um resultado positivo deve-se avaliar o quadro clínico e a presença de anticorpos anti-HLA circulantes .

Fatores de risco para deposição de C4d são anticorpos pré-formados, re-transplantes, gestações, resistência ao tratamento anti-rejeição e presença de anticorpos anti-HLA *de novo* (42, 53, 54).

Vários estudos tentam associar a presença de C4d com anticorpos circulantes, entretanto, esta correlação não é perfeita e anticorpos anti-HLA podem ser detectados na ausência de C4d e vice-versa (53, 55). 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 para C4d, enquanto ocorre em menos de 10% das rejeições sem marcação para C4d (46, 52). Deposição de C4d sem detecção de anticorpos anti-HLA circulantes pode ser consequência da absorção desses anticorpos pelo enxerto (31), o que pode ser demonstrado através da eluição de anticorpos anti-HLA do enxerto rejeitado e nefrectomizado (60). Anticorpos circulantes na ausência de C4d pode ser devido a anticorpos não fixadores de complemento, anticorpos anti-HLA em baixos títulos e não detectados pelas técnicas habituais ou ainda por anticorpos não-HLA (61).

Marrari e Duquesnoy estudaram a dinâmica do ADE antes e após a retirada do enxerto. Encontraram que os níveis de ADE aumentam após a nefrectomia do rim transplantado. A absorção destes anticorpos pelo enxerto poderia explicar esse fenômeno. (69).

A relevância dos anticorpos não HLA na deposição de C4d em biópsias de enxerto renal ainda permanece obscura devido ao limitado número de estudos disponíveis na literatura. Alguns autores sugerem que, *in vitro*, anticorpos não HLA não desencadeiam lise mediada por complemento de células endoteliais ou de outras células-alvo. Todavia, tais anticorpos possuiriam outras funções efetoras com modulação da resposta imune e importantes consequências clínicas (62). Outros estudos, por sua vez, sugerem que anticorpos não HLA podem causar deposição de C4d na rejeição aguda, mas este seria um evento raro e dependente do título destes anticorpos (56,57).

Em muitos episódios de rejeição os componentes humorais e celulares podem ocorrer simultaneamente, sendo o componente humoral muitas vezes não diagnosticado em cortes histológicos convencionais. Por esta razão, considera-se atualmente que a pesquisa de C4d deve ser feita em todas as biópsias de rim transplantado. Relação entre anticorpos circulantes, deposição de C4d e lesão renal são critérios diagnósticos para rejeição mediada por anticorpos o que é amplamente aceito como entidade clínico-patológicas (58).

David-Neto *et al* tentaram se antecipar no diagnóstico de rejeições mediadas por anticorpos. Para tanto, pesquisaram a presença de C4d em biópsias renais após 1 hora da reperfusão do enxerto. Nesse estudo foram avaliados 229 pacientes transplantados, dos quais 14(6%) evoluíram com rejeição mediada por anticorpos de forma aguda em média 8 dias após o transplante. Anticorpos doador específico foram detectados em todos os casos de rejeição e foram tanto de classe I como de classe II. No entanto, nenhuma dessas 229 biópsias realizadas após 1 hora de reperfusão foram positivas para a presença de C4d em capilares peritubulares (64).

Surgiram estudos evidenciando a existência de rejeição aguda mediada por anticorpo em enxerto renal com a ausência da fixação do C4d em capilares peritubulares (72, 73). Em seu estudo, Haas mostrou que a lesão microvascular causada pela presença do ADE tem potencial para evoluir com fibrose intersticial/atrofia tubular, glomerulopatia do transplante e a perda do enxerto independente da presença do C4d nos capilares peritubulares. Seus dados ainda mostram níveis de agressão similares por rejeição aguda mediada por anticorpo com C4d positivo ou C4d negativo: glomerulite e capilarite peritubular (74).

Não é surpresa que C4d não é o principal marcador para o diagnóstico da rejeição mediada por anticorpos. Muitos grupos concordam que o mesmo é muito específico quando aparece nos capilares peritubulares, porém não é um marcador sensível suficiente para todas as formas de rejeição mediada por anticorpos (72, 75).

Dados sobre a incidência de anticorpos anti-HLA no pós-transplante tem sido contraditórios na literatura. Esta variabilidade se deve a vários fatores, incluindo tipo de técnica utilizada, imunossupressão, população estudada, variabilidade nos tempos de coleta das amostras de soro (coletas tardias podem excluir pacientes que perderam o enxerto precocemente como resultado de rejeição aguda mediada por anticorpos). Além disso, em alguns estudos, os anticorpos anti-HLA doador específico foram avaliados, entretanto, em outros apenas o painel foi estudado.

Com a proposta de desvendar a relevância dos anticorpos doador específicos no pós-transplante, David-Neto *et al* realizaram uma pesquisa sobre o tema pela técnica de Luminex®. Usaram soro estocado do estudo MoDIFY (2002-2004) onde foram transplantados 118 pacientes, todos com prova cruzada por CDC para linfócitos T e B negativas. Desses pacientes, os pesquisadores conseguiram obter soros de 94 (80%) pacientes. Encontraram que 16 (17%) pacientes foram transplantados com presença de ADE e que em 8 (50%) deles. O anticorpo doador específico desapareceu espontaneamente. Nos outros 50%, títulos baixos de ADE não comprometeram o enxerto em 5 anos, enquanto que títulos altos se revelaram deletérios nesse período de seguimento (65).

Para compreendermos melhor a dinâmica dos ADE, quantifica-se seus valores de títulos em intensidade de fluorescência (MFI). Morris et al. mostraram que $MFI < 2000$ poderia ser um ponto de corte para a não contra indicação ao transplante renal. Os pacientes transplantados com prova-cruzada por CDC negativa e que tinham títulos baixos de ADE ($MFI < 2000$), tiveram sobrevida do enxerto equivalente aos que não apresentaram ADE, em um seguimento de 18 meses (70).

Já Singh et al., encontraram uma relação nos limites de intensidade de fluorescência (MFI Normalizado) para rejeições mediadas por anticorpos, onde os ADE classe I com MFI maior ou igual a 100 e classe II com MFI maior ou igual a 200 foram os limites inferiores associados ao maior risco para a rejeição. Entretanto, só os ADE classe II com MFI maior que 500, mostraram diminuição da filtração glomerular e aumento da proteinúria. Analisando os resultados sobre mortalidade e sobrevida do enxerto, não houve diferença para todos os MFI menores do que 1000, no seguimento de dois anos. Assim, os autores concluem que a presença de ADE pré-transplante associa-se a resultados inferiores para o rim transplantado. Entretanto, não são todos os pacientes com ADE pré-transplante que evoluem para rejeição mediada por anticorpos, suportando a hipótese de que outros fatores poderiam influenciar a evolução (71).

Publicações recentes (76-78) dão ênfase aos anticorpos anti-HLA doador específico *de novo* e mostram associação com complicações imunológicas severas e a perda do enxerto em médio e longo prazo. Para tentar elucidar o que ocorre no curto prazo, Heilman et al (86) publicaram a incidência e o impacto do aparecimento dos anticorpos anti-HLA doador específico *de novo* ao longo do primeiro ano após o transplante renal. Os autores encontraram uma incidência de 17%. Quando separados em grupos, aqueles que desenvolveram ADE *de novo* daqueles que não

desenvolveram. A presença de ADE *de novo* não mostrou impacto sobre rejeição aguda, função renal e sobrevida do enxerto ao final do primeiro ano de transplante. Contudo entre aqueles que desenvolveram ADE *de novo*, os que apresentaram MFI maior que 3000 tiveram um risco maior para rejeição mediada por anticorpos de 10.6.

Analisando a maioria dos estudos realizados, observamos que a pesquisa dos anticorpos pós-transplante não foi realizada de forma seriada e dinâmica em nenhum deles, mas sim de forma esporádica. A relação temporal com os episódios clínicos de rejeição e com a histologia da rejeição não foi bem definida, principalmente em subgrupos de pacientes sensibilizados e não sensibilizados no pré-transplante, tornando difícil definir a importância da detecção destes anticorpos como marcadores precoces de rejeição aguda e crônica particularmente pela técnica altamente sensível do Luminex®.

No estudo de Souza (63), 110 pacientes foram divididos após o transplante em 5 grupos, de acordo com a cinética dos anticorpos avaliados pela técnica de ELISA em momentos seriados do 1º ano pós-transplante. Grupo A (n=80) formado por pacientes nos quais não se evidenciaram anticorpos no pré e no pós-transplante; grupo B (n=8) formado por pacientes com anticorpos *de novo*; grupo C (n=5) formado por pacientes sensibilizados que permaneceram com mesmo nível de painel ao longo do 1º ano de transplante; grupo D (n=4) formado por pacientes sensibilizados que elevaram o nível de painel; e o grupo E (n=14) formado por pacientes sensibilizados que diminuíram o nível de painel durante o primeiro ano pós-transplante. Pacientes dos grupos B, C e D apresentaram mais episódios de rejeição aguda (respectivamente, 57%; 60% e 100%) do que os dos grupos A (18%) e E (7%), ($p < 0,001$). Entre os pacientes com rejeição aguda, 44% deles apresentaram anticorpos no momento da rejeição, sendo que em 90% dos casos esses anticorpos foram doadores específicos. A incidência de rejeição mediada por anticorpos foi de 11% e houve mais perda de enxerto nesses pacientes.

Tendo como limitante a escassez da literatura comparando as duas técnicas entre si, restava saber se, assim como ocorreu com a técnica de ELISA, a cinética dos anticorpos anti-HLA pós-transplante, quando detectados por Luminex®, se aplicaria também na definição de riscos de rejeição mediada por anticorpos e perda de enxerto, colaborando para a melhor estratégia de seguimento de pacientes transplantados renais.

2. OBJETIVOS

Principal

- Avaliar através de técnicas sensíveis (LUMINEX), a dinâmica dos anticorpos anti-HLA após o transplante renal e sua influência no aparecimento e na gravidade de episódios de rejeição aguda.

Secundários

- Avaliar a presença dos anticorpos anti-HLA no decorrer da evolução clínica dos transplantes com e sem episódios de rejeição.
- Avaliar o impacto da rejeição mediada por anticorpos e da presença de anticorpos anti-HLA sobre a função renal e sobre a sobrevida do enxerto aos 6 meses e 12 meses de seguimento.

3. MÉTODOS

3.1 Casuística

Este é um estudo prospectivo, observacional para avaliar pacientes submetidos a transplante renal isolado com doador falecido ou vivo (relacionado ou não relacionado) realizado no Serviço de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (STR-HCFMUSP). Os pacientes foram acompanhados por um período de 12 meses após o transplante ou até a perda do enxerto. A avaliação para inclusão no estudo foi realizada no momento da internação hospitalar para realização do transplante. Os pacientes que preencheram todos os critérios de inclusão e nenhum dos critérios de exclusão foram convidados a participar e a consentir sua participação no estudo. Os testes imunológicos foram realizados no Laboratório de Imunologia de Transplantes do Instituto do Coração da FMUSP. As análises histológicas pelo Serviço de Anatomia Patológica da FMUSP. Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq.) e aprovado em sessão de 25/05/2011 sob o nº 0233/11.

Os recursos técnicos necessários foram financiados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sob o processo nº 2011/18420-0.

Critérios de Inclusão

- Pacientes com mais do que 18 anos;
- Receptores de rim primário ou re-transplante, doador falecido ou vivo (parente ou não parente);
- Pacientes que tenham consentido e outorgado seu consentimento informado por escrito.

Critérios de Exclusão

- Pacientes com transplante de múltiplos órgãos ou com transplante prévio de outro órgão que não o rim;
- Pacientes que estavam recebendo alguma droga sob investigação;

- Pacientes com dificuldade para acesso vascular periférico para coletas rotineiras de sangue.

Após consentirem em participar do estudo, foi avaliada a história clínica, incluindo antecedentes de transplantes, gestações/abortos, hemotransfusões e história imunológica do paciente (prova-cruzada histórica positiva, grau de sensibilização anti-HLA).

Todos os pacientes receberam rim de doador com tipagem sanguínea ABO compatível e foram transplantados com prova-cruzada por citotoxicidade dependente de complemento negativa.

A imunossupressão utilizada foi definida de acordo com as indicações habituais do grupo, levando-se em consideração as características clínicas e imunológicas do paciente no pré-transplante. O controle clínico e condutas foram realizados enquanto o paciente permaneceu internado e nas consultas médicas subsequentes, conforme a rotina do serviço. Nestas visitas o médico assistente avaliou se o paciente apresentava sinais clínicos e/ou laboratoriais que sugeriam rejeição e decidiu sobre a indicação de biópsia renal.

Para detecção de anticorpos anti-HLA doador específicos, todos os pacientes foram avaliados por prova cruzada por CDC no pré-transplante. Aqueles com prova cruzada por CDC negativa, mas com presença de anticorpos anti-HLA no painel, foram também avaliados por prova cruzada pela técnica de Citometria de Fluxo para linfócitos T e B.

3.2 Desenho do Estudo

Os pacientes foram submetidos a coletas de sangue antes do transplante e da administração de qualquer terapia de indução, e nos dias 4, 7, 14, 30, 90, 180 e 360 após o mesmo, Figura 3. Cento e setenta pacientes foram incluídos no estudo.

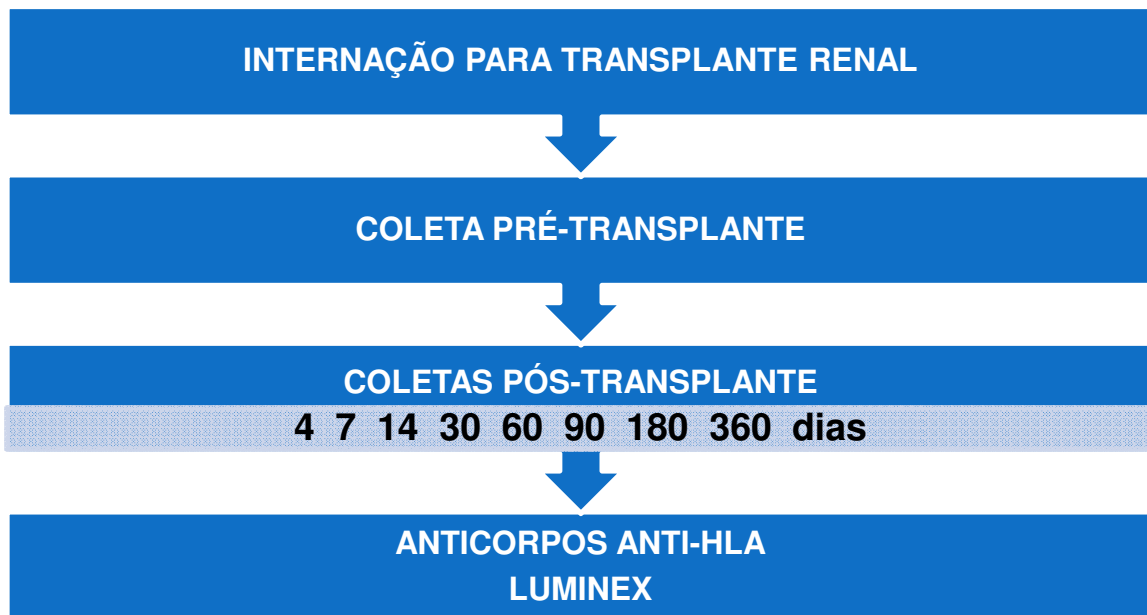


Figura 3: Fluxograma de execução das coletas de sangue.

Foram utilizados soros para pesquisa de anticorpos anti-HLA pelo teste de LabScreen Mixed® para os transplantados não sensibilizados; Single Antigen® para os sensibilizados; tipagem HLA de classe I para locci A, B e C; e classe II para os locci DR e DQ. Os pacientes não sensibilizados no pré-transplante e que não desenvolveram anticorpos anti-HLA no pós-transplante não foram tipados para o locci C e DQ por não apresentaram anticorpos contra esse antígenos. Os soros foram testados para avaliar a presença de anticorpos anti-HLA de classe I e de classe II do isotipo IgG.

De acordo com o painel pré-transplante, os pacientes foram classificados como sensibilizados ou não sensibilizados. A presença de qualquer anticorpo anti-HLA definiu o paciente como sensibilizado.

Para a detecção dos anticorpos anti-HLA doador específicos foi estabelecido pelo Laboratório de Imunologia um limite mínimo de 1000 de intensidade média de fluorescência no painel por Luminex. No momento da pesquisa desses anticorpos foi selecionado o anticorpo dominante, que seja o de maior nível de MFI. Ao longo do pós-transplante, consideramos variação de MFI, alterações iguais ou superiores a 20% do valor inicial.

Foram considerados anticorpos anti-HLA “*de novo*”, todos aqueles anticorpos anti-HLA não identificados no momento pré-transplante e que foram detectados em algum momento do pós-transplante.

No momento da coleta das amostras do 6º e 12º mês foram avaliadas a creatinina sérica, a relação urinária de proteína/creatinina e o *Clearance* de Creatinina, calculado pela equação de MDRD.

Para melhor compreensão da cinética dos anticorpos, os pacientes foram divididos em três grupos no pré-transplante de acordo com seu painel e a presença de anticorpos anti-HLA doador específicos. Nos pós-transplante, esses pacientes foram realocados em 8 grupos, dependendo de sua evolução imunológica, conforme ilustra a Figura 4:

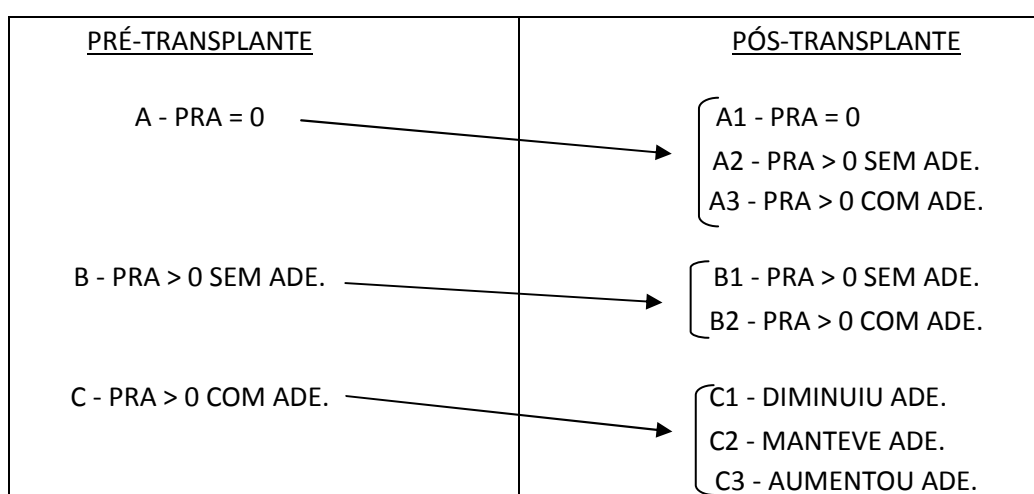


Figura 4: Divisão dos grupos.

Para melhor estudar o risco de rejeição, reagrupamos também os pacientes no momento pós-transplante em dois grupos; grupo baixo risco para rejeição mediada por anticorpos, isto é, os que não apresentaram ADE e diminuíram ou mantiveram os níveis de ADE que possuíam (A1, A2, B1, C1 e C2) e grupo alto risco para rejeição mediada por anticorpos, ou seja, todos pacientes que desenvolveram ADE *de novo* e aqueles que subiram seus níveis de MFI dos ADE que possuíam (A3, B2 e C3).

Em todos os casos de suspeita clínica de rejeição, definida como piora da função renal, diminuição do débito urinário e/ou função retardada do enxerto (necessidade de diálise nos 7 primeiros dias após o transplante), o paciente foi submetido à biópsia renal marcada com C4d, conforme rotina do serviço.

As biópsias renais foram realizadas pela equipe de Urologia do STR-HCFMUSP, preferencialmente pela via percutânea e avaliadas na Divisão de Anatomia Patológica. Os fragmentos foram submetidos à avaliação histopatológica com as colorações tradicionais e à marcação com C4d por imunofluorescência indireta

e/ou imunoperoxidase e classificadas conforme os Critérios de Banff 97 atualizado em 2009.

Marcação positiva para C4d foi considerada quando houve positividade linear em 10% ou mais dos capilares peritubulares. Para definir a rejeição aguda mediada por anticorpos anti-HLA foi utilizada a definição de Banff 2009 que, além da disfunção renal, deve apresenta-se com pelo menos dois dos seguintes critérios: lesão histológica na biópsia renal compatível com rejeição, C4d positivo em capilares peritubulares e/ou presença de anticorpo circulante anti-HLA doador específico.

Durante o período do estudo, todos os pacientes que retornaram para tratamento dialítico, submetidos ou não à nefrectomia do enxerto, foram considerados como falência do transplante. Pacientes que evoluíram para óbito com enxerto funcionante não foram considerados como falência do transplante.

Rejeições leves, classificadas como limítrofes e Banff I foram, inicialmente, tratadas com 3 pulsos diários de 500 mg/dia de Metilprednisolona endovenosa. Rejeições córtico-resistentes ou Banff II foram tratadas com Timoglobulina na dose total de 6-8 mg/Kg. Rejeições mediadas por anticorpos foram tratadas com sessões de plasmaferese seguidas de imunoglobulina polivalente (IVIg) na dose de 2 g/Kg e/ou de Rituximab 375 mg/m², de acordo com a disponibilidade dos produtos.

3.3 Tipificação HLA.

Para tipificação do HLA é necessária a extração do DNA obtida de células do sangue periférico. O DNA genômico foi extraído a partir da amostra colhida com EDTA. As extrações foram realizadas pelo método que utiliza sais de Brometo de Tetrametilamônio.

O sangue foi inicialmente centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm. O "buffy-coat" ("papa de leucócitos") foi recuperado e transferido para 2 tubos de 2ml (aproximadamente 500µl em cada tubo) ao qual foi adicionado igual volume de tampão de lise, DTAB 12% (brometo de dodeciltrimetilamônio). Os tubos foram, então, homogeneizados e incubados em banho-maria 68°C por 5 minutos. Dois volumes de clorofórmio foram acrescentados e os tubos agitados vigorosamente. Após centrifugação por 2 minutos a 10.000 rpm, a camada superior (aquosa) onde estava o DNA foi recuperada e foram adicionados 2 volumes de CTAB 0,5% (brometo de

hexadeciltrimetilamônio). Esta mistura foi homogeneizada até a obtenção do precipitado DNA/CTAB. Após nova centrifugação por 2 minutos à 10.000 rpm, o “pellet” DNA/CTAB foi ressuspensionado em 300µl de NaCl 1,2 M (cloreto de sódio) e reprecipitado em 750µl de etanol absoluto. Centrifugou-se mais 2 minutos a 13000 rpm e o “pellet” foi ressuspensionado em etanol 70%, para retirar o excesso de sal. O sobrenadante foi, então, desprezado, enquanto o DNA obtido foi dissolvido em H₂O.

A quantidade e a pureza do DNA genômico foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis) nos comprimentos de onda de 260 e 280nm. A razão de λ 260/280nm variou de 1,7 a 1,9 indicando boa qualidade do DNA. Todas as amostras ficaram estocadas em freezer -80°C para o início das tipificações.

Para a tipificação HLA A, B e DR dos doadores falecidos foi realizada por PCR-SSP, reação de polimerização em cadeia utilizando sequência específica de primers (do inglês, *Polymerase Chain Reaction- Sequence Specific Primers*) utilizando kits LABType SSP (One Lambda, California, USA).

A amplificação da região de interesse do DNA foi realizada utilizando primers específicos para diversas sequências alvo. Após o processo de reação de polimerização em cadeia os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose, visualizados por coloração com brometo de etídio e exposição a luz ultravioleta. A interpretação dos resultados de PCR-SSP baseia-se na presença ou ausência de um fragmento de DNA amplificado específico. Existe um par de primers de controle interno incluído em todas as reações de PCR. O par de primers de controle amplifica uma região conservada do gene da β -globina humana, que está presente em todas as amostras de DNA prova e que é usada para confirmar a integridade da reação.

A tipificação HLA A, B e DR dos receptores e doadores vivos, assim como a tipificação do HLA C e DQB1, também dos doadores falecidos, foi realizada utilizando o kits LABTypes SSO (One Lambda, California, USA), (do inglês, *Sequence Specific Oligonucleotide*) segundo orientação do fabricante.

Inicialmente foi realizada a amplificação gênica utilizando-se *primers* biotinilados específicos para a região gênica de interesse e primers específicos para amplificação de alelos. O produto de PCR amplificado foi então desnaturado e colocado frente a sondas marcadas (hibridização) conjugadas a microesferas codificadas por fluorescência que fazem parte do sistema multianalítico Luminex. Cada

microesfera é marcada com uma determinada fluorescência e possui uma sonda de oligonucleotídeo correspondente a um alelo HLA ou a um grupo de alelos HLA. Após esta etapa de hibridização, as sondas que hibridizaram com o DNA foram marcadas com uma solução estreptavidina conjugada com ficoeritrina (SAPE) e, assim, foi realizada a leitura da reação.

As reações foram lidas no citômetro de fluxo LABScan™ 200 (tecnologia Luminex) que é capaz de reconhecer a fluorescência da microesfera e da SAPE ligada à sonda. Um laser para a cor vermelha ($\lambda 633\text{nm}$) reconhece a cor da microesfera e outro laser reconhece a marcação com SAPE, verde ($\lambda 532\text{nm}$), determinando a positividade da reação. Os dados gerados pelo aparelho foram analisados no software HLA Fusion v. 3.0 para a determinação dos alelos.

3.4 Avaliação da resposta humoral

Os soros foram obtidos a partir da coleta de 10 mL de sangue periférico em tubos *vacutainer* (BectonDickson, Mountainview, CA, EUA) sem anticoagulante e permaneceram armazenados em refrigeradores a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da realização dos ensaios.

Nos casos de doadores vivos, as células mononucleares foram obtidas a partir de 30 mL de sangue periférico coletados em tubos *vacutainer* (BectonDickson, Mountainview, CA, EUA) com o anticoagulante heparina sódica.

Nos casos de doadores falecidos, foram coletados fragmentos de baço ou linfonodos. Esses foram reduzidos a fragmentos menores para liberação das células presentes no parênquima tecidual.

Em ambos os casos, a suspensão celular obtida foi centrifugada a 1.500 rpm por 10 minutos, e ressuspensa em RPMI a 10%. A contagem celular foi ajustada para obter concentração de 15 a 20×10^6 células/mL. Após processo de congelamento, os linfócitos totais foram distribuídos em tubos de criopreservação e refrigerados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso.

3.5 Teste de Citotoxicidade Dependente de Complemento (CDC)

Essa técnica foi realizada no pré-transplante de todos transplantes realizados. Os linfócitos do doador foram separados por centrifugação, utilizando-se gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque, $d=1,077\text{g/L}$. Após a centrifugação, foi coletada a “nuvem” de células mononucleares. A trombina foi utilizada para eliminar as plaquetas e granulócitos existentes na suspensão celular, de modo a restar apenas linfócitos totais.

Pela técnica de aderência à lã de náilon, os linfócitos totais foram separados em linfócitos T e linfócitos B. A seguir, a concentração celular é ajustada para 2,5 a $3,0 \times 10^6$ células/mL antes de dispensá-las em placas.

Foi incubado 1 μL da suspensão celular (linfócitos T ou linfócitos B do doador) com 1 μL de soro do receptor por poço, em placa de Terasaki (One Lambda, Canoga Park, CA, EUA), durante 30 minutos para a placa com linfócitos T e durante 60 minutos para a placa com linfócitos B, à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 5 μL por poço de complemento de coelho (One Lambda, Canoga Park, CA, EUA) para ambas as placas e a suspensão celular foi submetida à incubação durante 90 minutos a temperatura ambiente. A reação foi evidenciada pela adição de 10 μL de Stain-Fix (One Lambda, Canoga Park, CA, EUA) e, após transcorridos 20 minutos, o resultado foi avaliado em microscópio de contraste de fase. O teste foi considerado positivo quando houve mais do que 10% de lise celular no soro-teste em comparação com o controle negativo.

Para caracterizar o isotipo do anticorpo, foi utilizado o agente redutor ditioneitol (DTT) que destrói as pontes dissulfeto da molécula de IgM, inativando-a, sem interferir na reatividade dos anticorpos do isotipo IgG. O DTT foi utilizado na proporção de 1:10 e incubado com o soro-teste durante 30 minutos a 37 °C, sob agitação a cada 5 minutos.

Para obter maior sensibilidade no teste, foi utilizado o anticorpo anti-globulina humana, AGH (One Lambda, Canoga Park, CA, EUA), em uma placa contendo linfócitos T.

3.6 Prova-cruzada contra linfócitos por Citometria de Fluxo

Essa técnica foi realizada no pré-transplante sempre que o receptor fosse sensibilizado e recebesse um rim de doador vivo ou quando existisse células viáveis do doador falecido.

Em uma placa de 96 poços de fundo em U, foram dispensados 100 µL de suspensão celular (linfócitos totais do doador) contendo $0,5 \times 10^6$ células por poço. Após centrifugação da placa a 1.800 rpm durante 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado e a suspensão celular foi ressuspensa em agitador de placa. A seguir, a suspensão celular foi lavada com 150 µL por poço com tampão FACS (salina, soro fetal bovino a 2%, AZIDA 0,1%) seguida de nova centrifugação a 1.800 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Após, foram adicionados 25 µL por poço do soro correspondente (soro-controle negativo, soro-controle positivo e soro-teste) e, posteriormente, a suspensão celular foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. O soro-controle negativo foi composto por soro coletado de homem sadio, sem antecedentes de transfusão de hemocomponentes e do tipo sanguíneo AB; o soro-controle positivo é o soro de pacientes hiper-imunizados com anticorpos anti-HLA.

Após repetir o processo de lavagem por mais 3 vezes, a suspensão celular foi incubada com 25 µL anticorpo anti-IgG humano conjugado com FITC (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), diluição de 1:50, a 4 °C durante 30 minutos. Repetiu-se a lavagem mais 3 vezes e, a seguir, a suspensão celular foi incubada com 25 µL por poço de anticorpo anti-CD3 marcado com Cy-Chrome (Pharmigen, San Diego, CA, EUA) e com 25 µL por poço de anticorpo anti-CD19 marcado com PE (Pharmigen, San Diego, CA, EUA), ambos na diluição de 1:10, a 4 °C durante 30 minutos ao abrigo da luz. Estes anticorpos marcam antígenos de superfície nos linfócitos T e B, respectivamente. Após mais 3 lavagens, as células foram ressuspensas em 400 µL de tampão FACS em tubos de leitura e, só então, inicia-se a aquisição das células .

A análise do teste foi realizada em FACS-Calibur® (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Foram adquiridas 10.000 células para cada soro analisado. O resultado foi expresso em mediana de intensidade de fluorescência.

A prova-cruzada foi positiva quando a mediana de intensidade de fluorescência foi maior que 40 canais para linfócitos T e que 50 canais para linfócitos B acima do controle negativo.

3.7 Teste de micro-esferas marcadas (Luminex®)

Essa técnica foi realizada em todos os receptores no pré e no pós-transplante renal para definição do painel anti-HLA.

Os testes LABScreen® (One Lambda, Canoga Park, CA, EUA) baseiam-se na utilização de micro-esferas marcadas com antígenos HLA purificados classe I e classe II. As micro-esferas são codificadas por cores, podendo ser avaliadas em um único tubo. O teste Mixed® detecta simultaneamente a presença de anticorpos anti-HLA classe I e/ou classe II. O teste de Flow-PRA® detecta a porcentagem e a especificidade dos anticorpos anti-HLA detectados em cada amostra. O teste Single Antigen® confirma a especificidade do anticorpo encontrado no teste de Flow-PRA®.

Em uma placa de PCR com 96 poços, foram incubados 2,5 µL de micro-esferas com 10 µL de soro-teste em cada poço, durante 30 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz e sob homogeneização 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 homogeneização seguida de centrifugação a 1.300 rpm durante 5 minutos. Após, o tampão de 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). Em seguida, foram adicionados 50 µL desta solução por poço seguida de homogeneização e, só então, foi iniciada incubação durante 30 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz e sob homogeneização 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) e foi avaliada por intensidade média de fluorescência (MFI="Mean Fluorescence Intensity"), unidade que expressa a intensidade do anticorpo, medida pela citometria de fluxo. Foi estabelecido 1000 de MFI para a técnica Single Antigen®

como corte, qualquer anticorpo com valor de MFI acima do ponto de corte foi considerado positivo e abaixo foi considerado negativo.

Para os testes FlowPRA® e Single Antigen®, o valor fluorescente de cada esfera corresponde ao valor de cada esfera dividido pelo valor do controle negativo. Para os testes Mixed®, o sinal fluorescente foi equivalente ao valor da esfera menos o valor do controle negativo. O controle negativo foi constituído por um *pool* de amostras de soro retirado de doadores do sexo masculino que nunca receberam transfusões de sangue ou transplantes e que, portanto, não apresentam anticorpos anti-HLA. O soro controle positivo foi usado o próprio controle interno do fabricante do ensaio.

3.8 Estudo histológico

3.8.1 Microscopia Óptica:

Para microscopia óptica, as colorações utilizadas foram hematoxilina-eosina (HE), ácido periódico de Shiff (PAS) e Tricrômio de Masson.

3.8.2 Imunofluorescência indireta para C4d

Os fragmentos de rim congelado foram cortados numa espessura de 2 a 4 μm e colocados em superfície seca para descongelar durante 30 minutos. Após, os fragmentos foram submetidos à lavagem com PBS seguida da aplicação de 150 μL do complexo avidina/biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) para bloquear a biotina endógena, durante 20 minutos. Após nova lavagem com PBS, foi iniciada incubação dos fragmentos com anticorpo monoclonal de camundongo anti-C4d humano (1:100 clone 10-11, Biogenesis, Sandown, NH, MO, EUA) durante 30 minutos. Os fragmentos foram lavados com PBS mais 3 vezes durante 2 a 3 minutos, e a seguir, foram incubados com anticorpo biotilado IgG de cavalo anti-camundongo na diluição de 1:100 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) durante 30 minutos. Em seguida, foram incubados com FITC-estreptavidina na diluição 1:100 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) durante 30 minutos .

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico.

3.8.3. Imunoperoxidase para C4d

A técnica de imunoperoxidase para C4d foi utilizada em amostras de biópsia renal em parafina.

Antes da realização da técnica de imunoperoxidase para C4d, as lâminas contendo fragmentos de biópsia renal de 2 µm de espessura foram submetidas à desparafinização. Em seguida, as mesmas foram submetidas à hidratação.

Após, os fragmentos foram submetidos à lavagem com PBS. A seguir, a atividade da peroxidase endógena é bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3%. Após, os fragmentos foram submetidos a 2 sessões de lavagem em água corrente destilada. A seguir, os antígenos foram recuperados em panela-de-pressão imersos em tampão de ácido cítrico 10 mM pH 6,0 por 5 minutos. Após mais 2 sessões de lavagem em água corrente destilada, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3%. Na sequência, foi iniciada incubação dos fragmentos com anticorpo policlonal de coelho anti-C4d humano na diluição 1:50 (Biomedica, Wien, Austria), a 4 °C durante toda a noite (*overnight*).

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico.

3.9 Análise Clínica

Os pacientes foram avaliados em relação ao número e a classificação dos episódios de rejeição aguda, usando a classificação de Banff 2009 (anexo). Foram analisadas as sobrevidas do enxerto após doze meses de transplante, assim como a presença de proteinúria e a função renal. A fórmula para estimar a taxa da filtração glomerular (TFG) utilizada foi a de equação MDRD simplificada, do inglês *Modification of Diet in Renal Disease*, que utiliza quatro variáveis (idade, raça, sexo e creatinina sérica). Para sexo e raça existe um multiplicador; se negros 1,21, se mulheres não negras 0,742 e para todos outros indivíduos 1,0. Conforme equação a seguir:

$$\text{TFG} = 186 * \text{creatinina_sérica}^{-1.154} * \text{idade}^{-0.203} * \text{multiplicador}$$

Os resultados encontrados foram relacionados com a ausência, a presença e a cinética de anticorpos anti-HLA.

3.10 Análise Estatística

Associação entre variáveis qualitativas foi realizada através do teste do Teste Exato de Fisher. Associação entre variáveis respostas qualitativas e variáveis de explicação quantitativas, foram feitas através da análise de regressão logística. As diferenças nas médias foram avaliadas através de teste t para duas amostras, análise de variância (ANOVA) ou teste de Kruskal-Wallis nos casos em que a suposição de normalidade dos dados não foi satisfeita. As análises de sobrevivência foram realizadas pelo o método de Kaplan-Meier e a comparação entre essas curvas foi realizada através do teste de *log-rank*. Consideramos nos testes o nível de significância de 0,05, o que equivale a uma confiança de 95%. A análise estatística foi realizada com auxílio do programa SPSS para *Windows*, versão 21 (SPSS Inc, Chicago, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Pacientes incluídos

No período de 02 de julho de 2011 à 31 de março de 2012, foram realizados 223 transplantes no Serviço de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da FMUSP. Desses 223, 43 não preencheram critérios para a inclusão; 27 por não terem concordado em participar e/ou não assinaram o termo de consentimento e 16 por serem menores de 18 anos. Dos 180 que preencheram critérios de inclusão, 10 preencheram também critérios para exclusão, todos por serem transplantes de múltiplos órgãos (4 rim-pâncreas; 3 rim-fígado; 2 receberam transplante de rim após transplante de fígado e 1, recebeu dois rins do mesmo doador). Restaram 170 pacientes para serem analisados nesse estudo, conforme mostra a Figura 5:

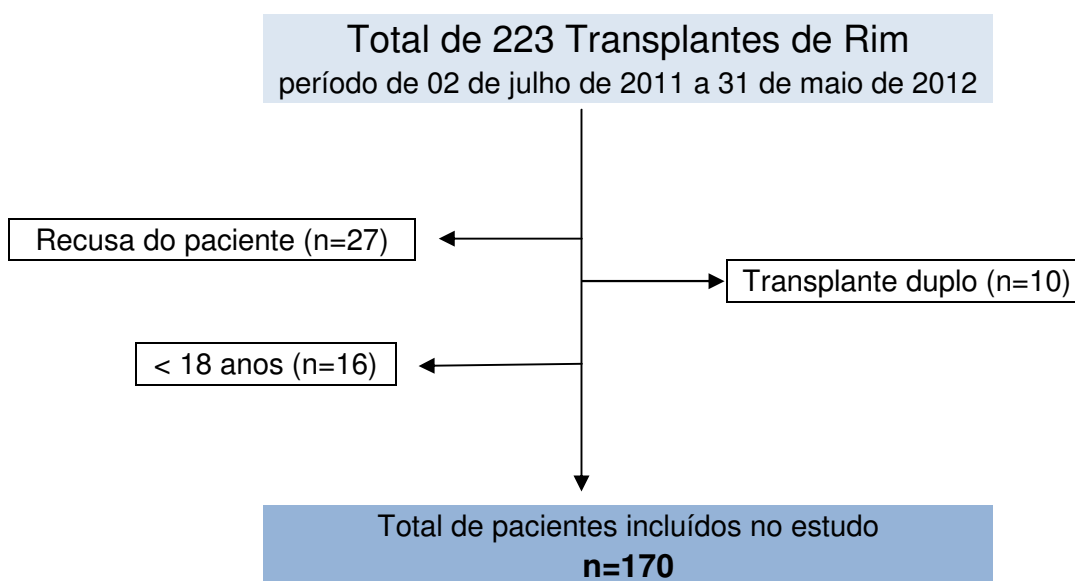


Figura 5: Pacientes incluídos no estudo.

Dos cento e setenta pacientes, foram analisados 150 sendo que: 6 não foram analisados por óbito precoce (cinco por septicemia e um por infarto agudo do miocárdio); 7 por perda precoce do enxerto (três por trombose venosa, um por infecção do enxerto, um por recidiva da doença de base, um por pielonefrite e um por falência primária do enxerto). Todas essas perdas ocorreram durante o primeiro mês

de transplante. Outros sete pacientes não foram analisados por perda de seguimento ao longo do estudo (Figura 6):

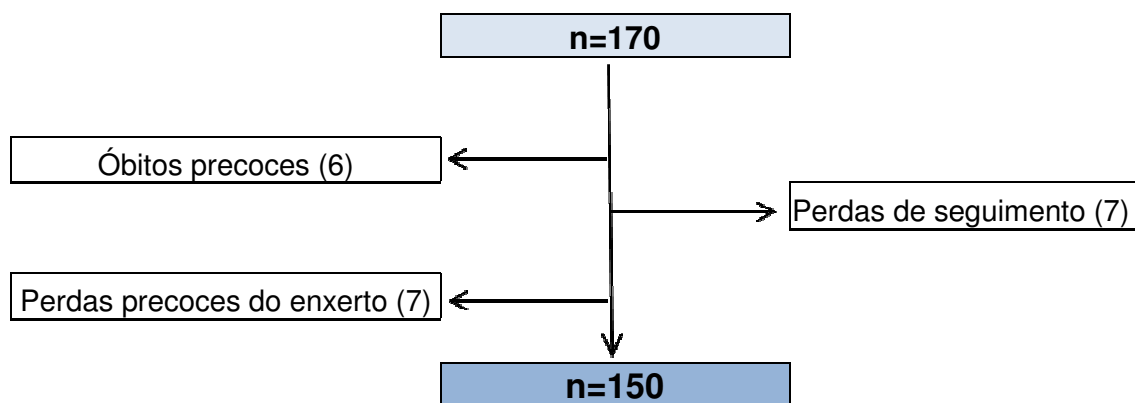


Figura 6: Pacientes incluídos na análise.

Foram estudados 82 pacientes do gênero masculino e 68 do gênero feminino, com idade média dos receptores de 46,4 anos. A idade média dos doadores foi 43,6 anos. Noventa e nove pacientes receberam rins de doadores falecidos, sendo que desses eram 45,5% sensibilizados, painel maior que zero, e 51 receberam rim de doadores vivos sendo, 29,5% sensibilizados. Oito (5,3%) transplantes foram preemptivos. Para 135 pacientes (90%) foi o primeiro transplante e para 15 (10%), o segundo.

Todos os pacientes apresentavam prova-cruzada contra linfócitos T e B por CDC negativa na véspera do transplante e receberam alguma terapia de indução: 108 (72%) receberam indução com anticorpos anti-receptor de interleucina-2 (anti IL-2R, Basiliximab, Novartis) e 42 (28%), com anticorpos anti-timocitários (Timoglobulina, Genzyme Corporation). Nos 42 pacientes que receberam Timoglobulina, em 31 (73,8%), a indicação da droga foi o maior risco imunológico (PRA>0) e em 11 (26,2%) o tempo de isquemia maior do que 24 horas.

Onze pacientes - 3 transplantados com rim de doador vivo e 8 receptores de rim de doador falecido - haviam participado de um protocolo de dessensibilização anti-HLA no pré-transplante com Imunoglobulina polivalente humana (IVIg), pois apresentavam prova-cruzada positiva contra seus doadores ou painel muito elevado em lista de espera. Destes, os que receberam o órgão de doadores vivos (3), além de

receberem indução com Timoglobulina, receberam também IVIg no momento do transplante.

A imunossupressão inicial de todos os pacientes foi baseada em esquema tríplice que incluiu: Prednisona, inibidor de calcineurina (Tacrolimo) e uma droga antiproliferativa (Micofenolato sódico).

4.2 Reatividade contra painel no pré-transplante renal.

Oitenta e nove pacientes (59,3%) apresentaram PRA classe I e classe II negativos e foram considerados não sensibilizados. Nove pacientes (6%) apresentaram anticorpos anti-HLA classe I, 6 pacientes (4%) apresentaram anticorpos anti-HLA classe II e 46 pacientes (30,7%) apresentaram anticorpos anti-HLA classe I e II no pré-transplante. No total, 61 pacientes (40,7%) foram considerados sensibilizados no pré-transplante.

Esses pacientes foram divididos em 3 grupos de acordo com seus respectivos painéis:

Grupo A – PRA = 0 (n=89 pacientes).

Grupo B – PRA > 0 sem ADE (n=39 pacientes).

Grupo C – PRA > 0 com ADE (n=22 pacientes).

4.3 Dados demográficos e características clínicas dos pacientes.

Os dados clínicos dos 150 pacientes alocados em seus respectivos grupos no pré-transplante estão representados na tabela 1.

Tabela 1 - Dados demográficos e características clínicas dos 150 pacientes segundo os grupos - PRÉ-TRANSPLANTE.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	P
<i>n (%)</i>	89 (59,3%)	39 (26%)	22 (14,7%)	
<i>Idade receptor anos</i>	45,1	50,5	44	NS
<i>Idade doador anos</i>	42,7	44,1	46,7	NS
<i>Diálise pré-TX: sim</i>	84 (94,4%)	36 (92,3%)	22 (100%)	NS
<i>Gênero masculino</i>	64 (71,9%)	14 (35,1%)	5 (22,7%)	< 0,001
<i>Tipo de doador: Falecido</i>	54 (60,7%)	30 (76,9%)	15 (68,2%)	NS
<i>Primeiro TX</i>	86 (96,6%)	36 (92,3%)	13 (59,1%)	<0,001
<i>Gestação Prévia; Sim</i>	14 (56%)	23 (92,0%)	14 (82,4%)	<0,001
<i>Transfusão Prévia; Sim</i>	36 (40,4%)	22 (56,4%)	14 (63,6%)	NS
<i>N° incomp. HLA</i>				
<i>A</i>	1,24	0,97	1,45	0,025
<i>B</i>	1,10	1,13	1,59	0,007
<i>C</i>	-*	1,16	1,55	0,041
<i>DR</i>	0,63	0,36	0,77	NS
<i>DQ</i>	-*	0,47	0,86	0,033
<i>Indução: Ac. Anti-timocitário</i>	11 (12,4%)	12 (30,8%)	19 (86,4%)	< 0,001

Ac. Anti-timocitário: ATG - Timoglobulina.

* Não foram tipificados pela ausência de anticorpos.

Os pacientes dos Grupos A, B e C foram semelhantes em relação à idade do receptor, idade do doador, realização crônica de diálise antes do transplante, tipo de doador, antecedente de transfusões e número de incompatibilidades HLA em DR.

Nos pacientes sensibilizados pré-transplante observamos: maior percentual de mulheres, de retransplantes, de gestações e o uso mais frequente de Anticorpos Anti-timocitários como indução.

Calculamos a chance de se sensibilizar com uma gestação prévia. Vimos que o percentual maior de mulheres sensibilizadas ocorreu no grupo com gestação prévia. O odds ratio foi de 5,81, isto é, a chance de se sensibilizar foi de 5,81 vezes maior nas mulheres do grupo com gestação prévia.

Assim calculamos, também, a chance de se sensibilizar com pelo menos uma transfusão. Entre pacientes com transfusão prévia, 50% deles eram sensibilizados já nos sem transfusão, 32,1% eram sensibilizados. O percentual maior de sensibilizados ocorreu no grupo de pacientes com transfusão prévia ao transplante renal. O odds ratio foi 2,12, ou seja, a chance de se sensibilizar com pelo menos uma transfusão foi 2,12 vezes maior naqueles pacientes que receberam transfusão prévia ao transplante.

Mostramos, na Figura 7, a distribuição dos transplantados quanto ao seu estado imunológico e o tipo de doador. Observamos pouca diferença entre os percentuais de tipo de doador em relação aos grupos de sensibilizados e não sensibilizados, embora o grupo não sensibilizado tenha apresentado um percentual de doadores vivos um pouco maior.

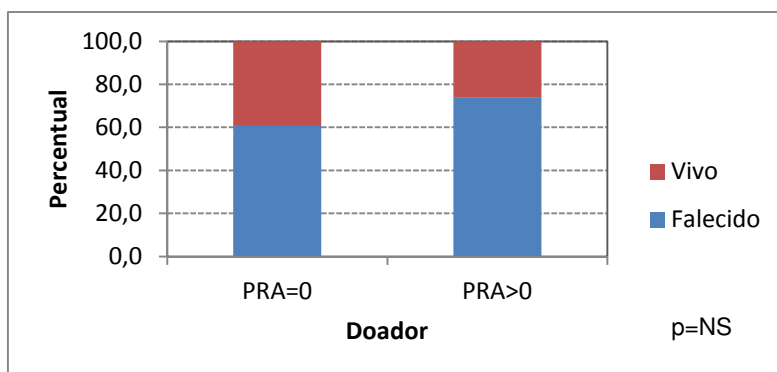


Figura 7: Distribuição percentual dos transplantados quanto aos doadores.

4.4 Monitorização dos anticorpos anti-HLA no pós-transplante.

Foram avaliados 1350 soros coletados dos 150 pacientes para monitorização dos anticorpos anti-HLA no decorrer do estudo.

Os 3 grupos de acordo com o painel do pré-transplante foram realocados em 8 grupos, de acordo com sua evolução imunológica, conforme mostra a Figura 4.

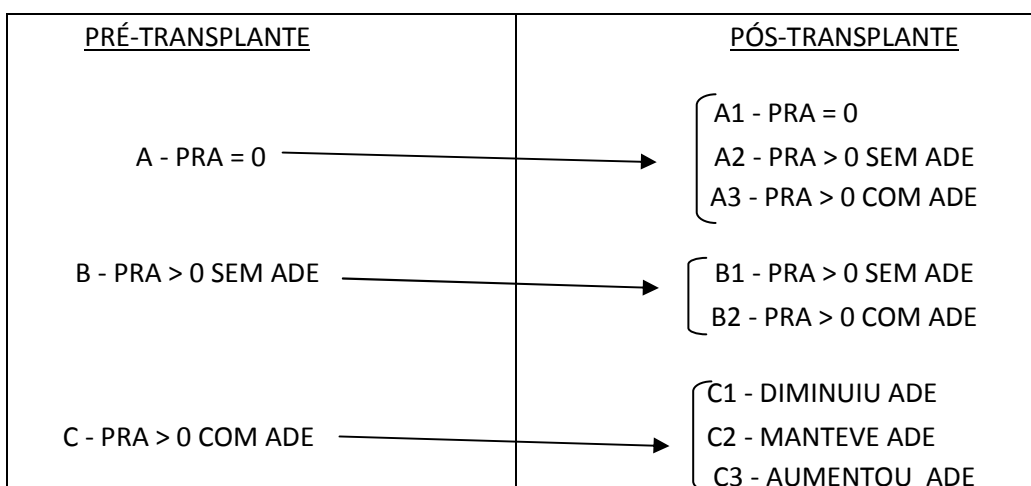


Figura 4: Divisão dos grupos.

PRÉ – TRANSPLANTE: (3 grupos)

Grupo A (n=89): pacientes sem anticorpos anti-HLA no pré-transplante.

Grupo B (n=39): pacientes com anticorpos anti-HLA não doador específico no pré-transplante para classe I e/ou II.

Grupo C (n=22): pacientes com anticorpos anti-HLA doador específico no pré-transplante para classe I e/ou II.

PÓS-TRANSPLANTE: (8 grupos)

Grupo A1 (n=79): pacientes sem anticorpos anti-HLA no pré-transplante, que continuaram sem anticorpos anti-HLA no pós-transplante.

Grupo A2 (n=8): pacientes sem anticorpos anti-HLA no pré-transplante que desenvolveram anticorpos anti-HLA no pós-transplante, porém não doador específico.

Grupo A3 (n=2): pacientes sem anticorpos anti-HLA no pré-transplante que desenvolveram anticorpos doador específico no pós-transplante.

Grupo B1 (n=34): pacientes com anticorpos anti-HLA não contra o doador no pré-transplante, que continuaram sem desenvolver ADE no pós-transplante.

Grupo B2 (n=5): pacientes com anticorpos anti-HLA não contra o doador no pré-transplante, que desenvolveram ADE no pós-transplante.

Grupo C1 (n=6): pacientes com anticorpos anti-HLA doador específico no pré-transplante, que reduziram os seus níveis de intensidade MFI-ADE no pós-transplante.

Grupo C2 (n=9): pacientes com anticorpos anti-HLA doador específico no pré-transplante, e que mantiveram a intensidade MFI-ADE ao longo do pós-transplante.

Grupo C3 (n=7): pacientes com anticorpos anti-HLA doador específico no pré-transplante, e que aumentaram seus níveis de intensidade MFI-ADE ao longo do pós-transplante.

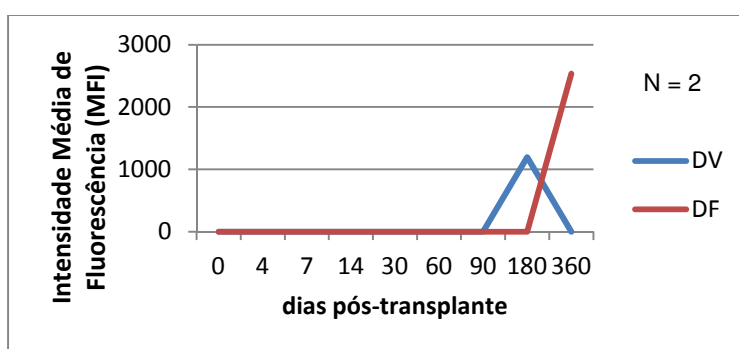
4.5 Estudo imunológico dos grupos

Grupo I (n=89), PRA=0

Nesse grupo todos os pacientes transplantaram sem anticorpos anti-HLA, mas dez deles (11,2%) desenvolveram anticorpos ao longo do primeiro ano de transplante.

Dois (2,2%), desenvolveram ADE, um anti classe I, que foi detectado no 180° dia pós operatório e outro, anti classe II, que foi detectado no 360° dia pós transplante, ambos sem associação com episódios de rejeição clínica (Figura 8).

Os oito pacientes restantes não desenvolveram anticorpos anti-HLA doador específico; dois deles apresentaram anticorpos anti-HLA de classe I não específico, que apareceram no 4° dia, mantiveram-se entre o dia 7° e o 14° pós operatório, desaparecendo no 30° dia pós-transplante. Em 1 paciente foram detectados anticorpos anti-HLA de classe I e de II no 30° dia pós-transplante, que desapareceram no 180° dia pós operatório e nos outros 5 pacientes, anticorpos anti-HLA classe de I e II apareceram em torno do 360° dia do pós transplante.

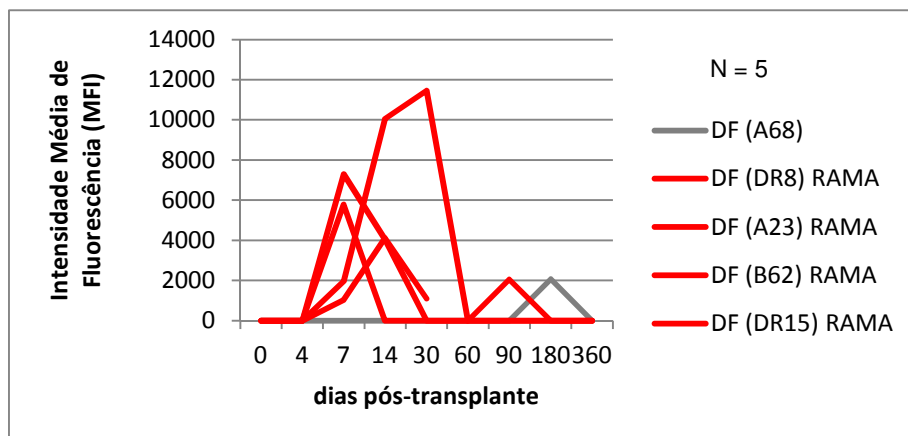


DV: doador vivo, DF: doador falecido

Figura 8: Aparecimento de anticorpos anti-HLA doador específico *de novo* em pacientes não sensibilizados.

Grupo B (n=39), PRA>0 sem ADE.

Nesse grupo, 39 pacientes foram transplantados com anticorpos anti-HLA, mas sem ADE. Cinco deles (12,8%), todos doadores falecidos, desenvolveram anticorpos anti-HLA doador específico: quatro desenvolveram ADEs precocemente [DR15 (MFI = 7295), DR8 (MFI = 5789), A23 (MFI = 1027) e B62 (MFI = 1955)] a partir do sétimo dia pós-cirurgia, causando episódio de rejeição mediada por anticorpos no primeiro mês. Outro paciente desenvolveu ADE classe II detectado apenas no 180° dia pós operatório sem relação com rejeição aguda clínica (Figura 9).



DF: doador falecido. RAMA: rejeição aguda mediada por anticorpos.

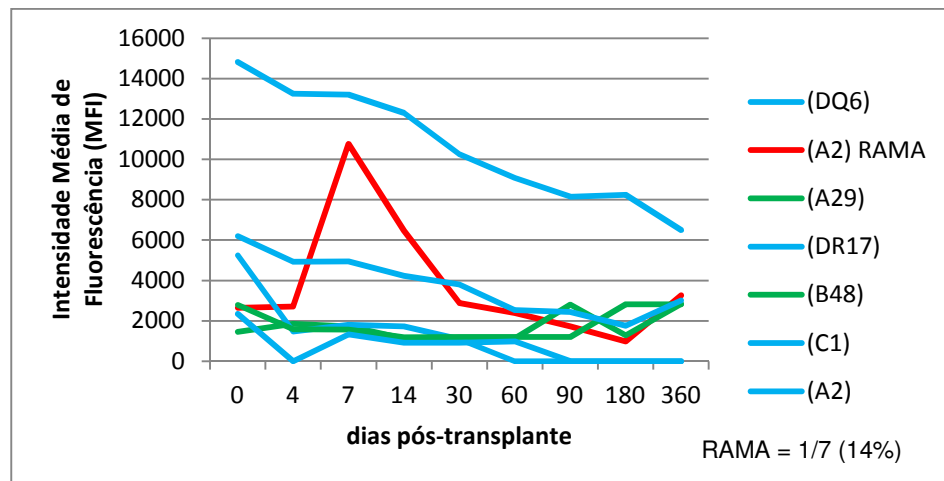
Figura 9: Cinética do aparecimento de anticorpos anti-HLA doador específico *de novo* nos pacientes sensibilizados pré transplante.

Grupo C (n=22), PRA>0 com ADE.

Este grupo foi composto de todos os pacientes que transplantaram com presença de anticorpos anti-HLA classe I e/ou II dirigido contra o doador. Neste grupo, tivemos seis transplantados que reduziram os níveis de MFI do ADE ($6/22 = 27\%$) e nenhum deles apresentou rejeição. Nove ($9/22 = 41\%$) mantiveram o mesmo nível de intensidade de seus anticorpos doador específico sendo que 2 (22%) evoluíram com rejeição mediada por anticorpos. Sete ($7/22 = 32\%$) aumentaram os níveis de intensidade de seus anticorpos doador específico sendo que 6 (85%) cursaram com rejeição mediada por anticorpos.

As figuras a seguir mostram a cinética dos anticorpos anti-HLA doador específico desse grupo, separados em doadores vivos (Figura 10), doadores falecidos (Figura 11) e a mediana desses 3 tipos de comportamentos sobrepostas (Figura 12): cor azul, mostra o grupo que diminuiu ou eliminou seus ADE; cor verde mostra o grupo que manteve seus níveis de ADE e a cor vermelha mostra os que aumentaram os títulos dos ADE ao longo do estudo:

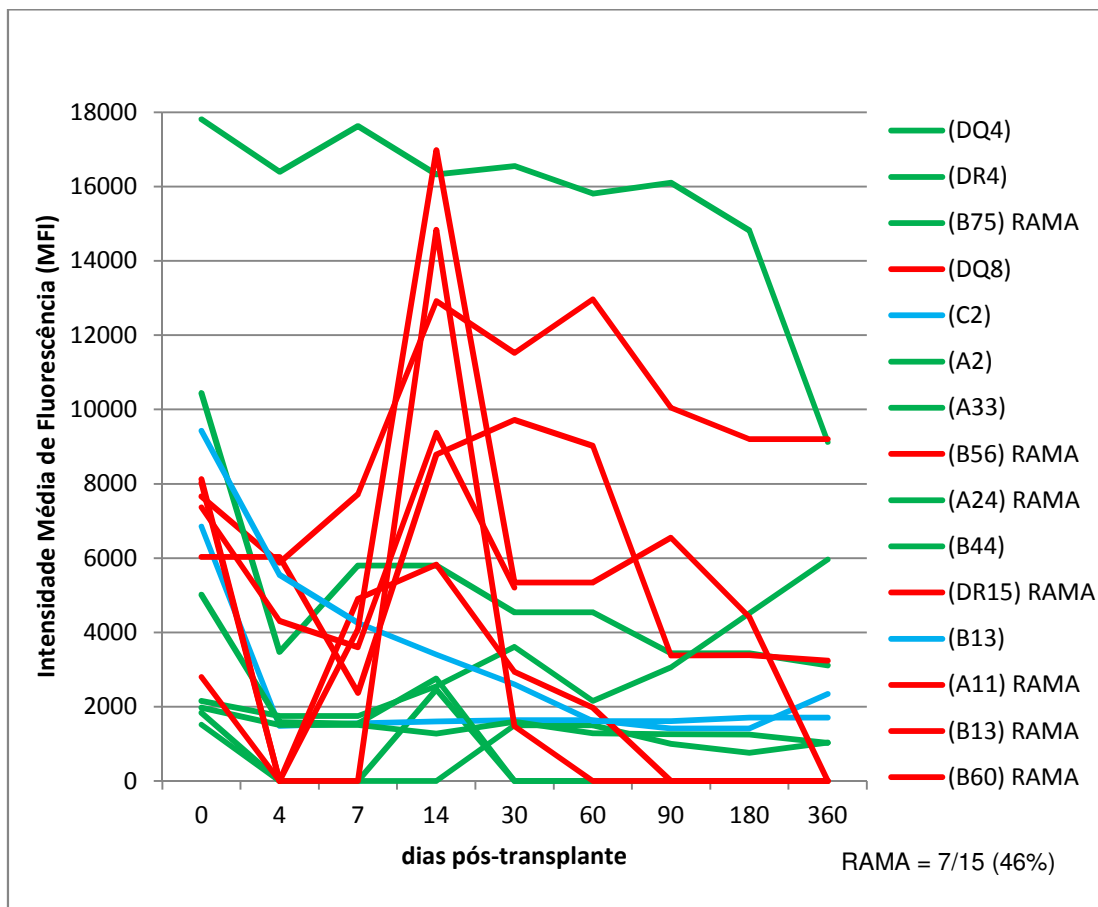
DOADORES VIVO (N=7)



RAMA: rejeição aguda mediada por anticorpos.

Figura 10: Cinética dos anticorpos anti-HLA doador específico em receptores de rim de doadores vivos.

DOADORES FALECIDOS (N=15)



RAMA: rejeição aguda mediada por anticorpos.

Figura 11: Cinética dos anticorpos anti-HLA doador específico em receptores de rim de doadores falecidos.

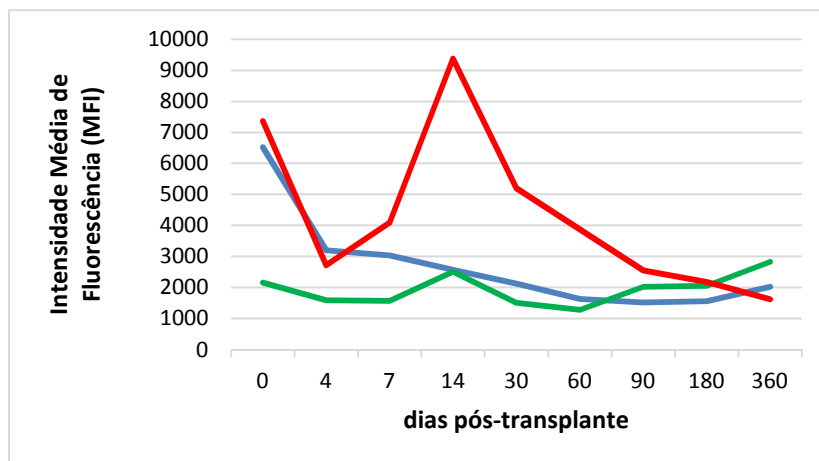


Figura 12: Comportamento expresso em medianas dos anticorpos anti-HLA doador específico.

Quando comparados os níveis de intensidade média de fluorescência dos anticorpos doador específico no momento do pré-transplante entre quem teve e não teve rejeição aguda mediada por anticorpos, podemos observar que não existiu diferença estatística entre eles ($p=0,458$). Com isso, não podemos prever uma possível rejeição a partir dos títulos dos anticorpos doador específicos do pré-transplante, como mostram a Tabela 2 e a Figura 13.

Tabela 2 – MFI-ADE dos pacientes que transplantaram com anticorpos doador específicos.

MFI pré-transplante			
N=22	sem RAMA (14)	com RAMA (8)	p
Média +/- DP	6478 +/- 5151	5232 +/- 2553	NS
Min-Max	(1453-17809)	(1835-8124)	

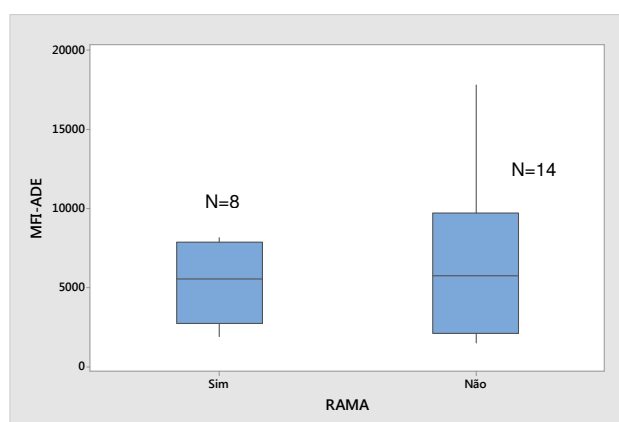


Figura 13: Box-plot dos MFI-ADE no momento do transplante.

Para analisarmos a cinética dos anticorpos doadores específicos, consideramos os pacientes dos grupos B e C. Na tabela 3 apresentamos as médias e desvios padrão dos MFI-ADE ao longo dos primeiros 14 dias de transplante. Na figura 14, as médias superpostas. Podemos notar que no grupo sem RAMA, a variação ao longo desse período é baixa, com uma ligeira queda. Para o grupo com RAMA, notamos uma queda acentuada no quarto dia e depois uma elevação entre o 7^a e 14^a dia pós-transplante.

Tabela 3 – Médias e desvios padrão dos MFI-ADE (N=22).

RAMA	Momento			
	Pré-tx	4 ^a PO	7 ^a PO	14 ^a PO
Sim	3488,0 (3283,7)	1230,9 (1725,5)	4334,0 (3004,6)	7791,8 (4790,9)
Não	6859,3 (5151,2)	5215,9 (5093,5)	5612,7 (5367,3)	5330,7 (5636,8)
p	NS	NS	NS	NS

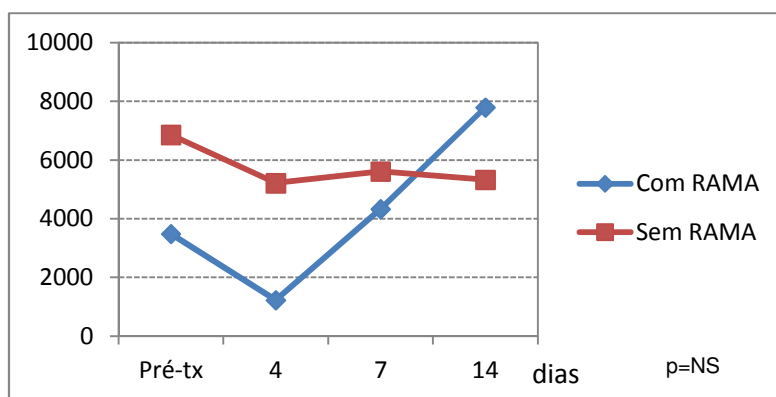


Figura 14: Médias dos MFI-ADE.

Por causa da grande variabilidade dos títulos de MFI-ADE entre os dois grupos, não houve diferença significativa entre eles nos vários momentos analisados.

Entre o pré-transplante e o 7^a dia, observamos que aquele grupo que apresentou rejeição aguda mediada por anticorpos teve um aumento médio do nível de MFI em relação ao pré-transplante de 22,2%. Já o grupo que não apresentou rejeição teve um descenso médio de 28,7% (p=NS), como ilustra a Tabela 4.

Tabela 4 – Médias e desvios padrão da variação do MFI-ADE entre pré-tx e o 7^a PO.

RAMA	Evolução	
	Pontual	Percentual
Sim	1144,3 (4658,8)	22,2 (145,6)
Não	-2060,2 (2163,6)	-28,7 (30,5)

Já entre o 4^a e o 7^a dia, observamos que o grupo que apresentou rejeição aguda mediada por anticorpos teve um aumento médio do nível de MFI de 43,9% em quanto o grupo que não cursou com RAMA teve um aumento médio de apenas 8% (p=NS), como ilustra a Tabela 5.

Tabela 5 – Médias e desvios padrão da variação do MFI-ADE entre o 4^a e o 7^a PO.

RAMA	Evolução	
	Pontual	%
Sim	2296,0 (3437,0)	43,9 (124,8)
Não	353,0 (990,0)	8,0 (24,3)

Analisamos o impacto da variação do nível de MFI com a creatinina ao final de 1 ano nos pacientes que transplantaram com ADE e não tiveram RAMA. Para avaliar se a correlação era significativa, calculamos o índice de correlação linear e fizemos o teste desse índice (p=0,053), pelo qual não houve diferença significativa, somente uma tendência, indicando que quanto maior a queda do MFI, menor será a creatinina ao final de 1 ano, conforme ilustrado na Figura 15. A equação da relação entre Creatinina e MFI ficaria assim:

$$\text{Creatinina} = 1,43526 + 0,00008728 * \text{MFI}$$

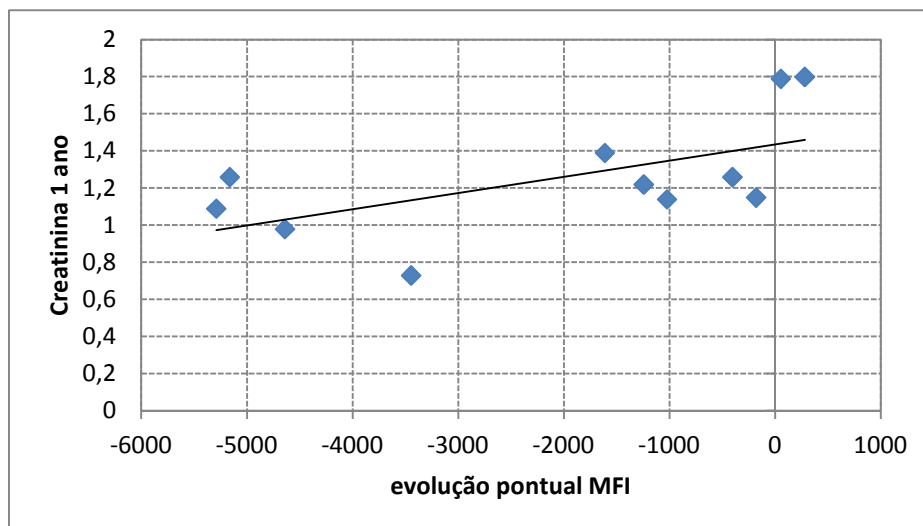


Figura 15: Correlação entre evolução MFI-ADE e creatinina ao final de 1 ano.

Realizamos curvas ROC nos tempos 0, 4, 7 e 14, para verificarmos qual seria o melhor momento para prever a rejeição aguda mediada por anticorpos, mas não encontramos sensibilidades e especificidades adequadas para esse uso. Todas as Áreas Sob a Curva não foram significativamente diferentes a 50%, como mostra a Tabela 6.

- Momento 0 → Sensibilidade de 87,5% e Especificidade de 35,7%
- Momento 4 → Sensibilidade de 100,0% e Especificidade de 41,7%
- Momento 7 → Sensibilidade de 80,0% e Especificidade de 53,8%
- Momento 14 → Sensibilidade de 81,8% e Especificidade de 63,6%

Tabela 6 - Área Sob a Curva para as Curvas ROC.

Momento	Área Sob a Curva	nível descritivo	IC
Momento 0	49,1	0,946	(24,8;73,4)
Momento 4	54,2	0,779	(27,0;81,3)
Momento 7	53,1	0,804	(28,5;77,7)
Momento 14	71,1	0,094	(47,8;94,3)

- Fatores de risco para aumento do MFI-ADE:

Para entender ainda mais essa cinética, separamos os grupos pela variação do MFI-ADE e/ou surgimento de anticorpo doador específico *de novo*. Vamos considerar no grupo A e B os pacientes que desenvolveram ADE *de novo* e no grupo C os pacientes que aumentaram seus níveis de ADE, considerando esses pacientes como de alto risco para rejeição mediada por anticorpos. Os que não desenvolveram ADE *de novo* diminuíram ou mantiveram seus níveis de MFI dos ADE foram chamados de baixo risco para RAMA.

Quando analisamos o gênero observamos um percentual maior de mulheres no grupo que aumentou o título do ADE (Figura 16). Calculamos o risco das mulheres de aumentar o MFI (*odds ratio*) e encontramos uma chance de 19,7 vezes.

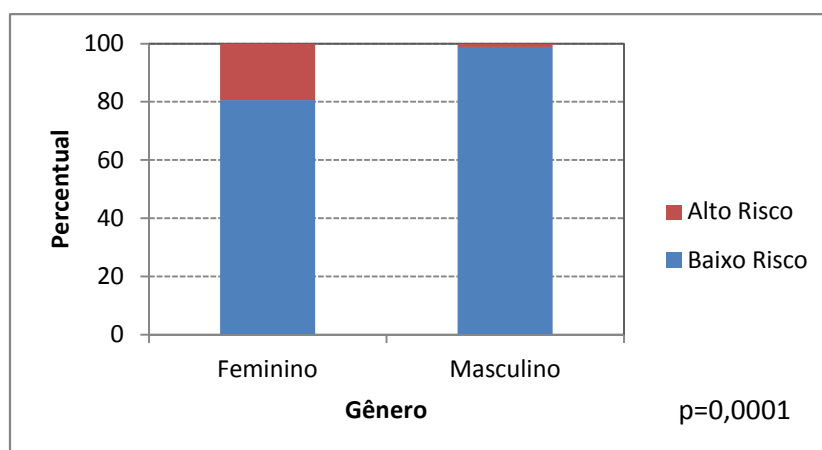


Figura 16 : Distribuição dos pacientes quanto ao gênero.

Em relação ao tipo de doador, observamos um percentual de aumento maior nos receptores de doador falecido. O *odds ratio* referente à chance de aumentar o nível de MFI do ADE foi 3,4 vezes maior nos receptores de rim de doadores falecidos, não encontramos diferença estatística. Para aqueles pacientes que receberam um retransplante existe 1,5 vezes mais risco de aumentar o nível de MFI do ADE.

O risco para pacientes com uma gestação prévia em aumentar o nível de MFI-ADE foi 4,6 vezes. Os receptores com pelo menos uma transfusão sanguínea antes do transplante tiveram um risco de 3 vezes mais de aumentar o nível de MFI-ADE.

4.6 Associação entre anticorpos anti-HLA e rejeição aguda

A incidência global de rejeição ao longo do estudo nos pacientes desta casuística foi de 20% (30 episódios em 150 pacientes). Em 12 pacientes (40%), a rejeição foi mediada por anticorpos e em 18 pacientes (60%), a rejeição foi mediada por células.

A rejeição aguda ocorreu entre 6 e 300 dias pós-transplante, mais frequentemente na segunda semana, com mediana de 15 dias. Para as rejeições mediadas por anticorpos a mediana foi de 12 dias e para as rejeições celulares foi de 83 dias (Figuras 17 e 18).

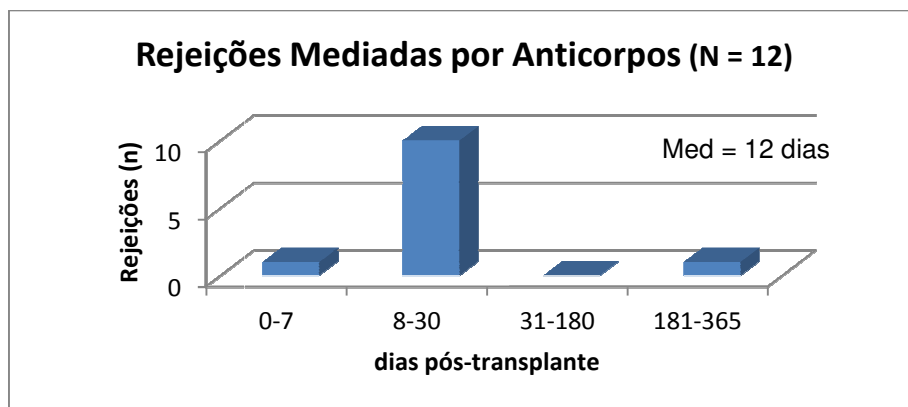


Figura 17: Época do diagnóstico das rejeições mediadas por anticorpos

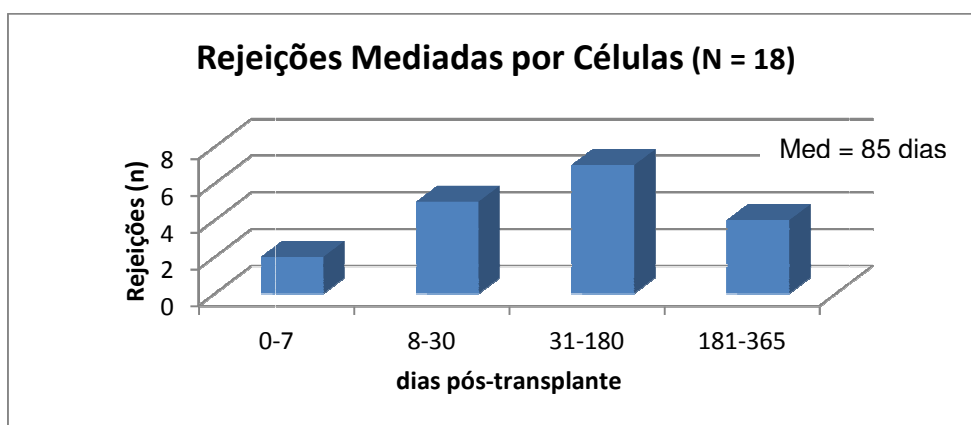


Figura 18: Época do diagnóstico das rejeições mediadas por células.

A incidência de rejeição aguda foi maior nos pacientes do Grupo C (36,4%) do que nos pacientes dos Grupos A e B (respectivamente 13,5% e 25,6%), $p < 0.001$. A taxa de rejeição aguda mediada por anticorpos foi maior no grupo C ($p < 0,0001$). Ser transplantado com presença de anticorpo doador específico representou maior risco para rejeição mediada por anticorpos (Tabela 7 e Figura 19).

Tabela 7 - Tipos e frequência de rejeições segundo os grupos do pré-transplante.

Pré-Transplante	Grupo A N(89)	Grupo B N(39)	Grupo C N(22)	p
Rejeição Aguda	12 (13,5%)	10 (25,6%)	8 (36,4%)	<0,001
-- Rej. Mediada por Ac.	0/12	4/10 (40%)	8/8 (100%)	<0,001
-- Rej. Mediada por Cél	12/12 (100%)	6/10 (60%)	0/8	< 0,001

Rej.: rejeição; Ac.: anticorpo; Cél.:células

Grupo A (n=89), PRA=0

Neste grupo, tivemos 12 episódios (13,5%) de rejeição aguda, todas mediadas por células. Uma dessas rejeições levou à perda do enxerto (1/12 = 8%).

Grupo B (n=39), PRA>0 sem ADE

Dez pacientes (25,6%) apresentaram episódios de rejeição aguda, sendo 4 (40%) mediadas por anticorpos e 6 (60%), mediadas por células. Houve uma perda do enxerto devido à rejeição mediada por anticorpos (1/10 = 10%).

Grupo C (n=22), PRA>0 com ADE

No período de estudo, 8 (36,4%) apresentaram episódios de rejeição aguda, todas mediadas por anticorpos. Devido à rejeição aguda, um paciente evoluiu com perda do enxerto e outro, durante o tratamento da rejeição com plasmaferese, cursou com sepsis e evoluiu para óbito (1 perda/8 = 12,5%, 1 óbito/8 = 12,5%).

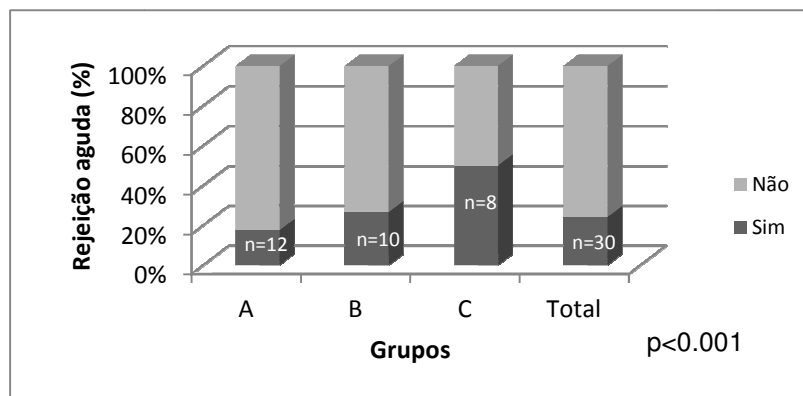


Figura 19: Incidência de rejeição aguda entre os grupos do pré-transplante.

No total, foram detectados anticorpos anti-HLA, específico e não específico, em 61 dos 150 pacientes (40,6%), com uma incidência de rejeição aguda mediada por anticorpos de 8% (12/150) que ocorreu mais frequentemente no grupo C, conforme ilustrado na Figura 20.

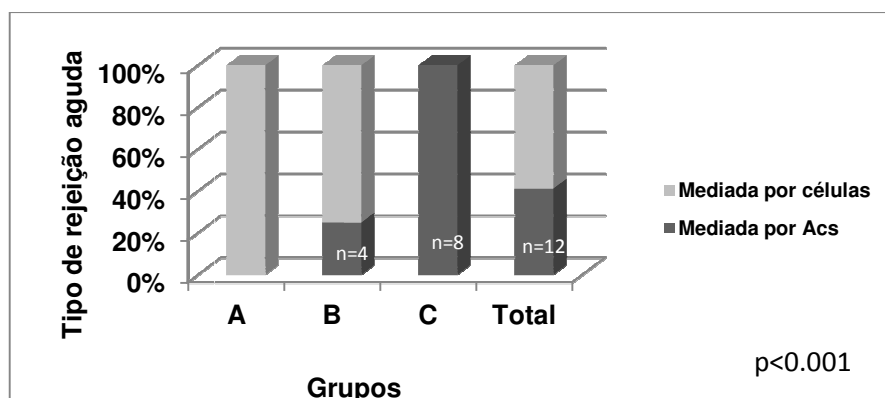


Figura 20: Tipos de rejeição aguda nos grupos do pré-transplante.

Na Figura 21 demonstramos a distribuição dos pacientes que apresentaram rejeição aguda, divididos pela presença ou não de ADE no momento do transplante. Observamos um maior percentual de rejeição aguda no grupo dos pacientes que apresentaram ADE quando comparados àqueles que não apresentaram, respectivamente, 36,6%; e 17,2%, $p=0,047$. A chance de rejeição aguda nesses pacientes que transplantaram com ADE foram 2,75 vezes maiores que daqueles que transplantaram sem ADE.

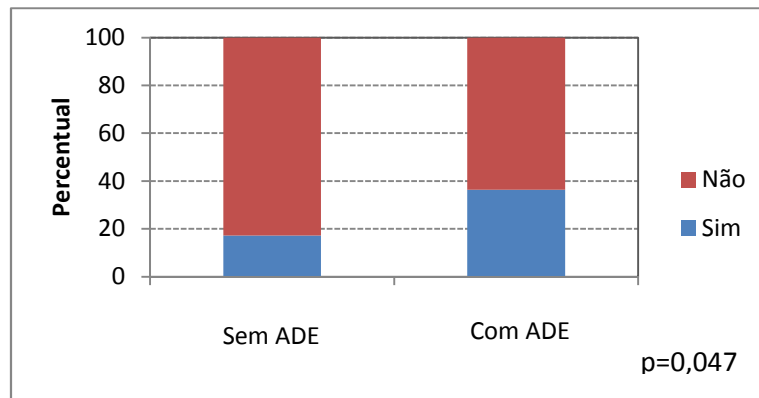


Figura 21: Pacientes que transplantaram com ADE e evoluíram com rejeição aguda.

Quando analisamos esses mesmos grupos de pacientes em relação à rejeição mediada por anticorpos, observamos que os pacientes que transplantaram com ADE tiveram uma maior taxa de RAMA comparados àqueles que não apresentavam ADE no momento do transplante, respectivamente, 36,4% e 3,1%, $p < 0,001$. O Odds Ratio para essa relação foi de 17,7, isto é, a chance de RAMA nos pacientes que transplantaram com ADE foram 17,7 vezes maiores que nos pacientes que transplantaram sem a presença de ADE. Conforme ilustra a Tabela 8 e a Figura 22.

Tabela 8 – Distribuição dos pacientes quanto a presença de ADE no momento do transplante e a evolução para RAMA.

	Rejeição Aguda Mediada por Anticorpos			
	Sim		Não	
	N	%	N	%
Sem ADE	4	3,1	124	96,9
Com ADE	8	36,4	14	63,6

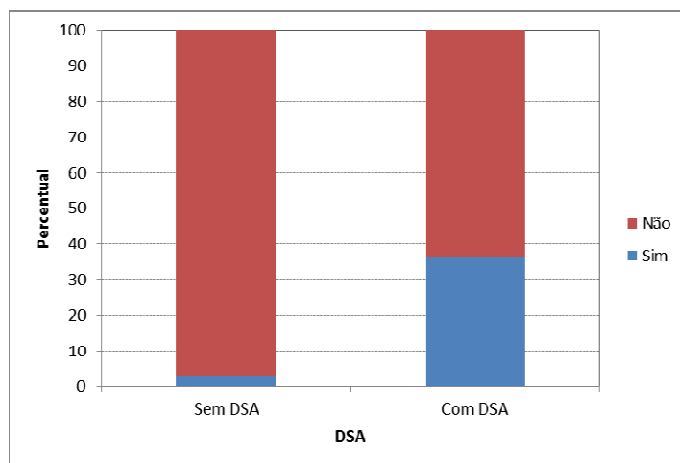


Figura 22: Pacientes que transplantaram com ADE e evoluíram com RAMA.

A seguir, o comportamento das rejeições agudas nos grupos realocados de acordo com a dinâmica dos anticorpos anti-HLA no pós-transplante renal, (Tabela 9).

Grupo IA (n=79): Apresentou 10 (12,6%) episódios de rejeição aguda, sendo todas (100%) mediadas por células.

Grupo IB1 (n=8): Houve 1 (12,5%) episódio de rejeição aguda, mediada por células.

Grupo IB2 (n=2): Um paciente (50%) evoluiu com rejeição aguda mediada por células.

Grupo IIA1 (n=36): Houve 5 (13,9%) episódios de rejeição aguda, todas (100%) mediadas por células.

Grupo IIA2 (n=6): Cinco (83,3%) pacientes evoluíram com rejeição aguda, 4 (80%) mediadas por anticorpos e uma (20%) mediada por células.

Grupo IIB1 (n=4): Não houve rejeição aguda.

Grupo IIB2 (n=8): Houve 2 (25%) episódios de rejeição aguda, mediadas por anticorpos (100%).

Grupo IIB3 (n=7): Seis (85,7%) pacientes evoluíram com rejeição aguda, todas (100%) mediadas por anticorpos.

Tabela 9 - Tipos e frequência de rejeições nos grupos segundo a cinética do pós-transplante.

Pós-TX	Grupo A1 N(79)	Grupo A2 N(8)	Grupo A3 N(2)	Grupo B1 N(34)	Grupo B2 N(5)	Grupo C1 N(6)	Grupo C2 N(9)	Grupo C3 N(7)	p
Rej. Aguda	10(12,6%)	1(12,5%)	1(50%)	5(14,7%)	5(100%)	0	2(22,2%)	6(85,7%)	>0.001
- Rej por Ac.	0	0	0	0	4/5	0	2/2	6/6	>0.001
-Rej por Cel	10/10	1/1	1/1	5/5	1/5	0	0	0	>0.001

Pós-TX: pós-transplante; Rej.: rejeição; Ac. Anticorpo; Cel: célula

A partir desses resultados identificamos dois grupos de transplantados que têm maior risco para rejeição aguda, especialmente para rejeição mediada por anticorpos. São eles:

1. Pacientes que são submetidos ao transplante com anticorpos anti-HLA doador específico e que elevam seus níveis entre o 4° e 7° dia pós transplante (grupo C3).
2. Transplantados com algum grau de sensibilização que desenvolvem anticorpos anti-HLA doador específico *de novo* de forma precoce (grupo B2).

4.7 Evolução clínica

4.7.1 Tratamento e reversibilidade das rejeições agudas:

As rejeições agudas mediadas por células foram tratadas com três pulsos de 500mg de Metilprednisolona e apenas uma dessas rejeições foi tratada com Timoglobulina numa dose total de 6,5 mg/Kg. Um paciente evoluiu com perda do enxerto decorrente de rejeição aguda mediada por células fato atribuído à má adesão aos imunossupressores. Obtivemos uma taxa de reversibilidade e não perda do enxerto, de 94,5%.

Entre os pacientes com rejeição aguda mediada por anticorpos, os esquemas terapêuticos variaram, conforme demonstrado na Tabela 10. Os tratamentos usados foram Timoglobulina dose total de 6,5 mg/Kg, Rituximab 375 mg/m², Imunoglobulina Humana 2g/Kg e 12 sessões de plasmáferese para cada paciente. O paciente 2 não foi tratado para rejeição mediada por anticorpos devido ao evoluído grau de

cronicidade encontrado na biópsia no momento do diagnóstico da disfunção. O paciente 4 foi a óbito em decorrência de sepsis e os pacientes 6 e 10 perderam o enxerto devido a RAMA. Para as rejeições mediadas por anticorpos, a taxa de reversibilidade foi de 83%. Não encontramos diferença na taxa de reversibilidade das rejeições mediadas por anticorpos e mediadas por células (83% x 94,5, p=NS).

Tabela 10 - Tratamento e reversibilidade das rejeições agudas mediadas por anticorpos.

Paciente	Tratamento	PO da rejeição (dias)	Creatinina (pré-rejeição)	Rel. Prot/creat. 6m. (mg/g creat.)	Rel. Prot/creat. 1 y. (mg/g creat.)	Creatinina 6m. (mg/dL)	Creatinina 1 y. (mg/dL)	TFG 6m. ml/min	TFG 1 y. ml/min
1	PF ; Rituximab	8	1,33	0,08	0,16	1,12	1,74	55	33
2	Metilprednisolona	235	2,37	2,77	2,96	2,01	2,13	22	27
3	PF ; Rituximab ; IVlg	15	6,22	0,42	0,1	1,24	1,28	49	47
4	PF ; Rituximab	8	9,14	xx	xx	xx	xx	xx	xx
5	PF ; Rituximab ; IVlg	11	6,17	0,05	0,06	1,77	1,44	34	43
6	PF ; Rituximab	13	7,41	xx	xx	xx	xx	xx	xx
7	PF ; Rituximab	15	9,6	0,22	0,37	1,36	1,27	41	42
8	PF ; IVlg	11	9,55	2,29	3,18	1,45	1,17	40	48
9	PF ; Rituximab	10	5,96	0,15	0,11	1,74	1,93	32	30
10	PF ; IVlg	15	6,62	xx	xx	xx	xx	xx	xx
11	PF ; Rituximab	15	2,74	0,31	0,25	1,09	1,11	56	55
12	PF ; Rituximab	7	2,93	0	0,1	1,07	1,24	57	48

ATG: timoglobulina; PF: plasmaferese; IVlg: imunoglobulina polivalente humana; TFG: taxa filtração glomerular; Rel. Prot/Creat: relação da proteinúria/creatininúria em amostra única.

Para facilitar a compreensão, mostramos na Figura 23, a evolução de cada paciente com RAMA. Separamos em roxo, os pacientes que desenvolveram ADE *de novo*, em verde os que mantiveram os níveis de MFI, e em vermelho aqueles que aumentaram seus níveis de MFI durante o estudo. As setas marcam o momento do diagnóstico de cada RAMA.

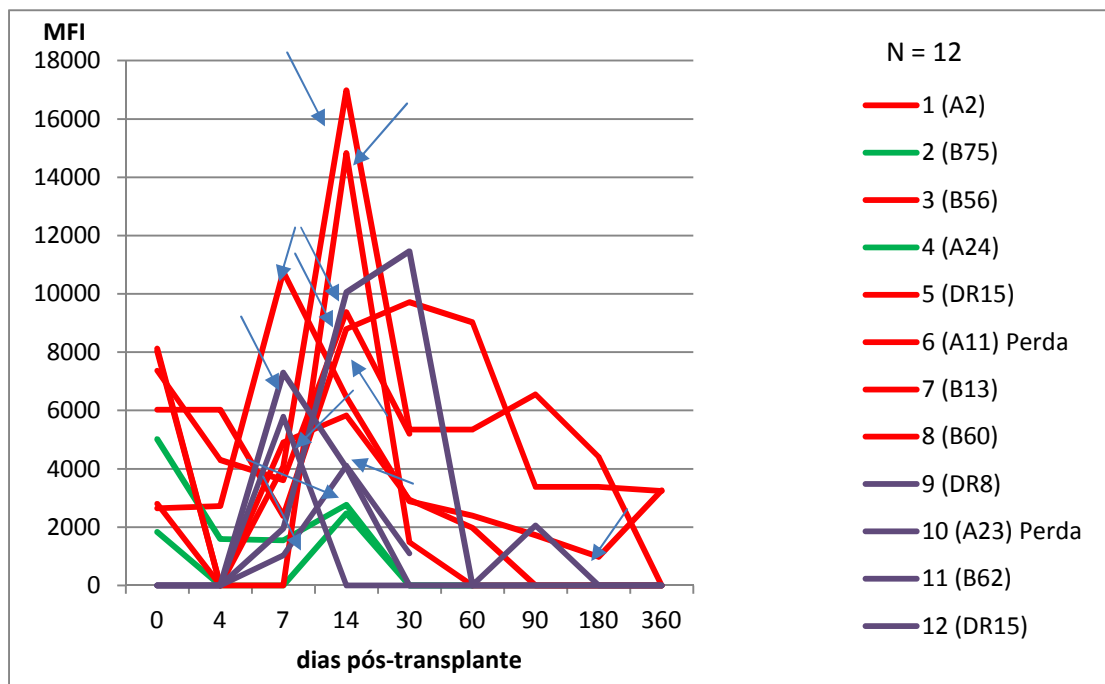


Figura 23: Cinética dos ADE nas rejeições mediadas por anticorpos antes e no momento da rejeição.

Utilizamos a microscopia óptica e os resultados da pesquisa de C4d para relacionar a gravidade da rejeição com a eventual perda do enxerto. Assim, analisamos as perdas ocorridas nos pacientes com RAMA, ilustrado na Tabela 11. Como tivemos apenas 12 amostras, não houve força estatística para enxergar essa diferença significativa. Definimos as lesões histológicas de RAMA pelos critérios de Banff 2009 (14). RAMA tipo 1 foi definida como injúria morfológica aguda no tecido renal com presença de necrose tubular e sinais mínimos de inflamação. RAMA tipo 2 foi definida como presença de injúria morfológica aguda traduzida em capilarite e/ou glomerulite e/ou trombose.

Tabela 11 - Distribuição dos pacientes quanto à perda pela gravidade histológica.

Histologia	Perda			
	Não		Sim	
	N	%	N	%
RAMA tipo 1	4	80	1	20
RAMA tipo 2	6	85,7	1	14,3
Total Geral	10	83,3	2	16,7

4.7.2 Função renal:

4.7.2.1 Relação urinária Proteína/Creatinina:

A Tabela 12 mostra as média e desvios padrão da relação urinária proteína/creatinina nos pacientes aos 6 e 12 meses pós transplante. Podemos observar uma grande variabilidade aos 6 meses e valores mais baixos nos transplantados com doador vivo. Porém, não existe diferença significativa nem entre os grupos nem entre os tipos de doadores aos 6 e 12 meses.

Tabela 12 – Medidas da relação urinária proteína/creatinina:

Momento	Grupo	Tipo Doador	Média	Desvio Padrão
6 Meses	A - PRA=0	Falecido	0,234	0,26
		Vivo	0,229	0,539
	B - PRA>0 sem ADE	Falecido	0,216	0,211
		Vivo	0,154	0,18
	C - PRA>0 com ADE	Falecido	0,557	1,082
		Vivo	0,126	0,077
1 Ano	A - PRA=0	Falecido	0,34	0,571
		Vivo	0,169	0,186
	B - PRA>0 sem ADE	Falecido	0,216	0,209
		Vivo	0,171	0,155
	C - PRA>0 com ADE	Falecido	0,565	1,116
		Vivo	0,131	0,1

4.7.2.2 Creatinina Sérica:

Na Tabela 13 e na Figura 24, temos as médias e os desvios padrão das creatininas séricas dos pacientes. Observamos uma grande variabilidade entre os pacientes e que doadores vivos tendem a apresentar valores médios menores.

Na Tabela 14, temos os níveis descritivos para as comparações e podemos observar que não existe diferença significativa entre as médias dos grupos A, B e C. Encontramos, contudo, diferença significativa entre os tipos de doadores em cada momento.

Tabela 13 – Medidas das creatininas séricas:

Momento	Grupo	Tipo Doador	Média	Desvio Padrão
6 Meses	A - PRA=0	Falecido	1,833	0,66
		Vivo	1,433	0,887
	B - PRA>0 sem ADE	Falecido	1,53	0,607
		Vivo	1,317	0,348
	C - PRA>0 com ADE	Falecido	1,396	0,343
		Vivo	1,17	0,287
1 Ano	A - PRA=0	Falecido	1,787	0,784
		Vivo	1,371	0,736
	B - PRA>0 sem ADE	Falecido	1,652	0,953
		Vivo	1,302	0,508
	C - PRA>0 com ADE	Falecido	1,299	0,327
		Vivo	1,319	0,368

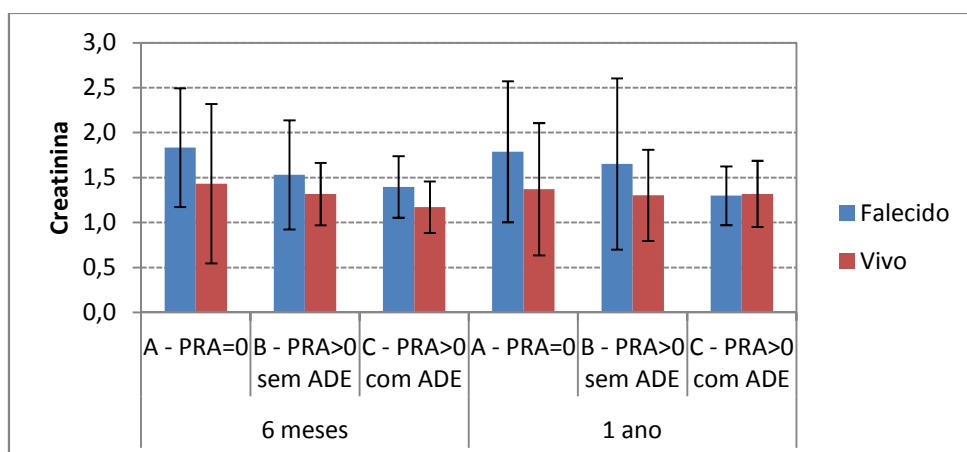


Figura 24: Médias com desvio padrão da creatinina sérica.

Tabela 14 – Níveis descritivos para o teste de Kruskal-Wallis – creatinina sérica:

Momento	Grupo	Doador
6 meses	0,0864	0,0001
1 Ano	0,1677	0,0042

4.7.2.3 Função Renal em MDRD:

A Tabela 15 e a Figura 25 mostram as médias e os desvios padrão da função renal dos pacientes transplantados. Observamos uma grande variabilidade entre os pacientes e que os doadores vivos tendem a apresentar valores médios maiores. Não encontramos interação significativa entre grupo e doador, a diferença entre as médias no tipo de doador também se mantém para os três grupos. Na Tabela 16, temos os níveis descritivos para as comparações e podemos observar que não há diferença significativa entre as médias dos grupos, porém temos diferença significativa entre os tipos de doadores em cada momento.

Tabela 15 – Medidas para a função do enxerto pela fórmula MDRD:

Momento	Grupo	Tipo Doador	Média	Desvio Padrão
6 Meses	A - PRA=0	Falecido	45,8	16,6
		Vivo	60,3	18
	B - PRA>0 sem ADE	Falecido	48,4	18,1
		Vivo	58,2	15,2
	C - PRA>0 com ADE	Falecido	49,1	15,9
		Vivo	62,3	17,4
1 Ano	A - PRA=0	Falecido	49,5	18,6
		Vivo	61,1	17,2
	B - PRA>0 sem ADE	Falecido	49,3	22,7
		Vivo	62,7	20,6
	C - PRA>0 com ADE	Falecido	52,1	13,8
		Vivo	55,7	20,8

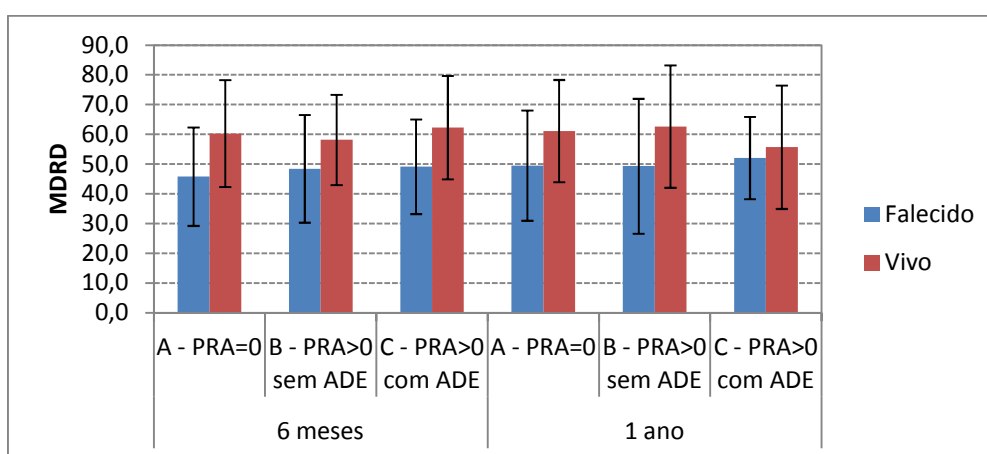


Figura 25 – Médias com desvio padrão da função renal pela fórmula MDRD.

Tabela 16 – Níveis descritivos para o teste de Kruskal-Wallis – MDRD:

Momento	Grupo	Doador
6 meses	0,8547	<0,0001
1 Ano	0,9303	0,0012

Após avaliarmos a cinética dos anticorpos desses pacientes, observamos que quando os separamos pela presença ou não de anticorpos e/ou anticorpos doadores específicos, não encontramos diferenças estatísticas para a função renal. Porém, quando os separamos pelo tipo de doador, identificamos diferenças estatísticas tanto para a creatinina quanto para a função renal calculada pela fórmula MDRD, indicando que os pacientes que receberam rim de um doador vivo tem melhor função renal ao final de um ano.

Quando comparamos a creatinina, a função renal pela fórmula MDRD e a relação urinária proteína/creatinina dos pacientes que tiveram rejeição aguda mediada por anticorpos (N = 12) com aqueles que não tiveram a rejeição aguda mediada por anticorpos (N = 137), detectamos que os paciente que não tiveram RAMA ao final de um ano, tiveram melhor função renal pela fórmula MDRD, não havendo diferença estatística significativa na creatinina e na relação urinária proteína/creatinina como ilustra a Tabela 17:

Tabela 17 - Função renal entre os pacientes com e sem RAMA:

	Momento	RAMA	Média	Desvio Padrão	p
Rel. Prot/creat.	1 Ano	Não	0,24	0,392	NS
		Sim	0,81	1,286	
Creatinina	1 Ano	Não	1,573	0,79	NS
		Sim	1,479	0,366	
MDRD	1 Ano	Não	54,28	19,71	0,0245
		Sim	41,93	9,41	

4.7.3 Sobrevida do enxerto:

Com os tempos de rejeição e perda de enxerto, analisamos as curvas de sobrevivência nos diferentes grupos e tipos de doadores (DV e DF).

4.7.3.1 Rejeição Aguda:

A Figura 26 mostra as curvas de sobrevivência no grupos A, B e C em relação à presença de rejeição aguda de acordo com o tipo de doador. Notamos diferença entre as curvas, destacando maior sobrevida com doadores vivos (log-rank 0,0041).

Quando comparamos os três grupos, não sensibilizados, sensibilizados sem ADE e sensibilizados com ADE no pré-transplante, encontramos que receptores não sensibilizados que receberam rim de doadores falecidos tiveram menos rejeição aguda que os receptores sensibilizados dos doadores falecidos (log-rank 0,0086), ilustrado na Figura 26 com linhas sólidas. Não encontramos diferença estatística para rejeição aguda quando comparados os pacientes não sensibilizados contra os sensibilizados que receberam o rim de doadores vivos.

Quando comparados os grupos em relação ao tipo de doador, não encontramos diferença estatística para os três grupos (A, B e C), contudo quando comparado à média de todos doadores vivos (linhas tracejadas) versus média de todos doadores falecidos (linhas sólidas), encontramos diferença estatística (log-rank 0,0305). Isto é, os receptores de rim de doador falecido tiveram mais rejeição aguda do que aqueles que receberam rim de doador vivo.

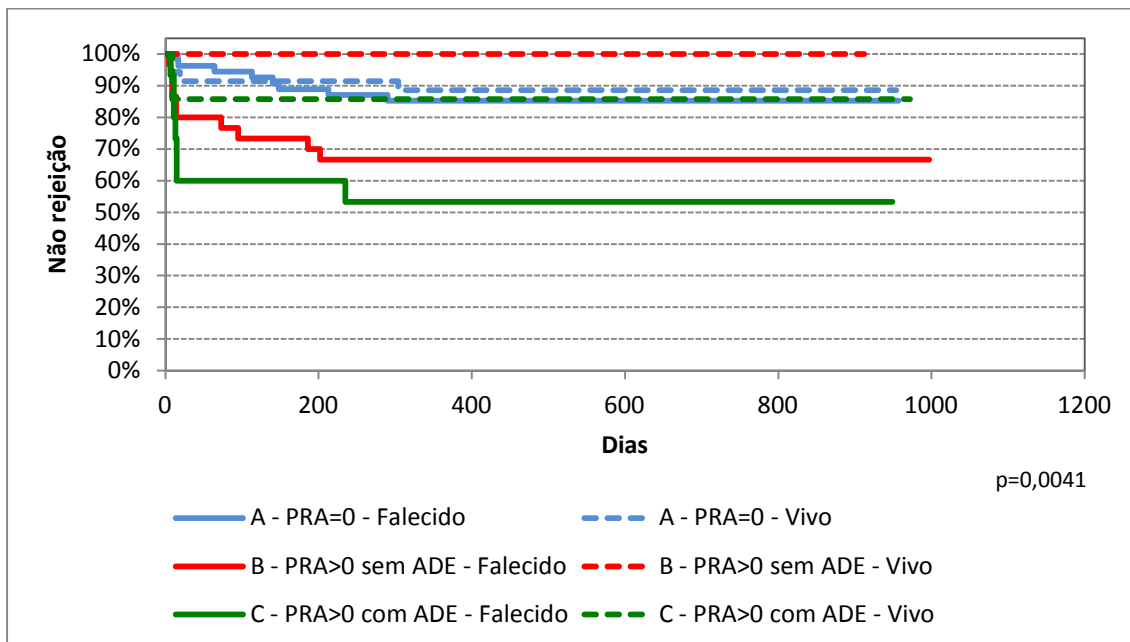


Figura 26: Análise de sobrevivência livre de rejeição aguda.

4.7.3.2 Rejeição Aguda Mediada por Anticorpos:

Na Figura 27, temos as curvas de sobrevivência para os três grupos pré-transplante de acordo com o tipo de doador, havendo diferença entre as curvas (log-rank <0,0001), com o grupo C apresentando pior resultado para doador falecido.

Comparando os três grupos (A, B e C), encontramos que receptores não sensibilizados que receberam rins de doadores falecidos tiveram menos rejeição aguda mediada por anticorpos que àqueles receptores sensibilizados que receberam o rim de doador falecido (log-rank <0,0001), ilustrado na Figura 27 com linhas sólidas. Também foi encontrada diferença estatística quando comparamos os grupos em relação aos doadores vivos, sendo que aqueles que transplantaram com ADE tiveram mais rejeição aguda mediada por anticorpos de que o grupo A e B, ilustrado com as três linhas tracejadas na Figura 27 (log-rank 0,0432).

Quando comparamos os doadores vivos versus doadores falecidos de seus respectivos grupos, não encontramos diferença estatística. Contudo, quando comparada a média de todos doadores vivos (linhas tracejadas) versus média de todos doadores falecidos (linhas sólidas), observamos uma tendência aos pacientes que receberam o rim de doadores falecidos terem mais RAMA do que os pacientes que receberam rim de doadores vivos (log-rank 0,053).

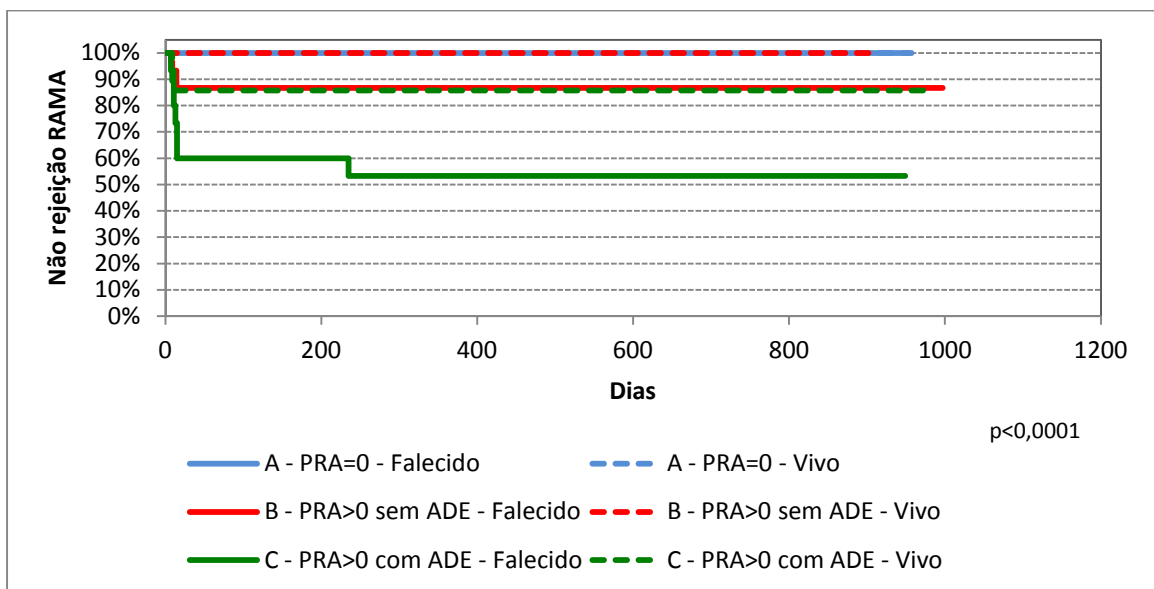


Figura 27: Análise de sobrevivência para a rejeição aguda mediada por anticorpos.

4.7.3.3 Perda de Enxerto:

Na Figura 28 temos as curvas de sobrevivência em relação à perda de enxerto para os três grupos do pré-transplante de acordo com o tipo de doador. Não houve diferença entre as seis curvas (log-rank 0,1796).

Quando comparamos os três grupos, encontramos diferença estatística apenas entre os doadores falecidos, receptores não sensibilizados que receberam rim de doadores falecidos tiveram menos perda de enxerto quando comparados com aqueles receptores sensibilizados (log-rank 0,0431). Ilustrado na Figura 28 com as linhas sólidas.

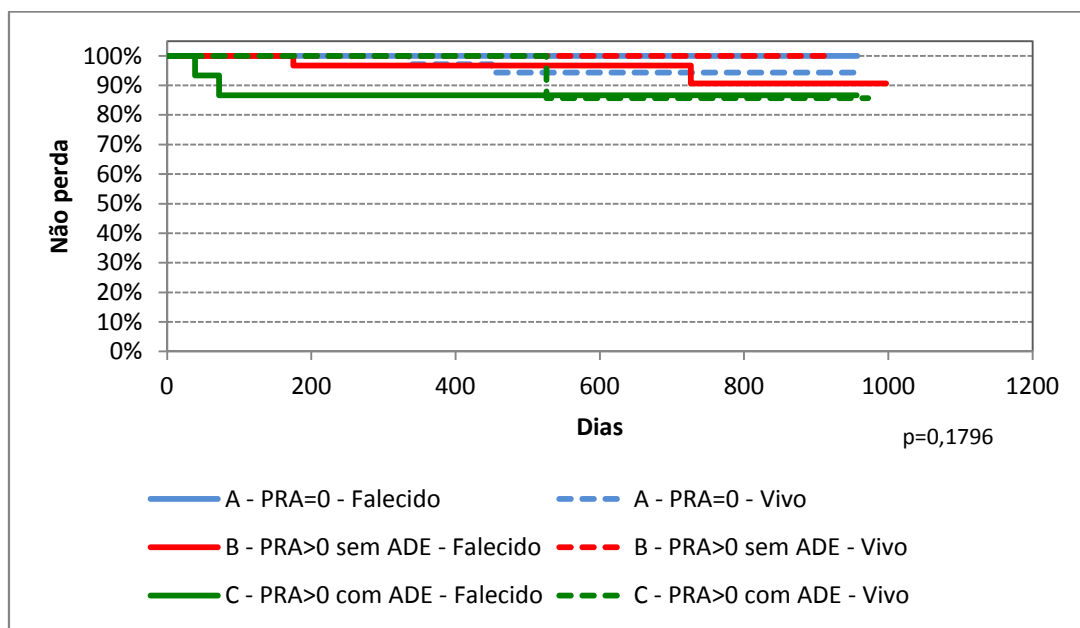


Figura 28: Análise de sobrevivência livre de perda do enxerto.

Na Tabela 18, analisamos as perdas de enxerto de acordo com a ausência de rejeição, presença de rejeição aguda mediada por anticorpos e celular. Obtivemos o nível descritivo de 0,004, pelo qual concluímos haver diferença significativa entre as perdas de enxerto nos três grupos.

O risco de perda do enxerto após RAMA versus RAMC foi de 3,4 vezes. Não foi possível calcular esse risco em relação aos pacientes sem rejeição, pois não houve perda nesse grupo.

Tabela 18 – Distribuição dos pacientes quanto à rejeição aguda:

Grupo (N=150)	Perda de enxerto			
	Sim (N=3)		Não (N=147)	
	N	%	N	%
RAMA (N=12)	2	16,7	10	83,3
RAMC (N=18)	1	5,6	17	94,4
Sem rejeição	0	0,0	120	100,0
Total Geral	3	2,0	147	98,0

No decorrer do estudo, três pacientes (2%) evoluíram com perda do enxerto, decorrentes de rejeição aguda; duas mediadas por anticorpos e uma mediada por células, em pacientes pertencentes aos grupos B, C e A respectivamente.

A sobrevida global do enxerto, censurada para óbito, foi de 98% e a sobrevida global do enxerto, não censurada para óbito, foi de 97% em 12 meses.

4.8 Monitorização dos anticorpos anti-HLA

Conhecendo a cinética pós-transplante dos anticorpos anti-HLA nos diferentes grupos do pré-transplante, podemos desenvolver estratégias para sua monitorização. A literatura não tem um consenso sobre quando e como monitorizar os pacientes transplantados de rim.

4.8.1 Monitorização dos anticorpos anti-HLA em pacientes não sensibilizados.

Apenas 2 de 89 (2,2%) dos pacientes não sensibilizados desenvolveram anticorpos anti-HLA doador específico *de novo* ao longo do 1º ano, e esse fato não se associou à rejeição clínica. De modo geral não houve benefício clínico monitorar de forma frequente esse grupo (Figura 29).

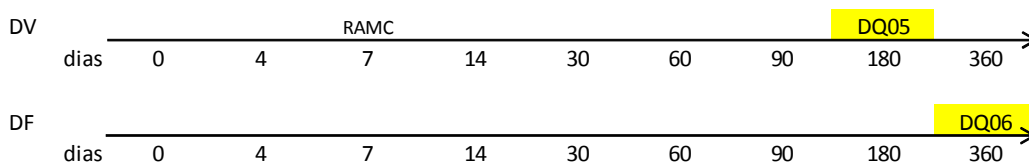


Figura 29: Aparecimento dos anticorpos anti-HLA doador específico *de novo* em pacientes não sensibilizados.

4.8.2 Monitorização dos anticorpos anti-HLA em pacientes sensibilizados

Trinta e nove pacientes foram transplantados com anticorpos anti-HLA não doador específicos, e destes, cinco (12,8%) desenvolveram anticorpos anti-HLA doador específicos *de novo*, apresentando alta taxa de rejeição mediada por anticorpos ($4/5 = 80\%$). A monitorização intensa e prospectiva durante o primeiro mês, a cada 2 ou 3 meses até o sexto mês. A cada seis meses, mostrou-se relevante (Figura 30).

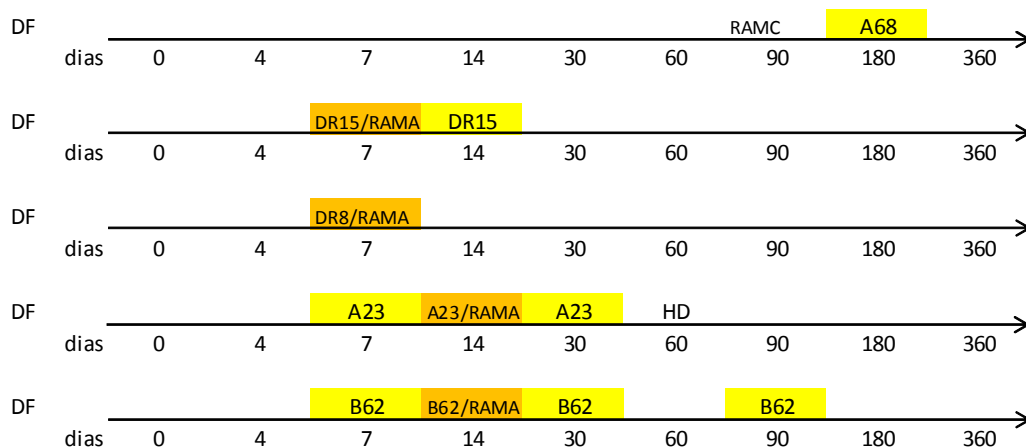


Figura 30: Aparecimento dos anticorpos anti-HLA doador específico *de novo* em pacientes sensibilizados sem ADE no pré-transplante.

Vinte e dois pacientes foram transplantados com anticorpos anti-HLA doador específicos. Destes seis vinte e sete por cento (27%) diminuíram os títulos de MFI-ADE, nove (41%) mantiveram os títulos de MFI-ADE e sete (32%) aumentaram os níveis de MFI-ADE. Este último grupo apresentou 85% (6/7 pacientes) de rejeição aguda mediada por anticorpos, como mostra Figura 31.

DV	DQ6	DQ6	DQ6	DQ6	DQ6	DQ6	DQ6	DQ6	DQ6	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DV	DR17	DR17	DR17	DR17	DR17	0	0	0	0	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DF	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DF	B13	B13	B13	B13	B13	B13	B13	B13	B13	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DV	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DV	A2	0	A2	A2	A2	A2	0	0	0	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DF	DQ4	DQ4	DQ4	DQ4	DQ4	DQ4	DQ4	DQ4	DQ4	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DV	A29	A29	A29	A29	A29	A29	A29	A29	A29	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DF	DR4	0	0	-	DR4	DR4	DR4	DR4	DR4	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DF	B75	0	0	B75	0	0	0	RAMA	0	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DF	A2	A2	A2	A2	A2	A2	A2	A2	A2	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DV	B48	B48	B48	B48	B48	B48	B48	B48	B48	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DF	A33	A33	A33	A33	A33	A33	A33	A33	A33	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DF	A24	A24	A24/RAMA	A24	0	óbito	-	-	-	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DF	B44	B44	B44	B44	B44	B44	B44	B44	B44	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DV	A2	A2	A2/RAMA	A2	A2	A2	A2	A2	A2	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DF	DQ8	DQ8	DQ8	DQ8	DQ8	DQ8	DQ8	DQ8	DQ8	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DF	B56	B56	B56	B56/RAMA	B56	B56	B56	B56	B56	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DF	DR15	0	DR15	DR15/RAMA	DR15	DR15	0	0	0	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DF	A11	A11	A11	A11/RAMA	A11	HD	-	-	-	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DF	B13	0	0	B13/RAMA	B13	0	0	0	0	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	
DF	B60	0	B60	B60/RAMA	B60	B60	B60	B60	0	→
	0	4	7	14	30	60	90	180	360	

Figura 31: Cinética dos ADE dominantes de todos os pacientes transplantados com anticorpos doador específicos.

Concluimos que a mesma estratégia de monitorização deveria ser usada para os pacientes que transplantaram com anticorpo anti-HLA doador específico, uma vez que os níveis de MFI podem se reduzir, se manter ou aumentar ao longo do pós-transplante com alto impacto nas rejeições agudas, especialmente nas mediadas por anticorpos.

5. RESUMO DOS ACHADOS:

- A maior parte dos pacientes submetidos à transplante renal não apresentaram anticorpos anti-HLA no pré transplante e não desenvolveram anticorpos anti-HLA após a cirurgia ao longo do primeiro ano de transplante e tiveram boa evolução.
- Poucos pacientes sensibilizados sem anticorpos doador específico no pré-transplante desenvolvem anticorpos doador específico precocemente após a cirurgia e esses apresentam rejeição aguda mediada por anticorpos.
- Pacientes transplantados com a presença de anticorpos anti-HLA doador específico tiveram maior risco para desenvolver rejeição aguda mediada por anticorpos.
- Nos pacientes com anticorpos doador específico no pré-transplante, o nível da intensidade média de fluorescência desses anticorpos não conseguiu prever a ocorrência de rejeição aguda.
- Os níveis da intensidade média de fluorescência dos anticorpos doador específico podem se reduzir, se manter ou se elevar nas primeiras semanas pós-transplante.
- O aumento dos níveis da intensidade média de fluorescência dos anticorpos doador específico nas primeiras semanas pós-transplante se relacionou fortemente com o desenvolvimento de rejeição aguda mediada por anticorpos.
- Quanto maior a queda dos níveis da intensidade média de fluorescência dos anticorpos doador específico, menor foi a creatinina ao final do primeiro ano.

- Fatores de risco para aumento dos níveis da intensidade média de fluorescência dos anticorpos doador específico e, conseqüentemente, de rejeição aguda mediada por anticorpos foram: sexo feminino, gestação, transfusão, transplante prévio e uso de doadores falecidos.
- Ao final do primeiro ano de transplante, não houve impacto da situação imunológica pré ou pós-transplante na função renal e na proteinúria.
- A taxa de rejeição aguda no estudo foi de 20%, sendo que 40% foi mediada por anticorpos.
- As taxas de reversibilidade e perda por rejeição aguda mediada por células e rejeição aguda mediada por anticorpos foram semelhantes.
- As taxas de rejeição e perda de enxerto em doador vivo, não foram diferentes em sensibilizados e não sensibilizados, mas receptores de doador falecido tiveram mais rejeição aguda, mais rejeição mediada por anticorpos e mais perda de enxerto.

6. DISCUSSÃO:

Alguns estudos têm surgido na literatura com a tentativa de elucidar qual a melhor forma de monitorizar pacientes transplantados renais com o objetivo de antecipar o diagnóstico ou tentar prevenir rejeição mediada por anticorpos (68, 82, 85).

No presente estudo, realizando a monitorização prospectiva e seriada dos anticorpos anti-HLA no pós-transplante renal, classificamos os receptores no momento pré-transplante em 3 grupos de acordo com seu estado imunológico.

Observamos que cerca de 40% dos pacientes transplantados apresentavam algum tipo de anticorpos anti-HLA, sendo que 15% apresentavam anticorpos anti-HLA doador específico no momento do transplante. Essa incidência foi maior que a descrita em outros estudos (45, 47, 50). As explicações para essa variabilidade de percentuais incluem a sensibilidade da técnica utilizada e por esse serviço ser um centro de referência para pacientes sensibilizados.

A maior parte dos pacientes que não apresentaram anticorpos anti-HLA no pré-transplante, não desenvolveram anticorpos no pós-transplante e evoluíram sem rejeição, com boa função renal e uma taxa de sobrevida do enxerto de 98,8% no primeiro ano. Nesse grupo de não sensibilizados no pré-transplante, 13% apresentaram rejeição aguda, todas mediadas por células e somente uma perda de enxerto foi atribuída a rejeição. A ausência de anticorpos no pré e no pós transplante foi também um bom indicador para a sobrevida do enxerto em um estudo que avaliou 1329 pacientes no primeiro ano de transplante, sendo que a sobrevida de um ano do enxerto foi de 96% (45).

Entre os pacientes sensibilizados, aqueles que transplantaram com anticorpos anti-HLA doador específico foram os que apresentaram maior índice de rejeição aguda (36%), em sua totalidade mediadas por anticorpos, o que não foi diferente da prevalência encontrada por Lefaucheur et al (80). Em sua casuística, o principal fator para esse tipo de rejeição foi a presença de anticorpos anti-HLA doador específico com um risco relativo de nove. Em nosso estudo encontramos a presença de anticorpos anti-HLA doador específico no momento do transplante como o principal fator de risco para a rejeição mediada por anticorpos, com um risco 17 vezes maior.

Pacientes que cursaram com rejeição aguda mediada por anticorpos em nossa casuística ao final do primeiro ano de seguimento apresentaram pior função renal do

que aqueles que não cursaram com rejeição, entretanto a sobrevida do enxerto foi a mesma. Acreditamos que não encontramos diferença na sobrevida do enxerto pelo curto tempo de seguimento desse estudo. A presença de anticorpos doador específico no pré e no pós transplante renal foi um importante fator de risco para a menor sobrevida do enxerto em outros estudos (81, 83, 84).

Quando comparamos a intensidade de fluorescência dos anticorpos anti-HLA doador específico dos pacientes que rejeitaram versus os que não rejeitaram, não observamos diferença estatística e, portanto, o nível de intensidade dos anticorpos anti-HLA no pré transplante renal não foi preditor do episódio de rejeição. Assim o dogma da presença de anticorpo anti-HLA doador específico no pré-transplante ser uma contraindicação para o transplante não é válida, já que muitos não apresentaram rejeição. O anticorpo é um fator de risco e cabe a cada centro aceitar ou não esse risco de acordo com a possibilidade de transplantar com outros doadores (70, 71, 79).

Em relação à cinética desses anticorpos no pós-transplante renal, resultados encontrados nesse estudo mostram que existem diferentes comportamentos dos anticorpos anti-HLA doador específico, mantendo, diminuindo ou elevando seus níveis de intensidade. Nos pacientes que não rejeitaram, a variação ao longo das primeiras semanas foi pequena, com uma ligeira queda. Naqueles que rejeitaram, notamos uma queda acentuada no quarto dia pós-operatório seguido de uma elevação a partir do 7^a dia pós-transplante. Uma elevação média de 22% dos títulos do pré-transplante até o 7^a dia foi encontrada àqueles que apresentaram rejeição e um descenso médio de 28% ocorreu nos que não cursaram com rejeição.

Nossos dados mostram que quanto maior a queda dos títulos de ADE nos pacientes, menor será a creatinina ao final de um ano, corroborando dados encontrados por David-Neto et al (65). Os fatores de risco encontrados para o aumento dos títulos de ADE ao longo do transplante foram: ser mulher, ter tido gestação prévia, ter tido transfusão de sangue, receber o rim de doador falecido e ser retransplantado.

Dados desse estudo nos mostram que pacientes que receberam rim de doador falecido, independente do seu estado imunológico, ao final de um ano, cursaram com pior função renal e maior taxa de rejeição aguda do que receptores de doador vivo ratificando os registros nacionais e internacionais (1, 2).

Consenso internacional de monitoração de anticorpos sugere que pacientes não sensibilizados sejam monitorados pelo menos uma vez entre o terceiro e o décimo

segundo mês pós-transplante (82). Nossos resultados mostram que a monitorização dos anticorpos anti-HLA nesse perfil de pacientes não mostrou benefício. Apenas 2% dos não sensibilizados desenvolveram anticorpos anti-HLA doador específico *de novo* sem qualquer relação com desenvolvimento de rejeição. Nesse grupo, a pesquisa de anticorpos anti-HLA doador específico deve ocorrer em caso de disfunção do enxerto.

Nossos dados sobre a cinética dos anticorpos anti-HLA nos pacientes sensibilizados nos predispõe a sugerir a monitorização intensa no primeiro mês, quando existe a maior variabilidade desses anticorpos, sequenciado ao longo do primeiro ano. Vale ressaltar que a cinética desses anticorpos é dinâmica e pode oscilar em qualquer momento. Há também a possibilidade de desenvolver anticorpos anti-HLA doador específico *de novo* durante qualquer período do transplante, como demonstrou Heilman et al (85), que encontrou 9,4% de anticorpos anti-HLA doador específico *de novo* entre o segundo mês e o final do primeiro ano em seu estudo. Monitorar os pacientes sensibilizados de uma forma seriada é a recomendação da literatura (47-51, 68, 82) com as justificativas de que a pesquisa de anticorpos anti-HLA doador específico é um marcador precoce, não invasivo e que poderá ajudar no diagnóstico e na terapêutica da rejeição.

Conhecer a dinâmica dos anticorpos anti-HLA nos possibilita identificar aqueles pacientes com maior risco para rejeição e desenvolver estratégias para diminuir o impacto desses anticorpos sobre o rim transplantado.

Nosso estudo utilizou a deposição de C4d nas biópsias renais como critério para o diagnóstico de rejeição aguda mediada por anticorpos. No entanto a descrição e evolução de rejeição aguda mediada por anticorpos em pacientes sensibilizados mas com C4d negativo, abriu perspectivas para outras formas de avaliação histológica como, por exemplo, a pesquisa de genes expressos pela técnica de microarray.

Do mesmo modo, avanços na detecção de anticorpos anti-HLA doadores específicos relevantes para a evolução do transplante, através da marcação dos mesmos pelo C1q, podem representar nos próximos anos em avanço na nossa capacidade de melhor avaliar o risco desses transplantes. A técnica do C1q, realizada com o soro do receptor, foi desenvolvida para conseguir distinguir anticorpos anti-HLA fixadores de complemento daqueles que não fixam complemento, assim aumentando a sensibilidade do teste e podendo identificar pacientes sobre o risco de rejeição mediada por anticorpos que são C4d negativos (82, 84).

6. CONCLUSÕES:

- A monitorização prospectiva e seriada de anticorpos anti-HLA no pós-transplante renal, pode identificar aqueles com maior risco de rejeição aguda e rejeição mediada por anticorpos.
- Não encontramos evidências de benefício da monitorização rotineira de anticorpos anti-HLA em pacientes não sensibilizados.
- Pacientes sensibilizados se beneficiaram da monitorização para anticorpos anti-HLA de maneira intensa especialmente no primeiro mês, a cada dois ou três meses até o sexto mês e, a seguir, a cada seis meses.
- Não houve diferença na função renal nem na sobrevida do enxerto nos pacientes não sensibilizados comparados com os sensibilizados aos 6 e 12 meses de seguimento.
- Pacientes transplantados com a presença de anticorpos doador específico tiveram maior risco para desenvolver rejeição aguda mediada por anticorpos.
- Pacientes que cursaram com rejeição aguda mediada por anticorpos apresentaram pior função renal pela fórmula do MDRD ao final de 12 meses de seguimento.

7. REFERÊNCIAS:

1. Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Sobrevida atuarial dos enxertos renais, no período de 1998 a 2012. <http://www.saude.sp.gov.br/>
2. Scientific Registry of Transplant Recipients. The UNOS Renal Transplant Registry, no período de 2001 a 2012. <http://optn.transplant.hrsa.gov/>
3. Mauiyyedi S, Colvin RB. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002 Nov;11(6):609-18.
4. Rocha PN, Plumb TJ, Crowley SD, Coffman TM. Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunol Rev*. 2003 Dec;196:51-64.
5. Hernandez-Fuentes MP, Warrens AN, Lechler RI. Immunologic monitoring. *Immunol Rev*. 2003 Dec;196:247-64.
6. Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med*. 1998 Jun;338(25):1813-21.
7. Sayegh MH, Watschinger B, Carpenter CB. Mechanisms of T cell recognition of alloantigen. The role of peptides. *Transplantation*. 1994 May;57(9):1295-302.
8. Afzali B, Lechler RI, Hernandez-Fuentes MP. Alloreognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens*. 2007 Jun;69(6):545-56.
9. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986 Apr;136(7):2348-57.
10. Colvin RB, Cohen AH, Saiontz C, Bonsib S, Buick M, Burke B, et al. Evaluation of pathologic criteria for acute renal allograft rejection: reproducibility, sensitivity, and clinical correlation. *J Am Soc Nephrol*. 1997 Dec;8(12):1930-41.
11. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int*. 1999 Feb;55(2):713-23.
12. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant*. 2003 Jun;3(6):708-14.
13. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, et al. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant*. 2007 Mar;7(3):518-26.
14. Sis B, Mengel M, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, et al. Banff '09 Meeting Report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff Working Groups. *Am J Transplant*. 2010;10:464-471.

15. Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet*. 1966 Sep;2(7465):662-5
16. Lefaucheur C, Loupy A, Vernery D, Duong-Van-Huyen J, Suberbielle C, Anglicheau D et al. Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study. *Lancet*. 2013 Jan;381:313-9.
17. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*. 1969 Apr;280(14):735-9.
18. Amos DB, Bashir H, Boyle W, MacQueen M, Tiilikainen A. A simple micro cytotoxicity test. *Transplantation*. 1969 Mar;7(3):220-3.
19. Johnson AH, Rossen RD, Butler WT. Detection of alloantibodies using a sensitive antiglobulin microcytotoxicity test: identification of low levels of pre-formed antibodies in accelerated allograft rejection. *Tissue Antigens*. 1972;2(3):215-26.
20. Zachary AA, Klingman L, Thorne N, Smerglia AR, Teresi GA. Variations of the lymphocytotoxicity test. An evaluation of sensitivity and specificity. *Transplantation*. 1995 Sep;60(5):498-503.
21. Bray RA. Flow cytometry crossmatching for solid organ transplantation. *Methods Cell Biol*. 1994;41:103-19.
22. Susskind B. Methods for histocompatibility testing in the early 21st century. *Curr Opin Organ Transpl*. 2007;12:393-401.
23. Gebel HM, Bray RA. Sensitization and sensitivity: defining the unsensitized patient. *Transplantation*. 2000 Apr;69(7):1370-4.
24. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. risk. *Am J Transplant*. 2003 Dec;3(12):1488-500.
25. Kao KJ, Scornik JC, Small SJ. Enzyme-linked immunoassay for anti-HLA antibodies--an alternative to panel studies by lymphocytotoxicity. *Transplantation*. 1993 Jan;55(1):192-6.
26. Gloor JM, Moore SB, Schneider BA, Degoey SR, Stegall MD. The effect of antithymocyte globulin on anti-human leukocyte antigen antibody detection assays. *Transplantation*. 2007 Jul;84(2):258-64.
27. Scornik JC, Salomon DR, Lim PB, Howard RJ, Pfaff WW. Posttransplant antidonor antibodies and graft rejection. Evaluation by two-color flow cytometry. *Transplantation*. 1989 Feb;47(2):287-90.
28. Sumitran-Karuppan S, Moller E. The use of magnetic beads coated with soluble HLA class I or class II proteins in antibody screening and for specificity determinations of donor-reactive antibodies. *Transplantation*. 1996 May;61(10):1539-45.
29. Scornik JC, Ireland JE, Howard RJ, Pfaff WW. Assessment of the risk for broad sensitization by blood transfusions. *Transplantation*. 1984 Mar;37(3):249-53.

30. Shenton BK. The detection and relevance of pretransplant antibodies. *Transpl Immunol.* 1994 Jun;2(2):135-7.
31. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant.* 2003 Jun;3(6):665-73.
32. Susal C, Opelz G. Kidney graft failure and presensitization against HLA class I and class II antigens. *Transplantation.* 2002 Apr;73(8):1269-73.
33. Castro MC, Araujo LM, Nahas WC, Arap S, David-Neto E, Ianhez LE. Induction versus noninduction therapy in kidney transplantation: considering different PRA levels and different induction therapies. *Transplant Proc.* 2004 May;36(4):874-6.
34. Glotz D, Antoine C, Julia P, Suberbielle-Boissel C, Boudjeltia S, Fraoui R, et al. Desensitization and subsequent kidney transplantation of patients using intravenous immunoglobulins (IVIg). *Am J Transplant.* 2002 Sep;2(8):758-60.
35. Castro MC, Araújo LM, Rodrigues H, Maciel R, Ronda C, Viggiani CS, et al. Renal transplantation using living donors with a positive crossmatch: can we predict efficacy of desensitization with IVIG by an "in vitro" test? *Transplantation* 2004;78(2):258.
36. Jordan SC, Pescovitz MD. Presensitization: the problem and its management. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006 May;1(3):421-32.
37. Halloran PF, Schlaut J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I response. II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I-like antibody. *Transplantation.* 1992 Mar;53(3):550-5.
38. Trpkov K, Campbell P, Pazderka F, Cockfield S, Solez K, Halloran PF. Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody, Analysis using the Banff grading schema. *Transplantation.* 1996 Jun;61(11):1586-92.
39. Castro MC, David DS, Saldanha LB, Sabbaga E, Arap S, Ianhez LE. Acute vascular rejection: a clinical and morphological study. *Transpl Int.* 1998;11 Suppl 1:S15-8.
40. Monteiro F, Buelow R, Mineiro C, Rodrigues H, Kalil J. Identification of patients at high risk of graft loss by pre- and posttransplant monitoring of anti-HLA class I IgG antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. *Transplantation.* 1997 Feb;63(4):542-6.
41. Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Johnson RW. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation.* 2003 Apr;75(7):1034-40.
42. Crespo M, Pascual M, Tolkoff-Rubin N, Mauiyyedi S, Collins AB, Fitzpatrick D, et al. Acute humoral rejection in renal allograft recipients: I. Incidence, serology and clinical characteristics. *Transplantation.* 2001 Mar;71(5):652-8.
43. Zhang Q, Liang LW, Gjertson DW, Lassman C, Wilkinson AH, Kendrick E, et al. Development of posttransplant antidonor HLA antibodies is associated with acute humoral rejection and early graft dysfunction. *Transplantation.* 2005 Mar;79(5):591-8.

44. Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI, Mizutani K, Moreau A, Meurette A, et al. Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Sep;16(9):2804-12.
45. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant*. 2004 Mar;4(3):438-43.
46. Pelletier RP, Hennessy PK, Adams PW, VanBuskirk AM, Ferguson RM, Orosz CG. Clinical significance of MHC-reactive alloantibodies that develop after kidney or kidney-pancreas transplantation. *Am J Transplant*. 2002 Feb;2(2):134-41.
47. Campos E, Tedesco-Silva H, Machado P, Franco M, Medina-Pestana J, Gerbase M. Post-transplant anti-HLA class II antibodies as risk factor for late kidney allograft failure. *Am J Transplant*. 2006 Oct;6(10):2316-20.
48. Piazza A, Poggi E, Borrelli L, Servetti S, Monaco PI, Buonomo O, et al. Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: posttransplant analysis using flow cytometric techniques. *Transplantation*. 2001 Apr;71(8):1106-12.
49. Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK, Lee PH, Hung CJ, Chen YL, et al. All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation*. 2002 Oct;74(8):1192-4.
50. McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation*. 2000 Feb;69(3):319-26.
51. Cardarelli F, Pascual M, Tolkoff-Rubin N, Delmonico FL, Wong W, Schoenfeld DA, et al. Prevalence and significance of anti-HLA and donor-specific antibodies long-term after renal transplantation. *Transpl Int*. 2005 May;18(5):532-40.
52. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmuller G, et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int*. 1993 Jun;43(6):1333-8.
53. Bohmig GA, Exner M, Habicht A, Schillinger M, Lang U, Kletzmayer J, et al. Capillary C4d deposition in kidney allografts: a specific marker of alloantibody-dependent graft injury. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Apr;13(4):1091-9.
54. Feucht HE. Complement C4d in graft capillaries -- the missing link in the recognition of humoral alloreactivity. *Am J Transplant*. 2003 Jun;3(6):646-52.
55. Lederer SR, Kluth-Pepper B, Schneeberger H, Albert E, Land W, Feucht HE. Impact of humoral alloreactivity early after transplantation on the long-term survival of renal allografts. *Kidney Int*. 2001 Jan;59(1):334-41.
56. Moll S, Pascual M. Humoral rejection of organ allografts. *Am J Transplant*. 2005 Nov;5(11):2611-8.
57. Sun Q, Liu Z, Yin G, Chen H, Chen J, Li L. Detectable circulating antiendothelial cell antibodies in renal allograft recipients with C4d-positive acute rejection: a report of three cases. *Transplantation*. 2005 Jun;79(12):1759-62.

58. Montgomery RA, Hardy MA, Jordan SC, Racusen LC, Ratner LE, Tyan DB, et al. Consensus opinion from the antibody working group on the diagnosis, reporting, and risk assessment for antibody-mediated rejection and desensitization protocols. *Transplantation*. 2004 Jul;78(2):181-5.
59. Haas M, Rahman MH, Racusen LC, Kraus ES, Bagnasco SM, Segev DL, et al. C4d and C3d staining in biopsies of ABO- and HLA-incompatible renal allografts: correlation with histologic findings. *Am J Transplant*. 2006;6(8):1829
60. Martin L, Guignier F, Bocrie O, D'Athis P, Rageot D, Rife G, et al. Detection of anti-HLA antibodies with flow cytometry in needle core biopsies of renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation*. 2005;79(10):1459-61.
61. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc. Nephrol*. 2007;18(4):1046-56.
62. Sumitran-Holgersson S, Holgersson J. Clinical importance of non-HLA antibodies in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transpl*. 2006;(11):425-32.
63. Souza PS. Relevância da monitorização dos anticorpos anti-HLA após o transplante renal: estudo clínico e anatomopatológico: 2008. 99f. Tese (doutorado em Nefrologia) - Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo, São Paulo.
64. David-Neto E, David D, Agena F, Rodrigues H, Souza P, Castro MC, et al. C4d staining in post-perfusion renal biopsy is not useful for the early detection of antibody-mediated rejection when CDC crossmatching is negative. *Nephrol. Dial Transplant*. 2011;26:1388-1392.
65. David-Neto E, Souza P, Panajotopoulos N, Ventura C, Agena F, Lemos FC, et al. The impact of pre-transplant donor-specific antibodies on graft outcome in renal transplantation: a six-year follow-up study. *Clinics*. 2012;67(4): 355-361.
66. Everly MJ, Everly JJ, Arend LJ, Brailey P, Susskind B, Govil A, et al. Reducing de novo donor-specific antibody levels during acute rejection diminishes renal allograft loss. *Am J Transplant*. 2009;9:1063-1071.
67. Gill JS, Landsberg D, Johnston O, Shapiro RJ, Magil AB, Wu V, et al. Screening for de novo anti-human leukocyte antigen antibodies in nonsensitized kidney transplant recipients does not predict acute rejection. *Transplantation*. 2010 Jan;89(2):178-184.
68. Eng HS, Bennett G, Bardy P, Coghlan P, Russ GR, Coates PTH. Clinical significance of anti-HLA antibodies detected by Luminex: Enhancing the interpretation of CDC-BXM and important post-transplantation monitoring tools. *Human Immunol*. 2009;70:595-599.
69. Marrari M, Duquesnoy RJ. Detection of donor-specific HLA antibodies before and after removal of a rejected kidney transplant. *Transplant Immunol*. 2010;22:105-109.

70. Morris GP, Phelan DL, Jendrisak MD, Mohanakumar T. Virtual crossmatch by identification of donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies by solid-phase immunoassay: A 30-month analysis in living donor kidney transplantation. *Human Immunol.* 2010;71:268-273
71. Singh N, Djamali A, Lorentzen D, Pirsch J, Levenson G, Neidlinger N, et al. Pretransplant donor-specific antibodies detected by single-antigen bead flow cytometry are associated with inferior kidney transplant outcomes. *Transplantation.* 2010;90(10):1079-1084.
72. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am. J Transplant.* 2009;2312-2323
73. Haas M. C4d-negative antibody-mediated rejection in renal allografts: evidence for its existence and effect on graft survival. *Clin Nephrol.* 2011;75:271-278
74. Haas M. Pathology of C4d-negative antibody-mediated rejection in renal allografts. *Curr Opin Organ Transplant.* 2013 Jun;18(3):319-26.
75. Loupy A, Hill GS, Suberbielle C, Charron D, Anglicheau D, Zuber J, et al. Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA). *Am J Transplant.* 2011 Jan;11(1):56-65.
76. Cooper JE, Gralla J, Cagle LR, Goldberg R, Chan L, Wiseman AC. Inferior kidney allograft outcomes in patients with de novo donor-specific antibodies are due to acute rejection episodes. *Transplantation.* 2011 May;91:1103-9.
77. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Storsley LJ, Goldberg A, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant.* 2012 May;12(5):1157-67.
78. Everly MJ, Rebellato LM, Haizch CE, Ozama M, Parker K, Briley KP, et al. Incidence and impact of the novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. *Transplantation.* 2013 Feb;95(3):410-7.
79. Roelen D, Doxiadis I, Claas Frans. Detection and clinical relevance of donor specific HLA antibodies: a matter of debate. *Transplant Int.* 2012;25(6):604-10.
80. Lefaucheur C, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Nochy D, Andrade J, Antoine C, et al. Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2008 Feb;8(2):324-31.

81. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Aug;21(8):1398-406.
82. Tait BD, Süsal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FH, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation*. 2013 Jan 15;95(1):19-47.
83. Loupy A, Jordan SC. Transplantation: Donor-specific HLA antibodies and renal allograft failure. *Nat Rev Nephrol*. 2013 Mar;9(3):130-1.
84. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen JP, Mooney N, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med*. 2013 Sep 26;369(13):1215-26.
85. Tsapepas D, Vasilescu R, Tanriover B, Coppleson Y, Rekhtman Y, Hardy MA, et al. Preformed donor-specific antibodies and risk antibody-mediated rejection in repeat renal transplantation. *Transplantation*. 2014 Mar;97(6):642-7.
86. Heilman RL, Nijim A, Desmarteau YM, Khamash H, Pando MJ, Smith ML, et al. De novo donor-specific human leukocyte antigen antibodies early after kidney transplantation. *Transplantation*. 2014 May;29.

ANEXO I

Classificação de Banff 2009:

- Rejeição aguda/ativa mediada por anticorpos:

1. Evidência morfológica de lesão tecidual aguda, como:

Tipo 1 - Necrose tubular aguda; ou

Tipo 2 - Neutrófilos e/ou células mononucleares em capilares peritubulares e/ou glomérulos, e/ou trombose capilar; ou ainda,

Tipo 3 - Arterite intimal/necrose fibrinóide/ arterite intramural ou transmural

2. Evidência imunopatológica de ação de anticorpos, como:

- Deposição de C4d; e/ou,

- Deposição de imunoglobulinas nos capilares peritubulares (raro); ou ainda,

- Deposição de imunoglobulinas e complemento nas áreas de necrose arterial fibrinóide.

3. Evidência sorológica de anticorpos circulantes, como:

- Presença de anticorpos dirigidos contra antígenos HLA do doador; ou,

- Presença de anticorpos contra outros antígenos endoteliais do doador (anticorpos não-HLA).

Rejeição crônica/ativa mediada por anticorpos:

1. Evidência morfológica de lesão tecidual, como:

- Duplicação (“duplo contorno”) da membrana basal glomerular; e/ou,
- Multilaminação da membrana basal glomerular; e/ou,
- fibrose intersticial/atrofia tubular com ou sem perda de capilares peritubulares;
- fibrose intimal em artérias sem duplicação da camada elástica;

2. Evidência imunopatológica de ação de anticorpos, como:

- Deposição difusa de C4d em capilares peritubulares;

3. Evidência sorológica de anticorpos circulantes, como:

- Presença de anticorpos dirigidos contra antígenos HLA do doador.

O esquema atualmente proposto para rejeição crônica, preconiza a exclusão de doenças crônicas específicas, tais como: hipertensão, nefrotoxicidade por inibidor de calcineurina, obstrução crônica, infecções bacterianas e virais.