RAFAEL ANTONIO ARRUDA PÉCORA

**Associações dos anticorpos anti-HLA pré-formados e da
compatibilidade HLA à rejeição celular aguda precoce no
transplante hepático**

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

Programa de Ciências em
Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto
Carneiro D’Albuquerque

**São Paulo
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pécora, Rafael Antonio Arruda

Associações dos anticorpos anti-HLA pré-formados e da compatibilidade HLA
à rejeição celular aguda precoce no transplante hepático / Rafael Antonio Arruda
Pécora. -- São Paulo, 2016.

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque.

Descritores: 1.Transplante de fígado 2.Rejeição de enxerto 3.Antígenos HLA
4.Anticorpos 5.Histocompatibilidade

USP/FM/DBD-119/16

*À Fernanda, minha amada esposa, pelo amor, pelo carinho,
pelo companheirismo e pela amizade. Pelo incentivo à busca dos
meus sonhos, mesmo os considerados impossíveis.*

*Aos meus pais, Alberto e Lourdes, que tanto se esforçaram
para que eu tivesse a oportunidade de buscar o conhecimento.*

*Ao meu irmão Alexandre, pelos exemplos de dedicação aos
estudos e de senso crítico.*

*Aos amigos de sempre, que me ampararam nos momentos
difíceis, incentivaram nos momentos de batalha e celebraram nos
momentos de vitória.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque, exemplo de perseverança, por todas as oportunidades oferecidas, pela confiança depositada, pelo apoio e pela orientação nesse estudo;

Ao Dr. Nicolas Panajotopoulos, pelos ensinamentos, pela contribuição direta e inestimável nesse estudo, e sobretudo, pelo convívio agradável e amizade;

Ao Dr. Rodrigo Oliva Perez, exemplo de pesquisador, pelas diversas sugestões ao estudo e pela grande amizade de muitos anos;

Ao Prof. Jorge Kalil, que possibilitou a execução de todos os estudos imunológicos;

Ao Laboratório de Imunologia e Histocompatibilidade do INCOR-FMUSP, pela realização de todas as avaliações imunológicas, papel fundamental. Sem essa colaboração, este estudo não teria sido realizado;

Aos colegas do Laboratório de Imunologia e Histocompatibilidade do INCOR-FMUSP, Hécio Rodrigues e Fernanda Vilalva, pelo apoio e pela contribuição em diferentes etapas do estudo;

Ao Dr. Márcio Augusto Diniz, pela análise estatística e por todos os ensinamentos e pelas discussões;

Ao Dr. Ryan Tanigawa, pela contribuição na coleta das informações relativas às biópsias e pelas orientações conceituais;

Ao Sr. Marcos Retzer (*in memoriam*), pelas magníficas ilustrações, e sobretudo, pelo saudoso convívio;

Aos amigos e colegas da Divisão de Transplantes de Fígado e Órgãos do Aparelho Digestivo, pelo apoio durante a realização do estudo;

À equipe de enfermagem da Divisão de Transplantes de Fígado e Órgãos do Aparelho Digestivo, pela contribuição na logística de coleta dos materiais.

***"Se os fatos não se encaixam na teoria,
modifique os fatos".***

Albert Einstein

NORMALIZAÇÃO ADOPTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta 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, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Complexo principal de histocompatibilidade.....	3
1.2 Moléculas HLA nos transplantes de órgãos sólidos	4
1.3 Rejeição nos transplantes de órgãos sólidos	4
1.4 Rejeição no transplante hepático.....	5
1.5 Influência clínica do sistema HLA nos transplantes de órgãos sólidos	6
1.5.1 Pesquisa dos anticorpos anti-HLA	7
1.5.2 Influência dos anticorpos anti-HLA no transplante de fígado	10
1.5.3 Influência da compatibilidade HLA no transplante de fígado	16
2 OBJETIVOS	20
2.1 Principal.....	20
2.2 Secundário	20
3 MÉTODOS.....	22
3.1 Casuística	22
3.2 Critérios de inclusão e exclusão	22
3.3 Desenho do estudo.....	23
3.4 Procedimento cirúrgico.....	25
3.5 Imunossupressão	26
3.6 Estudo imunológico	27
3.6.1 Pesquisa de anticorpos anti-HLA pré-formados.....	27
3.6.2 Tipificação HLA dos receptores e doadores	28
3.6.3 Extração de DNA	29
3.6.4 Métodos de tipificação HLA	30

3.7 Diagnóstico de rejeição celular aguda.....	31
3.7.1 Biópsia hepática.....	31
3.7.2 Avaliação histológica	32
3.8 Variáveis estudadas	32
3.9 Análise estatística.....	33
3.10 Cálculo do tamanho da amostra.....	35
3.11 Aspectos éticos	35
4 RESULTADOS	37
4.1 Transplantes incluídos no estudo e sobrevida global da amostra.....	37
4.2 Dados demográficos e características clínicas dos transplantes incluídos no estudo.....	38
4.3 Caracterização imunológica dos transplantes.....	40
4.3.1 Anticorpos anti-HLA pré-formados.....	40
4.3.2 Compatibilidade HLA	44
4.4 Rejeição celular aguda	45
4.5 Estudo das associações dos anticorpos anti-HLA pré-formados e da compatibilidade HLA à rejeição celular aguda precoce	48
4.5.1 Análise univariável de fatores de risco para rejeição celular aguda	48
4.5.2 Análise multivariável de fatores de risco para rejeição celular aguda	50
4.5.3 Sobrevida livre de rejeição celular aguda em 90 dias.....	51
4.5.4 Intensidade dos episódios de rejeição celular aguda.....	58
5 DISCUSSÃO.....	68
6 CONCLUSÕES.....	86
7 REFERÊNCIAS	88
8 APÊNDICES	
8.1 APÊNDICE A - Dados Clínicos dos Transplantes	

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AC	Anticorpo
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i>
CDC	Citotoxicidade Dependente de Complemento
CREG	<i>Cross Reactive Group</i>
DSA	<i>Donor Specific Antibodies</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FCXM	<i>Flow Cytometry Crossmatch</i>
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
IgG	Imunoglobulina G
MELD	<i>Model for End-Stage Liver Disease</i>
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
OPTN	<i>Organ Procurement and Transplant Network</i>
PC	Prova Cruzada
PCR-SSO	<i>Polymerase Chain Reaction- Sequence Specific Oligonucleotide</i>
PCR-SSP	<i>Polymerase Chain Reaction- Sequence Specific Primer</i>
PE	Phicoeritrina
PRA	<i>Panel Reactive Antibody</i>
RCA	Rejeição Celular Aguda
RR	Razão de riscos
SAG	<i>Single Antigen</i>
SRTR	<i>Scientific Registry of Transplant Recipients</i>
TC	Tacrolimus
TCM	Tacrolimus e Micofenolato Sódico
VHC	Vírus da hepatite C

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Padrões das microesferas nos ensaios de fase sólida; A: múltiplos antígenos HLA; B: único antígeno HLA.	9
Figura 2	Fluxograma de coleta de material e triagem da presença de anticorpos anti-HLA; ACS: anticorpos.....	23
Figura 3	Fluxograma da determinação específica dos anticorpos anti-HLA; MFI (<i>Mean Fluorescence Intensity</i>); DSA (anticorpos específicos contra o doador).	24
Figura 4	Fluxograma da determinação da compatibilidade HLA.	25
Figura 5	Transplantes incluídos no estudo.	37
Figura 6	Curva de sobrevida global em 90 dias.....	38
Figura 7	Indicações de transplante hepático (%).....	40
Figura 8	Distribuição dos episódios de rejeição celular aguda conforme o dia pós-operatório.	46
Figura 9	Sobrevida livre de rejeição celular aguda por idade do receptor.....	51
Figura 10	Sobrevida livre de rejeição celular aguda de acordo com a presença de transplante prévio de órgão sólido.	52
Figura 11	Sobrevida livre de rejeição celular aguda por raça.	52
Figura 12	Sobrevida livre de rejeição celular aguda por sexo	53
Figura 13	Sobrevida livre de rejeição celular aguda conforme a presença de sensibilização para anticorpos anti-HLA	54
Figura 14	Sobrevida livre de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA classe I.....	54
Figura 15	Sobrevida livre de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA classe II.....	55
Figura 16	Sobrevida livre de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA classes I e II.....	55

Figura 17	Sobrevida livre de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador (DSA).....	56
Figura 18	Sobrevida livre de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador classe I (DSA classe I).....	57
Figura 19	Sobrevida livre de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador classe I e II (DSA classe I e II).....	57
Figura 20	Sobrevida livre de rejeição celular aguda conforme a compatibilidade HLA.	58
Figura 21	Distribuição dos episódios de rejeição celular aguda conforme a intensidade.....	59
Figura 22	Intensidade dos episódios de rejeição celular aguda conforme idade do doador.	61
Figura 23	Intensidade dos episódios de rejeição celular aguda conforme a sensibilização para anticorpos anti-HLA.	62
Figura 24	Intensidade dos episódios de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA classe I.....	62
Figura 25	Intensidade dos episódios de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA classe II.....	63
Figura 26	Intensidade dos episódios de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA classes I e II.....	63
Figura 27	Intensidade dos episódios de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador (DSA).....	64
Figura 28	Intensidade dos episódios de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador classe I (DSA).....	65
Figura 29	Intensidade dos episódios de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador classes I e II (DSA classes I e II).	65
Figura 30	Intensidade dos episódios de rejeição celular aguda conforme a compatibilidade HLA.	66

Figura 31	Biópsia hepática no 5º dia pós-operatório mostrando rejeição celular aguda.....	82
Figura 32	Biópsia hepática no 10º dia pós-operatório mostrando necrose hemorrágica em região centrolobular.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados demográficos e características clínicas dos transplantes incluídos no estudo.	39
Tabela 2	Dados demográficos e características clínicas dos grupos de transplantes sensibilizados e não sensibilizados.	41
Tabela 3	Prevalência das classes de anticorpos anti-HLA.	42
Tabela 4	Prevalência das classes exclusivas de anticorpos anti-HLA nos transplantes.	42
Tabela 5	Prevalência das classes de anticorpos específicos contra o doador (DSA).	42
Tabela 6	Prevalência das classes exclusivas de anticorpos específicos contra o doador (DSA).	43
Tabela 7	Perfis dos anticorpos anti-HLA dos receptores e tipificações HLA dos doadores nos transplantes com anticorpos específicos contra o doador (DSA).	43
Tabela 8	Prevalência do número de alelos HLA incompatíveis.	44
Tabela 9	Dados demográficos e características clínicas dos transplantes HLA compatíveis e incompatíveis.	45
Tabela 10	Dados demográficos e características clínicas dos transplantes com rejeição celular aguda.	46
Tabela 11	Perfil imunológico dos transplantes com rejeição celular aguda.	47
Tabela 12	Análise univariável dos fatores de risco para rejeição celular aguda.	49
Tabela 13	Análise multivariável de fatores de risco para rejeição celular aguda.	50
Tabela 14	Dados demográficos e características clínicas dos transplantes conforme a gravidade dos episódios de rejeição celular aguda.	59

RESUMO

Pécora RAA. *Associações dos anticorpos anti-HLA pré-formados e da compatibilidade HLA à rejeição celular aguda precoce no transplante hepático* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: As moléculas HLA são os principais alvos da rejeição nos transplantes de órgãos sólidos. A influência dos anticorpos anti-HLA pré-formados e da compatibilidade HLA no transplante de fígado ainda não está bem definida. A maioria dos transplantes é realizada sem a pesquisa de anticorpos anti-HLA pré-formados e sem pareamento HLA. **OBJETIVOS:** Avaliar as associações dos anticorpos anti-HLA pré-formados e da compatibilidade HLA à rejeição celular aguda (RCA) em até 90 dias após o transplante. **MÉTODOS:** Coorte prospectiva de transplantes de fígado ABO compatíveis/idênticos realizados entre janeiro de 2012 e dezembro de 2013. Enxertos que sobreviveram além de 4 dias foram incluídos. A pesquisa de anticorpos anti-HLA classes I e II foram realizadas por meio de ensaios de fase sólida (LABScreen® Mixed e LABScreen® Single Antigen). MFI (*Mean Fluorescence Intensity*) ≥ 1.000 foi considerado como positivo para anticorpos anti-HLA. Tipificação HLA-A, B e DR, de receptores e doadores foi feita por meio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Conforme o número de alelos HLA incompatíveis, os transplantes foram classificados em compatíveis (0-3 incompatibilidades) e incompatíveis (4-6 incompatibilidades). Apenas episódios de RCA comprovados por biópsia, associados a alterações das provas hepáticas, foram considerados. O critério Banff foi utilizado para diagnóstico e os episódios foram estratificados em leves, moderados e graves. Modelos de regressão de Cox foram realizados e as razões de risco (RR) associadas foram determinadas. Sobrevidas livres de RCA foram obtidas por meio do estimador de Kaplan Meier e comparadas entre os grupos pelo teste log-rank. **RESULTADOS:** Cento e vinte e nove transplantes foram analisados. Incidência global de RCA em 90 dias foi de 14,7%. A pesquisa de anticorpos anti-HLA pré-formados foi considerada positiva em 35,6% dos transplantes. Em relação à compatibilidade HLA, 91,5% dos transplantes foram classificados como incompatíveis. A sensibilização para anticorpos anti-HLA foi associada a um risco aumentado de RCA (RR=4,3; IC 95%=1,3 – 13,5; p=0,012). De acordo com a classe do anticorpo, observamos que a classe II foi associada a um risco aumentado de RCA (RR=56,4; IC 95%= 4,5 – 709,6; p=0,002). Para anticorpos classe I, foi observada associação marginalmente significativa (RR=2,77; IC 95%=0,8 – 8,8; p= 0,08). Uma melhor compatibilidade HLA não foi associada a um risco reduzido de RCA (RR= 0,9; IC 95%=0,2-4; p=0,89). **CONCLUSÕES:** O presente estudo mostrou que a sensibilização para anticorpos anti-HLA pré-formados com MFI ≥ 1.000 está associada a

um risco aumentado de rejeição celular aguda precoce no transplante de fígado. Anticorpos classe II foram também associados a um risco aumentado de RCA e anticorpos classe I foram tendência. A melhor compatibilidade HLA não foi associada a um risco reduzido de RCA neste estudo. A presença de sensibilização para anticorpos anti-HLA pré-formados poderia servir como marcador de imunorreatividade aumentada contra os enxertos. Isso permitiria ajustes individualizados de imunossupressão.

Descritores: Transplante de fígado; Rejeição de enxerto; Antígenos HLA; Anticorpos; Histocompatibilidade.

ABSTRACT

Pecora RAA. *Associations of preformed anti-HLA antibodies and HLA compatibility with early acute cellular rejection in liver transplantation* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo", 2016.

INTRODUCTION: Human leucocyte antigens (HLA) molecules are the main targets of rejection in solid organ transplantation. Significance of anti-HLA preformed antibodies and HLA compatibility remains unclear in liver transplantation. Majority of liver transplants are performed without assessment of preformed anti-HLA antibodies and HLA-matching. **OBJECTIVES:** Evaluate associations of preformed anti-HLA antibodies and HLA compatibility with acute cellular rejection (ACR) in the first 90 days after transplantation. **METHODS:** Prospective cohort of ABO-identical/compatible liver transplants between January 2012 and December 2013. Grafts that survived more than 4 days were included. Anti-HLA class I and II antibodies were determined by solid phase assays (LABScreen® Mixed and LABScreen® Single Antigen). A mean fluorescence intensity (MFI) ≥ 1.000 was considered as positive for anti-HLA antibodies. Recipients and donors HLA typing for HLA-A, B and DR were performed using polymerase chain reaction (PCR) assays. According to HLA mismatches (MM), transplants were divided in compatible (0-3 MM) and incompatible (4-6 MM). Only biopsy proven ACR episodes, associated with abnormal liver tests, were considered. Banff criteria was used for diagnosis of ACR and episodes were graded as mild, moderate and severe. Cox proportional hazards models were performed and associated hazard ratios (HR) were determined. Free ACR rates were estimated with Kaplan-Meier analysis and were compared between groups with the log-rank test. **RESULTS:** One hundred twenty nine transplants were analyzed. Overall incidence of ACR was 14.7% in 90 days. Assessment of anti-HLA pre-formed antibodies was considered positive in 35.6% of transplants. Regarding HLA compatibility, 91.5% were considered incompatible. Anti-HLA antibodies sensitization was associated with an increased risk of ACR (HR= 4.3; CI 95%=1,3 – 13,5; p=0.012). According to class of antibody, we could observe that class II was associated with an increased risk of ACR (HR=56.4; CI 95%= 4.5 – 709.6; p=0.002). Class I antibodies were considered tendency to increased risk of ACR (HR=2.7; CI 95%= 0.8 – 8.8; p=0,08). A better HLA compatibility was not associated with a lower risk of ACR (HR=0.9; CI 95%=0.2-3.8 p=0.89). **CONCLUSIONS:** The present study indicates that preformed anti-HLA antibodies with MFI ≥ 1.000 are associated with an increased risk of early ACR rejection in liver transplantation. Class II antibodies were also associated with an increased risk of ACR. Class I antibodies were considered tendency. HLA matching had no influence on early acute cellular rejection on this study. Anti-HLA

antibodies sensitization could serve as a marker of increased immunoreactivity to the graft. It would serve for tailored immunosuppression.

Descriptors: Liver transplantation; Graft rejection; HLA antigens; Antibodies; Histocompatibility.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O primeiro transplante de fígado com sobrevida prolongada foi realizado por Thomas Starzl em 1967¹. Nas últimas décadas, o transplante de fígado teve notáveis avanços, que o consagraram como opção terapêutica, muitas vezes, única, para várias doenças terminais do fígado, sejam elas agudas ou crônicas.

Dados da OPTN (do Inglês, *Organ Procurement and Transplant Network*), Estados Unidos da América, mostram, atualmente, sobrevidas de pacientes em torno de 85 e 71% em 1 e 5 anos, respectivamente, e de enxertos de 82, e 65% em 1 e 5 anos, respectivamente². Dados da Central de Transplantes da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo mostram sobrevidas aproximadas de 1 ano de 74% para pacientes e 70% para enxertos³.

Apesar dos avanços, o enxerto hepático ainda é acometido por problemas como rejeição^{4,5} e recorrência da doença de base, como a hepatite autoimune⁶, a cirrose biliar primária⁷, a colangite esclerosante primária⁸ e a hepatite C⁹.

Além disso, a imunossupressão necessária para manutenção dos enxertos é associada a diversos efeitos adversos, precoces e tardios, como infecções oportunistas, aparecimento de tumores, além de diabetes mellitus, hipertensão arterial, aterosclerose, distúrbios eletrolíticos, insuficiência renal e neurotoxicidade^{10,18}.

Em razão desses fatores, a sobrevida tardia de pacientes diminui de forma importante, atingindo 54% em 10 anos, conforme dados do SRTR (do Inglês, *Scientific Registry of Transplant Recipients*), Estados Unidos da América¹⁹.

Estudos têm sido dirigidos para a avaliação de parâmetros imunológicos que possam influenciar a interação imunológica do enxerto, diminuindo a necessidade de imunossupressão e seus efeitos colaterais, e a

recidiva de doenças, oferecendo, assim, estratégias que possam modificar o prognóstico.

Uma das linhas de pesquisa é a avaliação da influência das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade, MHC (do Inglês, *Major Histocompatibility Complex*), no transplante de fígado.

1.1 Complexo principal de histocompatibilidade

O MHC compreende um conjunto de genes que codificam proteínas expressas na superfície de todas as células, responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos T no contexto da imunidade normal. No ser humano, o complexo principal de histocompatibilidade é denominado HLA (do Inglês, *Human Leucocyte Antigen*). Os genes relacionados ao HLA localizam-se no braço curto do cromossomo 6, apresentando intenso polimorfismo, sendo expressos de forma codominante^{20,26}.

O *locus* do HLA compreende 6 genes principais que codificam moléculas proteicas homólogas, sendo classificadas em classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) e classe II (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP), em função de sua estrutura, distribuição tecidual e características na apresentação de antígenos aos linfócitos T. Naturalmente, todos os indivíduos apresentam 2 alelos para cada *locus* HLA^{20,22,26}.

As moléculas de classe I são expressas praticamente em todas as células nucleadas, enquanto as de classe II apenas nas células dendríticas, linfócitos B, macrófagos e alguns outros tipos celulares²⁶.

As células APC (do Inglês, *Antigen Presenting Cells*) são células que processam peptídeos antigênicos e expõem na superfície celular através das moléculas HLA. Os antígenos são apresentados aos linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos) no contexto de moléculas MHC classe I, e aos linfócitos T CD4⁺ (auxiliares) no contexto de moléculas MHC classe II, com desenvolvimento da resposta imunológica^{26,27}.

1.2 Moléculas HLA nos transplantes de órgãos sólidos

No contexto de transplantes de órgãos sólidos, as moléculas HLA do enxerto passam a atuar como aloantígenos, sendo os principais alvos da rejeição ao enxerto²⁸. As moléculas alogênicas do HLA do enxerto podem ser apresentadas por duas vias distintas, chamadas direta e indireta^{26,29}.

Na via direta, ocorre o reconhecimento de uma molécula HLA intacta, expressa na superfície das células APC do enxerto, por linfócitos T do receptor, sem a necessidade de células APC do receptor. Na via indireta, linfócitos T do receptor reconhecem antígenos do enxerto processados por células APC do receptor^{28,29}.

Com a ativação linfocitária, ocorre a produção de citocinas pelos linfócitos ativados, promovendo respostas efetoras por meio de células e de anticorpos (ACs). Dessa forma, os antígenos do sistema HLA são envolvidos no desenvolvimento das chamadas rejeição celular e mediada por anticorpos^{26,27}.

1.3 Rejeição nos transplantes de órgãos sólidos

Rejeição pode ser definida como reação imunológica à presença de tecido ou órgão transplantado, com potencial de disfunção e perda do enxerto³⁰. De maneira geral, a rejeição nos transplantes de órgãos sólidos pode ser classificada da seguinte forma: rejeição hiperaguda: lesão vascular grave do enxerto que se inicia em minutos ou horas após a revascularização do órgão, mediada por anticorpos pré-formados; rejeição aguda: lesão do parênquima do enxerto e dos vasos, mediada por linfócitos T alorreativos (rejeição celular aguda) e/ou mediada por anticorpos (rejeição aguda mediada por anticorpos); rejeição crônica: caracterizada por arteriopatia obliterativa e fibrose²⁶.

1.4 Rejeição no transplante hepático

Em linhas gerais, a rejeição ao enxerto no transplante de fígado pode ser classificada em aguda ou crônica, de acordo com as características histológicas, tipo do infiltrado inflamatório e reversibilidade. Ambos os tipos podem ocorrer em qualquer período pós-transplante e em combinação, de modo que os termos aguda e crônica não representam, necessariamente, relação temporal³¹.

A rejeição aguda apresentava incidência de 80% em 7 dias na era histórica que antecedeu o surgimento da ciclosporina³². Tem incidência atual que varia de 10 a 40% no primeiro mês após o transplante, com a maior incidência entre 7 a 10 dias^{33,34}.

A rejeição aguda é mais bem definida, do ponto de vista histológico, pela presença de infiltrado inflamatório misto no espaço porta, com predomínio de células mononucleares, com a presença de linfócitos ativados, neutrófilos e eosinófilos; inflamação e lesão de ductos biliares; inflamação subendotelial de veias portais e/ou vênulas hepáticas terminais. Na progressão do processo, hepatócitos podem demonstrar sinais de agressão imunológica direta ou indireta por meio da agressão vascular provocando isquemia^{31,40}.

Em razão desse tipo de apresentação histológica, a rejeição aguda no transplante de fígado, classicamente, tem sido denominada rejeição celular aguda (RCA)³¹. O linfócito é a célula predominante nesse tipo de rejeição, com populações de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺^{41,42}. Os outros tipos celulares têm sido considerados como parte de uma resposta inflamatória não específica.

Alguns fatores podem estar associados ao risco aumentado de RCA no transplante de fígado: receptores mais jovens, receptores em condição clínica melhor com creatinina sérica normal, pontuação menor de MELD (do Inglês, *Model for End-Stage Liver Disease*), além de pacientes com doenças de caráter autoimune (cirrose biliar primária, hepatite autoimune e colangite esclerosante primária), tempo de isquemia fria prolongado, doadores com maior idade, raça do receptor e transplantes com doadores vivos^{33,43-45}.

Rejeições agudas após o terceiro mês têm sido consideradas uma entidade à parte. São denominadas rejeições agudas tardias. Podem ser de tratamento mais difícil, com apresentação histológica menos característica, com risco aumentado de desaparecimento de canais biliares e perda do enxerto. São mais associadas à aderência inadequada ao tratamento do que à maior reatividade imunológica^{46,47}.

A rejeição crônica é manifestação mais grave, apresentando uma incidência menor, afetando 3% dos enxertos em 5 anos após o transplante⁴⁸. Habitualmente, é evolução da rejeição aguda grave ou persistente⁴⁹⁻⁵¹. Caracteriza-se pela destruição progressiva dos canais biliares levando à diminuição no número de ductos interlobulares e septais (ductopenia), com pequeno ou ausente infiltrado inflamatório no espaço portal. Além disso, ocorre inflamação progressiva intimal e subintimal de ramos secundários e terciários arteriais, resultando em endarterite obliterativa, provocando isquemia de hepatócitos e destruição de ductos biliares³¹.

A rejeição mediada por anticorpos no transplante de fígado ABO compatível/idêntico ainda é motivo de controvérsia, tanto no que se refere a diagnóstico e prognóstico. A apresentação com necrose hemorrágica difusa, semelhante ao transplante ABO incompatível, é evento bastante raro⁵²⁻⁵⁵. O impacto da presença de anticorpos anti-HLA nos resultados a curto e longo prazo não está claramente definido, de modo que, classicamente, o fígado têm sido considerado resistente à rejeição mediada por anticorpos^{19,56-58}.

1.5 Influência clínica do sistema HLA nos transplantes de órgãos sólidos

As moléculas HLA podem ter repercussões clínicas diferentes de acordo com o órgão transplantado. Dois fatores são reconhecidos como capazes de influenciar favoravelmente o êxito de alguns transplantes de órgãos sólidos: a ausência de anticorpos pré-formados contra antígenos HLA do doador e o grau de compatibilidade HLA.

O papel dos anticorpos anti-HLA está bem estabelecido para os transplantes renal⁵⁹⁻⁶¹ e cardíaco⁶². Existem evidências que também suportam importância nos transplantes de pâncreas⁶³ e de pulmões⁶⁴.

A sensibilização aos antígenos HLA pode ocorrer por meio de 3 vias principais: transfusão de hemoderivados, gravidez e transplantes. Dados do Reino Unido mostram que 23% dos pacientes em lista para transplante renal são sensibilizados, sendo uma proporção maior de mulheres e pacientes que aguardam retransplante⁶⁵. Reação cruzada com antígenos bacterianos e virais tem sido considerada menos importante para a sensibilização⁶⁶.

No que se refere à compatibilidade HLA, o benefício da maior compatibilidade está bem estabelecido para os transplantes de rim, coração e medula. Está associada ao aumento da sobrevida do enxerto e redução na incidência de rejeições aguda e crônica⁶⁷⁻⁷⁴. A prática clínica demonstrou que, de todos os *loci* classe I e II, a compatibilidade para os alelos de HLA-A, HLA-B e HLA-DR são as mais importantes para a sobrevida de aloenxertos renais⁷⁵. Como dois alelos são expressados de forma codominante, é possível haver entre 0 a 6 incompatibilidades entre receptor e doador.

No transplante de fígado, esses dois fatores imunológicos não são levados em consideração. Praticamente, a totalidade dos transplantes de fígado é realizada sem a pesquisa de anticorpos anti-HLA e sem a procura de uma melhor compatibilidade HLA.

1.5.1 Pesquisa dos anticorpos anti-HLA

Dois conceitos são importantes na avaliação de anticorpos anti-HLA em transplantes de órgãos sólidos: teste de reatividade contra painel (PRA, do Inglês, *Panel Reactive Antibody*) e prova cruzada (PC).

O PRA indica o grau de sensibilização HLA do receptor de órgãos em relação a possíveis doadores. Historicamente, essa pesquisa tem sido feita por meio de testes de citotoxicidade dependente de complemento (CDC),

utilizando-se soro do receptor com um painel de linfócitos com especificidade HLA previamente definida e que representa a tipagem HLA da população estudada. Essa metodologia está disponível desde os anos 60^{76,77}.

A PC consiste na pesquisa de anticorpos anti-HLA pré-formados contra um doador específico (DSA, do Inglês, *Donor Specific Antibodies*), nos momentos que antecedem a realização de um transplante. São utilizados linfócitos do doador específico. Tradicionalmente, a prova cruzada é realizada por meio de ensaios que utilizam células, com testes de citotoxicidade dependente de complemento (CDC) ou de citometria de fluxo (FCXM, do Inglês, *Flow Cytometry Crossmatch*)^{65,66,76,78}.

Recentemente, foram desenvolvidas as técnicas de "Ensaio de Fase Sólida", que utilizam proteínas HLA classes I e/ou II, extraídas de células recombinantes, purificadas e ligadas a um substrato artificial ou matriz. Os ensaios de fase sólida oferecem maior sensibilidade e especificidade que os métodos celulares^{65,66,79}. Podem ser realizados por meio de ELISA (do Inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), citometria de fluxo convencional e Luminex^{65,80}.

A tecnologia Luminex utiliza *pools* de antígenos HLA classes I ou II ligadas a microesferas. Cada microesfera é corada com proporções diferentes de 2 corantes fluorescentes, de modo que cada microesfera pode ser distinguida individualmente. Até 100 esferas podem ser combinadas em um único teste. A adesão de um anticorpo à microesfera é detectada usando uma anti-IgG (Imunoglobulina G) conjugada com Phicoeritrina (PE) (corante fluorescente). A fluorescência é medida por meio de um analisador de fluxo, dentro do qual feixes de laser excitam os corantes, permitindo a identificação de cada micropartícula e da positividade do ensaio. O sinal de luz produzido pelo anticorpo aderido é expresso como MFI (do Inglês, *Mean Fluorescence Intensity*)^{65,66}.

Conforme os tipos de antígenos nas microesferas, podem existir 3 fases na pesquisa de anticorpos anti-HLA. A primeira fase consiste na utilização de microesferas com um grande número de moléculas classe I ou

II que mostram simplesmente um resultado positivo ou negativo, servindo como método de triagem. Em uma segunda fase, cada microesfera é equivalente a uma célula, com 2 moléculas derivadas dos 2 alelos dos *loci* A, B, C, DQ e DR. Na terceira fase, cada microesfera apresenta uma única molécula HLA, caracterizando, precisamente, o antígeno; são os testes denominados SAG (do Inglês, *Single Antigen*)^{80,81}. A Figura 1 ilustra alguns dos padrões dos antígenos HLA nas microesferas utilizadas nos testes de fase sólida.

Figura 1 – Padrões das microesferas nos ensaios de fase sólida; A: múltiplos antígenos HLA; B: único antígeno HLA.

Dentre os testes disponíveis comercialmente, estão aqueles que utilizam microesferas marcadas com HLA classes I e II (LABScreen® Mixed), microesferas marcadas com HLA classe I, classe II ou classes I e II (LABScreen® PRA) ou, ainda, microesferas marcadas individualmente com o antígeno HLA de interesse (LABScreen® Single Antigen). São testes de alta sensibilidade e que independem da disponibilidade de células do doador (prova cruzada virtual). Atualmente, as técnicas permitem a detecção não só de anticorpos pré-formados, mas de memória e *de novo*.

O desenvolvimento dos ensaios de fase sólida despertou, novamente, o interesse na avaliação do papel de anticorpos anti-HLA no transplante de fígado.

1.5.2 Influência dos anticorpos anti-HLA no transplante de fígado

Os primeiros estudos clínicos e experimentais mostraram uma relativa resistência do enxerto hepático à rejeição imunológica mediada por anticorpos. A resistência do enxerto hepático tem sido atribuída a algumas hipóteses^{19,82-84}.

- circulação dupla, o que contribui para diluição de imunocomplexos, com eliminação de sua formação e deposição;
- extensa superfície sinusoidal que pode adsorver grandes quantidades de anticorpos, protegendo os hepatócitos de danos;
- produção de antígenos MHC classe I solúveis, que neutralizam anticorpos classe I pré-formados;
- presença de grande massa hepática e capacidade de regeneração: o enxerto sofreria rejeição da mesma forma que outros órgãos, mas os danos seriam compensados por sua grande massa e capacidade de regenerar hepatócitos;
- fagocitose de imunocomplexos, agregados de plaquetas e componentes ativados do complemento pelas células de Kupffer.

Em 1974, Starzl *et al.* relataram que o transplante hepático poderia ser realizado com sucesso mesmo na presença de PC positiva. Três pacientes foram transplantados nessas condições. Nenhum desenvolveu rejeição hiperaguda. No entanto, um dos enxertos evoluiu com disfunção secundária à isquemia e rejeição, suspeitando-se de lesão mediada por anticorpos associada⁸⁵.

Iwatsuki *et al.*, em 1981, também demonstraram a resistência do fígado à rejeição hiperaguda, sendo possível realizar o transplante mesmo na presença de PC positiva⁸⁶. Outras séries dos anos 80 demonstraram que a PC positiva não estava relacionada a prejuízos de sobrevida de enxertos e pacientes^{87,88}.

Tratando-se especificamente de rejeição, alguns estudos não mostraram associação entre a presença de anticorpos anti-HLA e o desenvolvimento de rejeições celular aguda ou crônica^{32,87-90,93}.

Apesar dessas evidências mostrarem resistência do enxerto hepático à rejeição hiperaguda humoral, ausência de associações à rejeição aguda ou crônica, ou impacto negativo na sobrevida, existem outras que sugerem um papel deletério dos anticorpos anti-HLA no transplante hepático.

Takaya *et al.* reportaram, em 1991, em uma série de 600 transplantes, falência do enxerto de 29% no grupo com PC positiva e 16% no grupo com PC negativa no primeiro mês ($p < 0,05$). Perdas por rejeição aguda refratária foram mais frequentes no grupo com PC positiva⁹⁴.

Ogura *et al.* mostraram resultados semelhantes em 1992, com 47% de perda do enxerto no primeiro mês no grupo com PC positiva e 12% no grupo com PC negativa ($p < 0,001$)⁹⁵.

Demetris *et al.*, em 1992, avaliaram a influência de anticorpos pré-formados na função precoce do enxerto. Rejeição hiperaguda com arterite necrotizante não foi observada. No entanto, os pacientes com PC positiva apresentaram maior incidência de falência do enxerto em 180 dias, de rejeição aguda global e dentro de 10 dias após o transplante, além de disfunção precoce do enxerto mais prolongada⁹⁶.

Em estudo de 1994, Katz *et al.* observaram associação entre PC e maior número de episódios de rejeição aguda e resistência ao tratamento com corticosteroides, além de sobrevida inferior do enxerto⁹⁷.

Charco *et al.*, em 1996, observaram, em um período de 5 anos, que 8,2% (20) apresentaram PC positiva em 243 transplantes. Rejeição precoce severa levando à perda do enxerto ocorreu em 8 pacientes no grupo positivo e em apenas 1 paciente do grupo negativo ($p < 0,001$). Em pacientes do sexo

feminino, sobrevividas de 1 ano de enxertos e pacientes foram, respectivamente, 43 e 56% no grupo com anticorpos, contrastando com 78 e 82% no grupo com PC negativa ($p < 0,005$)⁹⁸.

Takaya *et al.*, em estudo de 1999, observaram associação entre complicações biliares graves e rejeição crônica ductopênica com PC cruzada positiva. Foi feita a hipótese de agressão por anticorpos ao endotélio dos vasos de irrigação dos canais biliar⁹⁹.

Em estudo de 2002, Bishara *et al.* avaliaram a influência de ACs anti-HLA específicos e não específicos contra do doador nos resultados do transplante hepático. A sensibilização para qualquer classe de AC (PRA) foi encontrada em 70% dos transplantes, estando associada à maior incidência de episódios de rejeição na primeira semana ($p=0,05$) e nos primeiros 3 meses ($p=0,035$). No que se refere aos ACs específicos (PC), maior número de episódios de rejeição aguda foram observados em 3 meses, além de maior incidência de perda do enxerto¹⁰⁰.

Em estudo retrospectivo de 896 transplantes, realizado em 2008, Castillo-Rama *et al.* observaram uma diminuição nas sobrevividas de 1 e 5 anos dos enxertos de pacientes com anticorpos classe II. Uma correlação com rejeição também foi observada entre anticorpos classe II ou classes I e II. As pesquisas de anticorpos foram feitas por meio de testes de CDC e Luminex, sendo observada uma forte correlação entre os métodos ($p < 0,0001$)¹⁰¹.

Goh *et al.*, em 2010, avaliaram o impacto da PC nos resultados do retransplante de fígado. Foram avaliados de forma retrospectiva 139 retransplantes. A pesquisa foi feita por meio do teste LABScreen® Single Antigen. Foram considerados positivos para DSA receptores com MFI > 1.000. Anticorpos anti-HLA classe I foram associados à sobrevida inferior do enxerto retransplantado, com diferenças de 21,3, 22,1 e 23,7% em 1, 3 e 5 anos, respectivamente. A sobrevida do enxerto foi semelhante nos pacientes com e sem anticorpos classe II¹⁰².

O'Leary *et al.*, em 2011, avaliaram a associação entre DSA e o desenvolvimento de rejeição crônica. Foram feitas coletas seriadas nos meses após o transplante. A pesquisa foi feita com o teste LABScreen® Single Antigen. Foram considerados positivos para DSA receptores com média de MFI > 1.000. Noventa e dois por cento dos pacientes com rejeição crônica eram DSA positivos e 61% dos pacientes controles ($p = 0,003$)¹⁰³.

Em estudo de 2012, avaliando um período de 20 anos, Ruiz *et al.* observaram uma associação entre PC por CDC e achados histológicos de lesão de preservação. No entanto, não foram observadas associações com rejeição hiperaguda, aguda ou crônica, complicações técnicas ou sobrevidas de pacientes e enxertos³².

Musat *et al.*, em estudo de 2013¹⁰⁴, avaliaram a influência de DSA pré-formados na rejeição celular aguda precoce. Ensaio de fase sólida foram utilizados. Cento e nove transplantes consecutivos foram avaliados. A presença de DSA foi associada a um risco aumentado de rejeição aguda em relação aos controles nos primeiros 90 dias após o transplante, sendo:

- classe I: 42% vs 18% ($p < 0,01$);
- classe II: 37% vs 17% ($p < 0,001$);
- classes I ou II: 36% vs 3% ($p < 0,001$).

No mesmo estudo, um MFI ≥ 1.000 para anticorpos classe I e ≥ 5.000 para anticorpos classe II foram associados a valores preditivos positivos de 46 e 54,6% para rejeição celular aguda precoce, respectivamente. Um MFI ≤ 300 para anticorpos classe I ou II foi associado a valores preditivos negativos para rejeição celular aguda precoce de 83 e 93%, respectivamente¹⁰⁴.

O comportamento dos ACs no pós-transplante foi avaliado por Taner *et al.*, em estudo de 2012, em uma série consecutiva de 90 transplantes. A presença de DSA pré-formados ocorreu em 22,2% dos casos. As pesquisas foram feitas por meio de CDC, FCXM e LABScreen® Single Antigen. Foram considerados DSA positivos a partir de 2.000 MFI. Na maioria dos casos, os

anticorpos desapareceram em um período de 4 meses. Não houve diferença na incidência de RCA entre os grupos com e sem DSA¹⁰⁵.

O'Leary *et al.*, em 2014, no relatório do encontro de rejeição mediada por anticorpo no transplante de fígado da ASTS (do Inglês, *American Society of Transplant Surgeons*), concluíram que a presença de anticorpos anti-HLA poderia estar associada às seguintes situações no transplante de fígado¹⁹:

- Rejeição hiperaguda;
- Rejeição aguda mediada por anticorpos;
- Rejeição celular aguda precoce;
- Rejeição resistente a corticosteroides;
- Rejeição crônica;
- Hepatite plasmocitária (hepatite autoimune *de novo*);
- Fibrose idiopática;
- Fibrose acelerada na hepatite C;
- Estenose de anastomose biliar;
- Venopatia portal e hiperplasia nodular regenerativa;
- Rejeição renal mediada por anticorpos no transplante simultâneo fígado-rim.

Além da influência clínica, a caracterização histológica da lesão hepática por anticorpos anti-HLA também não é bem determinada. O transplante hepático contra a barreira ABO tem sido utilizado como modelo para o estudo da rejeição humoral. No transplante de fígado ABO incompatível, em que existe um estado prévio de sensibilização, os resultados, de modo geral, são desapontadores¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. As complicações são atribuídas à rejeição hiperaguda causada por isoaglutininas^{110,111}.

Demetris *et al.*, em 1988, avaliaram pacientes submetidos a transplante hepático ABO incompatível. Analisando os enxertos que foram perdidos precocemente, encontraram áreas de necrose hemorrágica com coagulação difusa dentro do órgão, com intensa deposição de anticorpos e componentes do complemento nas artérias, além da presença de isoaglutininas

específicas contra o doador¹⁰⁶. Haga *et al.* observaram necrose e edema periportal como possíveis marcadores da rejeição humoral no transplante ABO incompatível¹¹².

Afora essas situações extremas de incompatibilidade ABO, não existem critérios histológicos diagnósticos tão bem estabelecidos para a rejeição mediada por anticorpos no transplante hepático. O produto da degradação do complemento C4d tecidual tem sido utilizado como marcador da rejeição mediada por anticorpos nos transplantes renal e cardíaco¹¹³⁻¹¹⁴. No transplante renal, a presença de anticorpos específicos contra o doador, evidência de disfunção orgânica e agressão tecidual com deposição de C4d, são critérios para rejeição humoral^{61,115}. Esse tipo de caracterização ainda não está bem estabelecida para o transplante de fígado^{19,116,117}.

Supõe-se que possa existir um papel “oculto” dos anticorpos anti-HLA em alguns casos de RCA, caracterizando-se a rejeição aguda mediada por anticorpos. O panorama mais aceito seriam casos com características clássicas de rejeição celular aguda, em que se nota, ainda, lesão microvascular hepática, associada à queda dos níveis de complemento e plaquetas, com disfunção persistente do enxerto, apesar do tratamento para a rejeição^{19,118-120}.

Dentro do que foi exposto, dois questionamentos podem ser feitos quando analisamos o papel dos anticorpos anti-HLA no transplante de fígado:

- Existe influência nos resultados?
- De que maneira essa influência se processa?

Neste contexto, consideramos existir um possível papel deletério da presença de anticorpos anti-HLA pré-formados no transplante de fígado. Dessa forma, levantamos a hipótese, no presente estudo, de que anticorpos anti-HLA, específicos ou não contra o doador, seriam marcadores de reatividade imunológica ao enxerto e estariam associados à rejeição celular aguda precoce e à maior gravidade dos casos.

1.5.3 Influência da compatibilidade HLA no transplante de fígado

A importância do pareamento HLA no transplante hepático é controversa, de modo que os transplantes são realizados sem pareamento com sobrevida prolongada. Estudos avaliando a importância da compatibilidade HLA no transplante hepático têm demonstrado resultados conflitantes.

O primeiro estudo publicado em uma população maior avaliando a compatibilidade HLA foi realizado por Markus *et al.* em 1988. Avaliaram a sobrevida de enxertos de fígado baseada no número de alelos HLA incompatíveis para A, B e DR, e encontraram um resultado pouco esperado. A pior compatibilidade foi associada a sobrevidas superiores. Para HLA-A, no grupo com nenhuma incompatibilidade, a sobrevida de 1 ano foi de 41,1%. No grupo com 1 ou 2 incompatibilidades, a sobrevida foi de 60,6% em 1 ano. Dados semelhantes foram encontrados para HLA-DR, em que a sobrevida de 1 ano para nenhuma incompatibilidade foi de 51,9%, em contraste com 60,3% para 1 ou 2 incompatibilidades¹²¹.

No entanto, a pior compatibilidade para HLA-DR foi associada ao aumento da perda de enxertos por rejeição, mostrando um efeito dualístico e uma interação imunológica complexa¹²¹.

Neumann *et al.*, em 2003, observaram que o número de compatibilidades não teve influência na sobrevida do enxerto, mas o número de rejeições agudas foi menor em transplantes com maior compatibilidade¹²².

Navarro *et al.*, em 2006, em uma amostra populacional muito expressiva de transplantados de fígado, na análise de HLA-A, B e DR, não encontraram diferenças nas sobrevidas de 5 anos para qualquer grau de pareamento¹²³.

Lan *et al.*, em metanálise de 2010, avaliando 16 estudos, observaram que um número menor de incompatibilidades HLA (0-2 vs 3-6) reduziu a incidência de rejeição aguda (razão de riscos: 0,7; $p=0,03$). No entanto, não houve diferenças nas sobrevidas dos enxertos em 1 e 5 anos¹²⁴.

Outros estudos avaliaram a compatibilidade HLA e a recidiva de doenças no pós-transplante. Manez *et al.* concluíram que a compatibilidade HLA-B de 1 ou 2 alelos aumentava o risco de recorrência histológica das hepatites B ou C¹²⁵. Langrehr *et al.*, em pacientes transplantados em razão do vírus da hepatite C, observaram uma progressão mais rápida para fibrose em pacientes com até 5 incompatibilidades em relação a pacientes com completa incompatibilidade¹²⁶.

Doran *et al.* observaram, em pacientes submetidos ao transplante por hepatite autoimune, que a sobrevida de 1 ano dos enxertos foi melhor quanto maior o grau de incompatibilidade: 88,9% em 5 a 6 incompatibilidades e 76,2% em 0 a 4 ($p < 0,05$)¹²⁷.

Em relação à cirrose biliar primária, alguns estudos não conseguiram correlacionar o grau de compatibilidade HLA com a recidiva da doença pós-transplante¹²⁸⁻¹³⁰. No entanto, Sanchez *et al.* mostraram associação entre recorrência da doença pós-transplante e similaridade entre os alelos HLA¹³¹. Por outro lado, outros estudos mostraram que a incompatibilidade HLA para o *locus* DR estava associada à recorrência da doença^{132,133}.

Neumann *et al.*, em 2003, observaram que a sobrevida do enxerto na colangite esclerosante primária foi significativamente menor na presença de 1 ou mais compatibilidades HLA-DR ($p < 0,05$). Além disso, na hepatite autoimune, houve tendência à sobrevida menor na presença de maior compatibilidade HLA ($p = 0,1$)¹²².

A maior compatibilidade HLA, possivelmente, é associada a uma melhor “aceitação” imunológica do enxerto, diminuindo as taxas e gravidade dos episódios de rejeição. No entanto, parece estar associada à maior recidiva das doenças de base.

Os genes relacionados ao HLA apresentam intenso polimorfismo, sendo expressos de forma codominante. Dessa forma, a importância da compatibilidade HLA no contexto dos transplantes, provavelmente, deve variar conforme as características populacionais.

Frente ao exposto, contextualizando com a importância de um estudo em nossa população, formulamos a hipótese de que a maior incompatibilidade para alelos HLA estaria associada à rejeição celular aguda precoce e à maior gravidade dos casos.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Principal

Estudar as associações entre anticorpos anti-HLA pré-formados e rejeição celular aguda precoce no transplante de fígado.

2.2 Secundário

Estudar as associações entre compatibilidade HLA e rejeição celular aguda precoce no transplante de fígado.

3 Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

Trata-se de estudo coorte prospectivo. Foram estudados transplantes de fígado consecutivos, com doador falecido ou vivo, no período de janeiro de 2012 a dezembro de 2013. Os transplantes foram realizados na Divisão de Transplantes de Fígado e Órgãos do Aparelho Digestivo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP).

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão foram:

- Transplantes ou retransplantes de fígado ABO compatíveis ou idênticos;
- Pacientes que tenham consentido e outorgado seu consentimento por escrito.

Os critérios de exclusão foram:

- Óbito até o 4º dia pós-operatório;
- Retransplante até o 4º dia pós-operatório.

3.3 Desenho do estudo

Todos os receptores de transplante hepático foram submetidos à pesquisa de anticorpos anti-HLA pré-formados e tipificação HLA. Nos doadores de órgãos, foi realizada a tipificação HLA.

A coleta de sangue para o mapeamento HLA e pesquisa de anticorpos anti-HLA nos receptores foi realizada imediatamente antes do transplante, na sala cirúrgica. A coleta de sangue dos doadores vivos foi realizada antes do procedimento cirúrgico de doação, também em sala cirúrgica. No que se refere ao material dos doadores falecidos, a coleta foi realizada durante o procedimento de captação de múltiplos órgãos, sendo parte da rotina da Central de Transplantes de São Paulo.

Os receptores foram avaliados inicialmente por meio de teste de triagem para a presença de anticorpos anti-HLA pré-formados (Figura 2).

Figura 2 – Fluxograma de coleta de material e triagem da presença de anticorpos anti-HLA; ACS: anticorpos.

Na presença de anticorpos anti-HLA na triagem, foram realizados testes para determinação da especificidade. De acordo com a presença de anticorpos anti-HLA com $\text{MFI} \geq 1.000$, os transplantes foram classificados em sensibilizados (qualquer anticorpo anti-HLA) e não sensibilizados, determinando os grupos principais da análise. Os transplantes sensibilizados foram classificados ainda em: anticorpos classe I, anticorpos classe II, anticorpos classes I e II, e anticorpos específicos contra o doador (DSA) e suas classes (Figura 3).

Figura 3 – Fluxograma da determinação específica dos anticorpos anti-HLA; MFI (*Mean Fluorescence Intensity*); DSA (anticorpos específicos contra o doador).

A tipificação HLA dos receptores e dos doadores foi realizada para os *loci* A, B e DR. De acordo com o número de alelos incompatíveis, os transplantes foram classificados em: HLA compatível (0 a 3 alelos incompatíveis) e HLA incompatível (4 a 6 alelos incompatíveis) (Figura 4).

Figura 4 – Fluxograma da determinação da compatibilidade HLA.

O perfil de anticorpos anti-HLA pré-formados e o grau de compatibilidade HLA dos transplantes foram correlacionados com o desenvolvimento de rejeição celular aguda comprovada por biópsia em até 90 dias após o transplante (rejeição celular aguda precoce). A análise compreendeu os grupos de transplantes sensibilizados vs não sensibilizados, e compatíveis vs incompatíveis, bem como, as classes de anticorpos e DSA.

3.4 Procedimento cirúrgico

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pela equipe de Transplante de Fígado da Divisão de Transplantes de Fígado e Órgãos do Aparelho Digestivo do HC-FMUSP. Os transplantes foram realizados no centro cirúrgico do Instituto Central do HC-FMUSP.

Todos os enxertos foram submetidos à preservação hipotérmica. As soluções de preservação empregadas foram SPS-1[®], Custodiol[®] ou IGL-1[®]. Foram utilizados enxertos totais ou parciais provenientes de doadores falecidos e enxertos de lobo direito hepático provenientes de doadores vivos.

Todos os transplantes realizados foram ortotópicos e seguiram técnicas padronizadas. No que se refere à hepatectomia, foram utilizadas as técnicas de *piggy-back* (preservação do segmento de veia cava inferior retro-hepática do receptor) ou convencional (resseção do segmento de veia cava inferior retro-hepática do receptor). A revascularização de todos os enxertos foi, inicialmente, pela veia porta. A reconstrução do fluxo biliar foi estabelecida por meio de anastomose colédoco-colédoco ou anastomose bílio-digestiva colédoco-jejunal.

3.5 Imunossupressão

Os esquemas de imunossupressão inicial empregados foram duplos ou triplos. Corticosteroides foram utilizados em todos os transplantes. Os esquemas duplos utilizaram corticosteroides associados a tacrolimus (TC) e os esquemas triplos utilizaram corticosteroides, tacrolimus e micofenolato sódico (TCM). A escolha do esquema imunossupressor foi decisão da equipe médica que conduziu o caso, podendo estar relacionada à doença de base, presença de disfunção renal perioperatória, comorbidades e infecção recente.

Todos os transplantes receberam pulso de metilprednisolona (500mg) antecedendo a revascularização do enxerto. Foram administradas doses escalonadas sucessivas diárias de metilprednisolona: 200mg, 160mg, 120mg, 80mg, 40mg e 20mg. Feita manutenção com prednisona 20mg até 30 dias, em que foi iniciada a fase de desmame. Dependendo da etiologia da doença de base, o desmame foi feito entre 90 dias a 1 ano, ou, em alguns casos, a prednisona foi mantida de forma vitalícia.

A data de início e nível alvo do tacrolimus foi de acordo com a decisão da equipe médica responsável pelo caso. Tacrolimus via oral foi iniciado entre o primeiro e terceiro dia pós-operatório. O alvo do nível sérico variou entre 5 e 10 ng/mL.

Micofenolato sódico foi empregado via oral nas doses diárias de 720 mg ou 1040 mg, como coadjuvante em casos com disfunção renal ou risco aumentado de rejeição.

3.6 Estudo imunológico

3.6.1 Pesquisa de anticorpos anti-HLA pré-formados

Antes do transplante, foi realizada a coleta de sangue periférico do receptor, 10 mL em tubo seco. Todas as amostras foram processadas no mesmo dia para obtenção de soro.

Para a pesquisa dos anticorpos, foram utilizados ensaios de fase sólida. Foram utilizados os testes da LABScreen® (One Lambda, Canoga Park, CA, EUA). O teste Mixed® foi utilizado para a triagem, nos fornecendo um dado qualitativo. O teste Single Antigen® determinou a especificidade do anticorpo encontrado. Foram considerados positivos os casos com anticorpos anti-HLA com MFI ≥ 1.000 no teste Single Antigen®.

Em uma placa de PCR com 96 poços, foram incubados 2,5 μ L de microesferas com 10 μ L de soro-teste em cada poço, durante 30 minutos, à 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 μ L 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 μ L de anticorpo IgG caprino anti-humano conjugado com PE com 49,5 μ L de tampão de lavagem para cada poço). Após, foram adicionados 50 μ L 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 μ L 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 expressa em MFI.

Para o teste Single Antigen®, o valor fluorescente de cada esfera corresponde ao valor de cada esfera dividido pelo valor do controle negativo. Para o teste Mixed®, o sinal fluorescente foi equivalente ao valor da esfera menos o valor do controle negativo. O controle negativo foi constituído por um grupo 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. Foi usado o soro controle positivo que já vem no kit.

Todas as pesquisas de anticorpos anti-HLA foram realizadas no Laboratório de Imunologia e Histocompatibilidade do Instituto do Coração do HC-FMUSP.

3.6.2 Tipificação HLA dos receptores e doadores

Para os receptores, foi realizada a coleta de sangue periférico, 4 mL em tubo de hemograma, na sala cirúrgica, imediatamente antes do transplante. Todas as amostras foram processadas no mesmo dia para

obtenção de células e extração do DNA que foi aliquotado, identificado e estocado a -80° C.

De modo semelhante, para os doadores falecidos e vivos, foram realizadas coletas de sangue periférico (4 mL) em tubo de hemograma para a obtenção de células. A tipificação HLA dos doadores falecidos de múltiplos órgãos é rotina da Central de Transplantes da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, uma vez que tem aplicabilidade clínica bem definida para outros transplantes.

Todas as tipificações HLA foram realizadas no Laboratório de Imunologia e Histocompatibilidade do Instituto do Coração do HC-FMUSP.

3.6.3 Extração de DNA

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 1.500 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), na qual 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 a 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 13.000 rpm, e o "pellet" foi ressuspensionado em etanol 70%, para retirar o excesso de sal. O sobrenadante foi, então, desprezado e 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 foram estocadas em freezer -80°C para o início das tipificações.

3.6.4 Métodos de tipificação HLA

A tipificação HLA 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 Primer*) utilizando kits LABType™ SSP (One Lambda, Califórnia, EUA).

A tipificação HLA dos receptores e doadores vivos foi realizada por PCR-SSO, reação de polimerização em cadeia utilizando oligonucleotídeos de sequência específica (do Inglês, *Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotide*). Foram utilizados os kits LABType™ SSO (One Lambda, Califórnia, EUA), 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 (*beads*) codificadas por fluorescência, que fazem parte do sistema multianalítico Luminex. Cada *bead* 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 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 *bead* e da SAPE ligada à sonda. Um *laser* para a cor vermelha (λ 633nm) 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. 30 para a determinação da tipificação HLA.

3.7 Diagnóstico de rejeição celular aguda

O diagnóstico de rejeição celular aguda foi feito na presença de disfunção orgânica, representada por alterações das provas hepáticas, associada à confirmação histológica.

3.7.1 Biópsia hepática

A biópsia hepática foi realizada apenas nos pacientes que desenvolveram disfunção hepática no pós-transplante, evidenciada por piora dos testes bioquímicos hepáticos incluindo bilirrubinas, amino-transferases, fosfatase alcalina e gama-glutamil transferase. Pacientes com provas bioquímicas hepáticas normais ou em normalização não foram submetidos à biópsia.

As biópsias não foram protocolares, de modo que sua realização, mesmo nos pacientes com alterações dos exames, foi decisão da equipe médica que conduziu o caso, sendo influenciada pela magnitude das alterações dos exames e probabilidade de outros diagnósticos.

As biópsias foram realizadas pela equipe de Transplantes de Órgãos do Aparelho Digestivo do HC-FMUSP, preferencialmente pela via percutânea, com agulha de biópsia para tecidos moles 14G x 160 mm.

Todos os pacientes com alterações das provas hepáticas no pós-transplante foram submetidos à ultrassonografia com *doppler* ou tomografia de abdômen com contrastaste para descartar distúrbios vasculares.

3.7.2 Avaliação histológica

Todas as amostras de biópsia hepática realizadas foram avaliadas por patologistas com experiência em transplante de fígado da Divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP. Todas as amostras foram analisadas na coloração hematoxilina-eosina (HE).

Rejeição hepática celular aguda foi diagnosticada e graduada conforme o critério Banff. O critério apresenta dois componentes. Em primeiro lugar, existe um índice de atividade que avalia a intensidade da inflamação portal, agressão biliar e lesão endotelial. Em segundo lugar, existe uma avaliação global que oferece uma graduação baseada no aspecto global da biópsia, com particular peso da intensidade da inflamação portal⁴⁰.

3.8 Variáveis estudadas

As seguintes características dos transplantes foram estudadas:

- Idade do receptor;
- Sexo do receptor;
- Raça do receptor;
- Gestação prévia do receptor;
- Transfusão pregressa de hemoderivados;
- Tipo de doador: falecido ou vivo;
- Idade do doador;
- Retransplante;
- Transplante duplo fígado-rim;
- Transplante prévio de outro órgão sólido (rim, pâncreas, coração, pulmão);
- Diálise pré-transplante;
- Imunossupressão de manutenção: tacrolimus (TC) ou tacrolimus associado a micofenolato sódico (TCM);

- Mediana do nível tacrolimus em 90 dias;
- MELD (do Inglês, *Model for End-Stage Liver Disease*) funcional do dia do transplante, calculado por meio da fórmula: $0,957 \times \text{Loge creatinina (mg/dL)} + 0,378 \times \text{Loge bilirrubina (mg/dL)} + 1,120 \times \text{Loge INR} + 0,643$;
- Tempo de isquemia fria em minutos;
- Tempo de isquemia quente em minutos;
- Etiologia autoimune da doença hepática (cirrose biliar primária, hepatite autoimune e colangite esclerosante primária);
- Insuficiência hepática aguda grave;
- Carcinoma hepatocelular;
- Vírus da hepatite C como etiologia da cirrose;
- Indicação do transplante;
- Anticorpos anti-HLA pré-formados;
- Compatibilidade HLA para os *loci* A, B e DR;
- Rejeição celular aguda precoce.

3.9 Análise estatística

Os dados foram descritos por meio de mediana (quartil 25% - quartil 75%) para variáveis contínuas e porcentagem (frequência) para variáveis qualitativas.

As prevalências dos transplantes definidos como sensibilizados para anticorpos anti-HLA e para cada classe de anticorpo, assim como o número de alelos HLA incompatíveis, foram calculadas e acompanhadas dos intervalos de confiança 95%.

Comparações definidas pelas variáveis “sensibilizados” e “compatibilidade” foram feitas por meio do teste de Fisher para variáveis categóricas, enquanto os testes t, Mann-Whitney ou t modificado por Brunner-Munzel foram utilizados para as variáveis contínuas.

Comparações definidas pela variável “intensidade da rejeição” (leve, moderada e grave) foram feitas também com o teste de Fisher para variáveis categóricas, enquanto o procedimento ANOVA ou Kruskal-Wallis foram utilizados para as variáveis contínuas, seguidos pelas comparações múltiplas dada pelo teste de Tukey não paramétrico.

A normalidade foi verificada pelo teste de Anderson-Darling e a homogeneidade com o teste de Levene.

Sobrevida do enxerto livre de rejeição foi definida como o período após o transplante até a ocorrência de rejeição no tempo máximo de 90 dias. Perdas de enxertos até o quarto dia foram retiradas da amostra. Óbitos ou retransplantes foram considerados como censura.

Variáveis contínuas foram categorizadas com o procedimento de maximização da estatística log-rank proposto por Lausen *et al.*, considerando a sobrevida livre de rejeição em 90 dias. As curvas de sobrevida livre de rejeição foram obtidas com o estimador de Kaplan-Meier acompanhadas pelo teste log-rank.

A regressão simples de Cox foi realizada para avaliar fatores de confusão e de interesse. Para as variáveis em que a regressão de Cox não apresentou convergência numérica, o valor de p do teste log-rank foi considerado. A proporcionalidade dos riscos foi avaliada com o teste para os resíduos de Schoenfeld.

As variáveis com valores de $p < 0,10$ foram incluídas na regressão de Cox múltipla, sendo que as variáveis sexo, raça e idade foram consideradas fatores de confusão independente dos valores de p . Foram determinadas as razões de risco (RR).

Valores de $p < 0,05$ indicaram variáveis estatisticamente significantes. Todos os cálculos foram feitos pelo programa R, versão 3.1.2. (R Core Team, 2015).

3.10 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo do tamanho amostral segue Schoenfeld que define o número de indivíduos necessários para um efeito estatisticamente significativo por meio da estatística log-rank^{134,135}.

Desta forma, um poder de 95%, nível de significância de 5%, prevalência de indivíduos sensibilizados de 23%, tal que a proporção de rejeição dentre os indivíduos sensibilizados corresponde à 46% e razão de risco de 2,8, resulta no número mínimo de 122 indivíduos^{65,104}.

3.11 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP. Registro *online* 9758. Número do Parecer 149.919.

Foi obtido termo de consentimento para todos os pacientes envolvidos.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Transplantes incluídos no estudo e sobrevida global da amostra

No período de janeiro de 2012 a dezembro de 2013, foram realizados 153 transplantes de fígado ABO compatíveis/idênticos na Divisão de Transplantes de Fígado e Órgãos do Aparelho Digestivo do HC-FMUSP. Vinte e quatro transplantes foram excluídos em razão de óbito ou retransplante até o 4º dia pós-operatório. Como mostra a Figura 5, 129 transplantes de fígado, em 123 pacientes, foram incluídos no estudo.

Figura 5 – Transplantes incluídos no estudo.

Em relação aos transplantes excluídos do estudo, os 10 retransplantes até o 4º dia pós-operatório foram em razão de: disfunção grave do enxerto em 8 casos e trombose de artéria hepática em 2 casos. No que se refere

aos óbitos até o 4º dia pós-operatório: 5 casos foram relacionados à disfunção grave do enxerto (insuficiência de múltiplos órgãos), 5 casos de choque séptico, 2 casos de choque hemorrágico e 2 casos de parada cardiocirculatória durante o procedimento cirúrgico.

Durante o período do estudo, não houve perda de seguimento dos pacientes incluídos. A sobrevida da população do estudo foi de 81% em 90 dias. A Figura 6 mostra a curva de sobrevida global.

Figura 6 – Curva de sobrevida global em 90 dias.

4.2 Dados demográficos e características clínicas dos transplantes incluídos no estudo

Os dados demográficos e características clínicas dos 129 transplantes incluídos no estudo estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados demográficos e características clínicas dos transplantes incluídos no estudo.

Variável	Total de transplantes (n=129)
Idade (anos) *	52 (42-60)
Sexo feminino	38,7 (50)
Raça	
Branca	75,2 (97)
Negra	6,2 (8)
Amarela	2,3 (3)
Outras	16,3 (21)
Gestação prévia	62 (31)
Transfusão prévia	48,8 (63)
Transplante com doador vivo	5,4 (7)
Retransplante	13,2 (17)
Transplante duplo	7,7 (10)
Transplante prévio de órgão sólido	1,5 (2)
Diálise pré-transplante	19,4 (25)
Imunossupressão: TC/TCM	46,5 (60)
Nível do tacrolimus (ng/mL) *	7,6 (6,2-8,9)
MELD funcional *	25 (16-33)
Tempo de isquemia fria (min) *	355 (300-438)
Tempo de isquemia quente (min) *	35 (30-40)
Idade do doador (anos) *	37 (23-50)
Doença de base autoimune	13,9 (18)
IHAG	3,1 (4)
CHC	30,2 (39)
VHC	34,9 (45)

TC: tacrolimus; TCM: tacrolimus e micofenolato; IHAG: insuficiência hepática aguda grave; CHC: carcinoma hepatocelular; VHC: vírus da hepatite C; * Valores representados em mediana e quartis; demais em valores percentuais seguidos de frequências.

No que se refere às indicações do transplante de fígado, observamos que a principal indicação foi a cirrose descompensada, presente em 52,7% (68) dos transplantes. O carcinoma hepatocelular foi a segunda principal indicação, presente em 30,2% (39) dos transplantes. A Figura 7 mostra a distribuição das indicações de transplante.

Figura 7 – Indicações de transplante hepático (%).

4.3 Caracterização imunológica dos transplantes

4.3.1 Anticorpos anti-HLA pré-formados

A pesquisa dos anticorpos anti-HLA pré-formados foi realizada nos 129 transplantes incluídos no estudo. Em 35,6%(46) dos transplantes, a pesquisa de anticorpos anti-HLA pré-formados foi considerada positiva ($MFI \geq 1.000$), definindo os grupos sensibilizados e não sensibilizados.

A comparação de semelhança entre os grupos demonstrou uma proporção maior de transplantados do sexo feminino no grupo de sensibilizados (60,8% vs 26,5 %; $p < 0,001$). A proporção de pacientes que realizaram diálise pré-transplante também foi maior no grupo de sensibilizados (32,6% vs 12; $p = 0,01$). Insuficiência hepática aguda grave também foi mais comum no grupo de sensibilizados (8,7 % vs 0%; $p = 0,02$), no entanto, doenças de base autoimune foram mais comuns nos transplantes não sensibilizados (19,3 vs 4,3 %; $p = 0,02$).

Os dados demográficos e características clínicas dos transplantes classificados como sensibilizados e não sensibilizados estão expressos Tabela 2.

Tabela 2 – Dados demográficos e características clínicas dos grupos de transplantes sensibilizados e não sensibilizados.

Variável	Sensibilizados (n=46)	Não sensibilizados (n=83)	p
Idade (anos)*	54 (45,5-59,7)	52 (40-59,5)	0,47
Sexo feminino	60,8 (28)	26,5 (22)	< 0,001
Raça			0,91
Branca	78,2 (36)	73,5 (61)	
Negra	6,5 (3)	6 (5)	
Amarela	2,1 (1)	2,4 (2)	
Outras	13 (6)	18 (15)	
Gestação prévia	60,7 (17)	63,6 (14)	1,0
Transfusão prévia	56,5 (26)	44,6 (37)	0,20
Transplante com doador vivo	2,1 (1)	7,2 (6)	0,42
Retransplante	15,2 (7)	12 (10)	0,60
Transplante duplo	4,3 (2)	9,6 (8)	0,49
Transplante prévio de órgão sólido	4,3 (2)	0 (0)	0,13
Diálise pré-transplante	32,6 (15)	12 (10)	0,01
Imunossupressão: TC/TCM	56,5 (26)	40,9 (34)	0,10
Nível do tacrolimus *	7,2 (6-8,8)	7,8 (6,5-8,9)	0,17
MELD funcional *	29 (15,2-35)	24 (16-31,5)	0,19
Tempo de isquemia fria (min) *	352,5 (284,2-441)	355 (300,5-434)	0,57
Tempo de isquemia quente (min) *	35 (30-37,7)	35 (30-40)	0,57
Idade do doador (anos) *	38 (26-51,2)	35 (23-50)	0,61
Doença de base autoimune	4,3 (2)	19,3 (16)	0,02
IHAG	8,7 (4)	0 (0)	0,02
CHC	32,6 (15)	28,9 (24)	0,69
VHC	36,9 (17)	33,7 (28)	0,85

TC: tacrolimus; TCM: tacrolimus e micofenolato; IHAG: insuficiência hepática aguda grave; CHC: carcinoma hepatocelular; VHC: vírus da hepatite C; * Valores representados em mediana e quartis; demais em valores percentuais seguidos de frequências.

Analisando as classes dos anticorpos anti-HLA, encontramos uma maior prevalência dos anticorpos da classe I (34,1%). A distribuição das classes dos anticorpos está expressa na Tabela 3.

Tabela 3 – Prevalência das classes de anticorpos anti-HLA.

Classes dos anticorpos anti-HLA	Prevalência * (n=129)	IC 95%
Sensibilizados	35,6 (46)	27,9-44,2
I	34,1 (44)	26,5-42,6
II	7,7 (10)	4,1-13,9
I e II	6,2 (8)	3-12

* Valores percentuais seguidos de frequências; IC: intervalo de confiança

Analisando as classes de anticorpos anti-HLA exclusivamente, notamos a presença de anticorpos anti-HLA classe I em 27,9% (36) dos casos. A Tabela 4 mostra a distribuição das classes exclusivas de anticorpos anti-HLA grupo de transplantes.

Tabela 4 – Prevalência das classes exclusivas de anticorpos anti-HLA nos transplantes.

Classes dos anticorpos anti-HLA	Prevalência* (n=46)	IC 95%
I	27,9 (36)	20,9-36,2
II	1,5 (2)	0,1-5,5
I e II	6,2 (8)	3-12

* Valores percentuais seguidos de frequências; IC: intervalo de confiança

A avaliação da presença de anticorpos específicos contra o doador (DSA) foi possível em 126 transplantes. Em 3 transplantes caracterizados como sensibilizados, a ausência de tipificação HLA do doador não permitiu esse tipo de análise. Em 9,5%(12) dos transplantes, identificamos a presença de anticorpos específicos contra o doador (DSA). A prevalência das classes de DSA nos transplantes está expressa na Tabela 5.

Tabela 5 – Prevalência das classes de anticorpos específicos contra o doador (DSA).

Classes do DSA	Prevalência* (n=126)	IC 95%
DSA	9,5 (12)	5,4-16,1
I	9,5 (12)	5,4 -16,1
II	1,6 (2)	0,1-6
I e II	1,6 (2)	0,1-6

*Valores percentuais seguidos de frequências; IC: intervalo de confiança.

Nos transplantes com DSA, não foram encontrados anticorpos classe II de forma exclusiva. A Tabela 6 mostra a prevalência das classes exclusivas de DSA.

Tabela 6 – Prevalência das classes exclusivas de anticorpos específicos contra o doador (DSA).

Classes do DSA	Prevalência (n=126)	IC 95%
I	7,9 (10)	4,3-14
II	0 (0)	0-2,9
I e II	1,6 (2)	0,1-6

*Valores percentuais seguidos de frequências; IC: intervalo de confiança.

A Tabela 7 ilustra o perfil dos anticorpos anti-HLA dos receptores e da tipificação HLA dos doadores nos 12 transplantes com DSA.

Tabela 7 – Perfis dos anticorpos anti-HLA dos receptores e tipificações HLA dos doadores nos transplantes com anticorpos específicos contra o doador (DSA).

Transplante Número	Anticorpos anti-HLA (MFI)	Tipificação HLA
9	A23 (3250); B45 (6.100)	A01, A23,B45 ,B57,DR07,DR11
44	A02 (4.100); B35 (7.000)	A02 ,A03, B35 ,B00,DR01,DR12
50	A02 (1.300); DR07 (5.620)	A01, A02 ,B37,B51, DR07 ,DR14
76	B50 (8.131)	A01,A02,B07, B50 ,DR07,DR00
79	B08 (2.888)	A23,A30, B08 ,B44,DR03,DR13
86	A02(8.234); A30 (9.808); B42(11.530)	A02,A30,B42 ,B44,DR01,DR04
87	B52 (2.417)	A02,A31,B40(62), B52 ,DR04,DR08
91	A02(1.553);B53(1.591);DR13(4.486); DR17(6.892)	A02,A33,B14,B53,DR03 (17),DR13
98	A31 (3.057); B18 (3.373)	A24, A31,B18 ,B39,DR08,DR13
99	A11(6.831);A23 (7.167); B42 (12.747)	A11,A23 ,B35, B42 ,DR03,DR11
123	A66 (10.330); B07 (7.665)	A03, A66,B07 ,B35,DR11,DR00
126	B13 (4.289)	A02,A00, B13 ,B49,DR07,DR00

MFI: *Mean Fluorescence Intensity*.

4.3.2 Compatibilidade HLA

A avaliação do grau de compatibilidade HLA foi possível em 117 transplantes dos 129 incluídos no estudo. A tipificação HLA do receptor não foi realizada em 2 transplantes e a tipificação HLA do doador não foi realizada em 10 transplantes. De acordo com o número de incompatibilidades dos alelos, 91,5% (107) dos transplantes foram classificados como incompatíveis (4 a 6 incompatibilidades) e 8,5% (10) dos transplantes foram classificados como compatíveis (0 a 3, incompatibilidades)

Em 35,9% dos transplantes, ocorreu incompatibilidade completa HLA nos alelos. A Tabela 8 demonstra a prevalência do número de alelos HLA incompatíveis.

Tabela 8 - Prevalência do número de alelos HLA incompatíveis.

Número de alelos HLA incompatíveis	Prevalência* (n=117)	IC 95%
6	35,9 (42)	27,8-44,9
5	35 (41)	27-44
4	20,5 (24)	14,1-28,8
3	6,8 (8)	3,1-13,1
2	1,7 (2)	0,1-6,5
1	0	
0	0	

*Valores percentuais seguidos de frequências; IC: intervalo de confiança.

A comparação de semelhança entre os transplantes considerados compatíveis e incompatíveis mostrou apenas uma maior proporção de transplante com doador vivo no grupo compatíveis (20% vs 0% $p=0,01$). Os dados demográficos e as características clínicas dos transplantes HLA compatíveis e incompatíveis estão na Tabela 9.

Tabela 9 - Dados demográficos e características clínicas dos transplantes HLA compatíveis e incompatíveis.

Variável	Compatíveis (n=10)	Incompatíveis (n=107)	p
Idade (anos) *	50 (38,7-54,7)	53 (42,5-60)	0,63
Sexo feminino	60 (6)	36,4 (39)	0,18
Raça			1,00
Branca	80 (8)	72,9 (78)	
Negra	0 (0)	7,5 (8)	
Amarela	0 (0)	2,8 (3)	
Outras	20 (2)	16,8 (18)	
Gestação prévia	50 (3)	64,1 (25)	0,66
Transfusão prévia	50 (5)	51,4 (55)	1,00
Transplante com doador vivo	20 (2)	0 (0)	0,01
Retransplante	0 (0)	15,9 (17)	0,35
Transplante duplo	10 (1)	8,4 (9)	1,00
Transplante prévio de órgão sólido	10 (1)	0,9 (1)	0,16
Diálise pré-transplante	10 (1)	20,5 (22)	0,68
Imunossupressão:TC/TCM	60 (6)	43 (46)	0,34
Nível do tacrolimus (ng/mL) *	8,5 (7,3-9,3)	7,5 (6,0-8,9)	0,10
MELD funcional *	18,5 (12,7-25)	26 (17-33)	0,12
Tempo de isquemia fria (min) *	374 (214-403,7)	352 (300-432,5)	0,66
Tempo de isquemia quente (min) *	34 (32,2-40,2)	35 (30-40)	0,49
Idade do doador (anos) *	41 (30,5-51,5)	37 (23-51)	0,86
Doença de base autoimune	20 (2)	14 (15)	0,64
IHAG	0 (0)	3,7 (4)	1,00
CHC	30 (3)	28 (30)	1,00
VHC	40 (4)	31,8 (34)	0,72

TC: tacrolimus; TCM: tacrolimus e micofenolato ; IHAG: insuficiência hepática aguda grave; CHC: carcinoma hepatocelular; VHC: vírus da hepatite C; * Valores representados em mediana e quartis; demais em valores percentuais seguidos de valores absolutos

4.4 Rejeição celular aguda

Foram observados 19 episódios de RCA comprovados por biópsia hepática em 19 transplantes. A incidência de RCA nos 90 dias foi de 14,7%. A mediana de incidência foi de 13 dias pós-operatórios, variando de 5 a 77 dias. A Figura 8 mostra a distribuição dos episódios de rejeição celular aguda nos dias pós-operatórios.

Figura 8 – Distribuição dos episódios de rejeição celular aguda conforme o dia pós-operatório.

Os dados demográficos e as características clínicas dos transplantes em que ocorreu RCA estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10 – Dados demográficos e características clínicas dos transplantes com rejeição celular aguda.

Variável	Transplantes com RCA (n=19)
Idade (anos) *	47 (39-53,5)
Sexo Feminino	57,9 (11)
Raça	
Branca	52,6 (10)
Negra	10,5 (2)
Amarela	0 (0)
Outras	36,8 (7)
Gestação prévia	63,6 (7)
Transfusão prévia	52,6 (10)
Transplante com doador vivo	0 (0)
Retransplante	10,5 (2)
Transplante duplo	0 (0)
Transplante prévio de órgão sólido	10,5 (2)

continua

conclusão	
Variável	Transplantes com RCA (n=19)
Diálise pré-transplante	15,8 (3)
Imunossupressão TC/TCM	31,6 (6)
Nível do tacrolimus (ng/mL) *	9 (7,4-10,7)
MELD funcional *	31 (15-33,5)
Tempo de isquemia fria (min) *	398 (303-432,5)
Tempo de isquemia quente (min) *	35 (31-40)
Idade do doador (anos) *	39 (29,5-49,5)
Doença de base autoimune	21 (4)
IHAG	5,2 (1)
CHC	26,3 (5)
VHC	26,3 (5)

RCA: rejeição celular aguda; TC: tacrolimus; TCM: tacrolimus e micofenolato; IHAG: insuficiência hepática aguda grave; CHC: carcinoma hepatocelular; VHC: vírus da hepatite C; * Valores representados em mediana e quartis; demais em valores percentuais seguidos de frequências.

Avaliando o perfil imunológico dos transplantes em que ocorreu RCA, observamos que 52,6% (10) dos transplantes eram sensibilizados para anticorpos anti-HLA e 10,5%(2) classificados como HLA compatíveis. A Tabela 11 ilustra o perfil imunológico dos transplantes com rejeição celular aguda.

Tabela 11 – Perfil imunológico dos transplantes com rejeição celular aguda.

Perfil Imunológico	Transplantes com RCA (n=19)
Sensibilizados	52,6 (10)
Classe I	36,8 (7)
Classe II	5,26 (1)
Classes I e II	10,5 (2)
DSA	10,5 (2)
DSA classe I	5,2 (1)
DSA classe II	0 (0)
DSA classes I e II	5,2 (1)
HLA compatível	10,5 (2)

Valores percentuais seguidos de valores absolutos; RCA: rejeição celular aguda; DSA: anticorpos específicos contra o doador.

4.5 Estudo das associações dos anticorpos anti-HLA pré-formados e da compatibilidade HLA à rejeição celular aguda precoce

4.5.1 Análise univariável de fatores de risco para rejeição celular aguda

Na análise univariável, foram incluídas variáveis de interesse e de confusão. A análise univariável mostrou associação de outras raças, que não negra e amarela, com risco aumentado de rejeição celular aguda precoce em relação à raça branca (RR= 3,8; IC 95%= 1,4-10,2; p=0,006). Transplante prévio de órgão sólido (RR=10,9; IC 95%= 2,5-48; p = 0,002) também foi associado a risco aumentado de rejeição celular aguda. Sexo feminino (RR=2,3; IC 95%=0,9-5,7; p=0,07) foi considerado marginalmente significativo. Receptores com idade ≥ 52 anos apresentaram risco reduzido de RCA (RR=0,4; IC 95%=0,1-0,9; p=0,04).

No que se refere às variáveis de interesse do estudo, sensibilização para anticorpos anti-HLA (RR=2,2; IC 95%= 0,9-5,5; p=0,07) foi considerada marginalmente significativa para risco aumentado de RCA. Anticorpos classe II também foram associados a um risco aumentado de RCA (RR=34,4; IC 95%= 3,1-381,4; p=0,004).

Não foram encontradas outras associações das variáveis de interesse. Foram utilizados os grupos exclusivos de cada classe de anticorpo para a análise, destacando que nenhum caso apresentou DSA classe II de forma isolada. A Tabela 12 mostra a análise univariável dos fatores de risco para RCA.

Tabela 12 – Análise univariável dos fatores de risco para rejeição celular aguda.

Variável	RR	IC 95%	p
Idade ≥ 52 anos	0,4	0,1 – 0,9	0,04
Sexo feminino	2,3	0,9-5,7	0,07
Raça			
Branca	1,0	-	-
Negra	3,1	0,7 – 14,4	0,14
Amarela	-	-	1,0
Outras	3,8	1,4 - 10,2	0,006
Gestação prévia	1,1	0,3 - 4	0,81
Transfusão prévia	1,2	0,5 - 2,9	0,72
Transplante com doador vivo	-	-	0,34
Retransplante	0,8	0,2 – 3,6	0,81
Transplante duplo	-	-	0,21
Transplante prévio de órgão sólido	10,9	2,5 – 48	0,002
Diálise pré-transplante	0,7	0,2 – 2,5	0,63
MELD funcional ≥ 30	1,8	0,7 – 4,5	0,18
Tempo de isquemia fria ≥ 396 (min)	1,8	0,7 – 4,6	0,18
Tempo de isquemia quente ≥ 30 (min)	1,6	0,4 – 5,5	0,44
Idade do doador ≥ 31 (anos)	1,5	0,5 -4,2	0,42
Doença de base autoimune	1,6	0,5 – 5	0,37
IHAG	2,2	0,3 – 16,3	0,45
CHC	0,7	0,3 - 2,1	0,61
VHC	0,6	0,2-1,7	0,37
Sensibilizados	2,2	0,9 – 5,5	0,07
Classe I	1,6	0,6 – 4,2	0,29
Classe II	34,4	3,1-381,4	0,004
Classes I e II	1,6	0,4 – 7	0,51
DSA	1,2	0,3 -5,2	0,80
DSA classe I	0,7	0,1 – 5,1	0,71
DSA classe II	-	-	-
DSA classes I e II	4,1	0,5 – 31,1	0,17
HLA compatível	1,3	0,3 – 5,5	0,74

RR: razão de riscos; IC: intervalo de confiança; IHAG: insuficiência hepática aguda grave; CHC: carcinoma hepatocelular; VHC: vírus da hepatite C; DSA: anticorpos específicos contra o doador.

4.5.2 Análise multivariável de fatores de risco para rejeição celular aguda

As variáveis significativas ou consideradas como tendência na análise univariável foram ajustadas para a análise multivariável: raça, transplante pregresso de órgão sólido, sexo e idade do receptor. Foram utilizados os grupos exclusivos de cada classe de anticorpo para a análise, destacando que nenhum caso apresentou DSA classe II de forma isolada.

Observamos, na análise multivariável, associação significativa entre a presença de sensibilização para anticorpos anti-HLA (RR= 4,3; IC 95%= 1,3-13,5; p= 0,012) e anticorpos anti-HLA classe II (RR=56,4; IC 95%=4,5-709,6; p=0,002) com risco aumentado de RCA. Anticorpos classe I (RR=2,7; IC 95%=0,8-8,8; p=0,08) foram considerados marginalmente significantes. A presença de DSA e menor compatibilidade HLA não apresentaram risco aumentado de RCA. A Tabela 13 mostra os resultados da análise multivariável.

Tabela 13 – Análise multivariável de fatores de risco para rejeição celular aguda.

Variável	RR	IC 95%	p
Sensibilização para anticorpos anti-HLA	4,3	1,3 – 13,5	0,012
Classe I	2,7	0,8-8,8	0,08
Classe II	56,4	4,5 – 709,6	0,002
Classes I e II	1,7	0,3 – 8,3	0,52
DSA	1,9	0,4 – 9,7	0,43
DSA classe I	1,2	0,1 – 10,6	0,84
DSA classe II	-	-	-
DSA classes I e II	3,1	0,3 – 28	0,3
HLA compatível	0,9	0,2 – 4	0,89

RR: razão de riscos; IC: intervalo de confiança; DSA: anticorpos específicos contra o doador; Análise ajustada para raça, transplante pregresso de órgão sólido, sexo e idade do receptor.

4.5.3 Sobrevida livre de rejeição celular aguda em 90 dias

As curvas de sobrevidas dos enxertos livres de RCA foram obtidas por meio do estimador de Kaplan-Meier sendo acompanhadas do teste log-rank. Foram utilizados os grupos exclusivos de cada classe de anticorpo para a análise, destacando que nenhum caso apresentou DSA classe II de forma isolada.

Podemos observar associação significativa entre idade do receptor < 52 anos (75% vs 91%; $p=0,04$), transplante prévio de outro órgão sólido (0% vs 85%; $p<0,001$) e outras raças, que não negra e amarela, em relação à branca (61% vs 89%; $p=0,02$), com sobrevidas livres de RCA inferiores em 90 dias. Sexo feminino foi considerado marginalmente significativo (75% vs 89%; $p=0,06$). Sobrevida livre de RCA em 90 dias para todo o grupo de estudo foi de 83%. As curvas são demonstradas nas Figuras 9, 10, 11 e 12.

Figura 9 – Sobrevida livre de rejeição celular aguda por idade do receptor.

Figura 10 – Sobrevida livre de rejeição celular aguda de acordo com a presença de transplante prévio de órgão sólido.

Figura 11 – Sobrevida livre de rejeição celular aguda por raça.

Figura 12 – Sobrevida livre de rejeição celular aguda por sexo.

No que se refere às variáveis de interesse do estudo, observamos tendência à sobrevivida livre de rejeição em 90 dias inferior no grupo com sensibilização para anticorpos anti-HLA (75% vs 88%; $p=0,07$). Avaliando-se por classes de anticorpos, observamos que a classe II foi associada à sobrevivida livre inferior (50% vs 84%; $p<0,001$). Não foram observadas outras significâncias. As curvas de sobrevividas livres de RCA em 90 dias, conforme a sensibilização e as classes de anticorpos anti-HLA, são demonstradas nas Figuras 13, 14, 15 e 16.

Figura 13 – Sobrevida livre de rejeição celular aguda conforme a presença de sensibilização para anticorpos anti-HLA.

Figura 14 – Sobrevida livre de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA classe I.

Figura 15 – Sobrevida livre de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA classe II.

Figura 16 – Sobrevida livre de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA classes I e II.

No que se refere aos grupos de anticorpos específicos contra o doador (DSA), não foram observadas diferenças nas sobrevidas livres de rejeição celular aguda em 90 dias. As curvas estão ilustradas nas Figuras 17, 18 e 19.

Figura 17 – Sobrevida livre de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador (DSA).

Figura 18 – Sobrevida livre de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador classe I (DSA classe I).

Figura 19 – Sobrevida livre de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador classes I e II (DSA classes I e II).

No que se refere à melhor compatibilidade HLA, não observamos diferença na sobrevida livre de rejeição celular aguda em 90 dias. A Figura 20 ilustra as curvas conforme a compatibilidade HLA.

Figura 20 – Sobrevida livre de rejeição celular aguda conforme a compatibilidade HLA.

4.5.4 Intensidade dos episódios de rejeição celular aguda

Estratificando a intensidade dos episódios de RCA, conforme o critério Banff, em leve, moderada e grave, observamos intensidade moderada em 52,6% (10) dos episódios. A Figura 21 mostra a distribuição dos episódios de RCA conforme a intensidade.

Figura 21 – Distribuição dos episódios de rejeição celular aguda conforme a intensidade.

A comparação entre os grupos de RCA conforme a intensidade não mostrou diferenças significantes entre os grupos, apenas tendência para maior mediana de idade do doador nos episódios moderados e graves ($p=0,06$). A Tabela 14 mostra os dados demográficos e características clínicas dos transplantes estratificados pela gravidade dos episódios de RCA.

Tabela 14 - Dados demográficos e características clínicas dos transplantes conforme a gravidade dos episódios de rejeição celular aguda.

Variável	Leve (n=2)	Moderada (n=10)	Grave (n=7)	p
Idade (anos) *	46,5 (43,7-49,2)	47 (35,5-59,2)	45 (40-50,5)	0,95
Sexo feminino	50 (1)	50 (5)	71,4 (5)	0,80
Raça				0,24
Branca	0 (0)	70 (7)	42,8 (3)	
Negra	0 (0)	10 (1)	14,3 (1)	
Amarela	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Outras	100 (2)	20 (2)	42,8 (3)	
Gestação prévia	0 (0)	60 (3)	80 (4)	0,70
Transfusão prévia	0 (0)	60 (6)	57,1 (4)	0,46
Transplante com doador vivo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1,00

continua

Variável	conclusão			
	Leve (n=2)	Moderada (n=10)	Grave (n=7)	P
Retransplante	0 (0)	20 (2)	0 (0)	0,59
Transplante duplo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1,00
Transplante prévio de órgão sólido	0 (0)	10 (1)	14,3 (1)	1,00
Diálise pré-transplante	50 (1)	10 (1)	14,3 (1)	0,46
Nível do tacrolimus (ng/mL) *	7,4 (7,3-7,4)	9,8 (8,8-10,8)	8,6 (6,7-11,7)	0,54
MELD funcional *	30,5 (23,2-37,7)	25,5 (14-34)	31 (22-32)	0,81
Tempo de isquemia fria (min) *	385 (362,5-407,5)	386,5 (301,5-425)	410 (315-447,5)	0,96
Tempo de isquemia quente (min)*	35	33,5 (30,2-39,7)	35 (32-41)	0,93
Idade do doador (anos) *	24 (23-25)	38,5 (26,2-48,2)	52 (37-56,5)	0,06
Doença de base autoimune	0 (0)	20 (2)	28,6 (2)	1,00
IHAG	50 (1)	0 (0)	0 (0)	0,10
CHC	50 (1)	30 (3)	14,3 (1)	0,6
VHC	0 (0)	30 (3)	28,6 (2)	1
Sensibilizados	50 (1)	50 (5)	57,1 (4)	1
Classe I	50 (1)	20 (2)	57,1 (4)	0,25
Classe II	0 (0)	10 (1)	0 (0)	1,00
Classes I e II	0 (0)	20 (2)	0 (0)	0,59
DSA	0 (0)	10 (1)	14,3 (1)	1,00
DSA classe I	0 (0)	0 (0)	14,3 (1)	0,47
DSA classe II	-	-	-	-
DSA classes I e II	0 (0)	10 (1)	0 (0)	1,0
HLA compatível	0 (0)	0 (0)	28,5 (2)	0,32

IHAG: insuficiência hepática aguda grave; CHC: carcinoma hepatocelular; VHC: vírus da hepatite C; DSA: anticorpos específicos contra o doador; * Valores representados em mediana e quartis; demais em valores percentuais seguidos de frequência.

No entanto, com a categorização da idade do doador, observamos uma maior proporção de episódios de RCA moderados e graves com idade do doador ≥ 31 anos ($p=0,02$) (Figura 22).

Figura 22 – Intensidade dos episódios de rejeição celular aguda conforme idade do doador.

No que se refere às variáveis de interesse, observamos uma maior proporção de transplantes sensibilizados e anticorpos classe I nas manifestações graves (57,1%), no entanto, não atingindo significância ($p=1,0$ e $0,25$, respectivamente) (Figuras 23 e 24). De modo semelhante, não foram encontradas associações significativas entre anticorpos classes II ou I e II com a intensidade da RCA (Figuras 25 e 26).

Figura 23 – Intensidade dos episódios de rejeição celular aguda conforme a sensibilização para anticorpos anti-HLA.

Figura 24 – Intensidade dos episódios de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA classe I.

Figura 25 – Intensidade dos episódios de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA classe II.

Figura 26 – Intensidade dos episódios de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA classes I e II.

Avaliando-se a influência de DSA na intensidade dos episódios de RCA, também não observamos correlações significativas (Figuras 27, 28 e 29).

Figura 27 - Intensidade dos episódios de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador (DSA).

Figura 28 - Intensidade dos episódios de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador classe I (DSA).

Figura 29 - Intensidade dos episódios de rejeição celular aguda conforme a presença de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador classes I e II (DSA classes I e II).

Avaliando a intensidade dos episódios de RCA de acordo com a compatibilidade HLA, podemos observar uma maior proporção de transplantes classificados como incompatíveis em todas as classes de RCA, no entanto, sem atingir significância ($p=0,07$) (Figura 30).

Figura 30 - Intensidade dos episódios de rejeição celular aguda conforme a compatibilidade HLA.

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

Apesar dos notáveis avanços do transplante de fígado nas últimas décadas, com sobrevidas de pacientes em torno de 85% em 1 ano, algumas adversidades persistem, como a rejeição imunológica ao enxerto e recidiva da doença que motivou o transplante.

Mais do que o próprio evento da rejeição, o problema reside nos efeitos indesejáveis da imunossupressão utilizada para evitá-la. Diversos efeitos adversos dos agentes imunossupressores, sejam eles inibidores de calcineurina, corticosteroides, agentes antiproliferativos ou depletos de linfócitos, são descritos: infecções oportunistas, diabetes mellitus, hipertensão arterial, insuficiência renal, neurotoxicidade, entre outros.

Um ponto crítico são as infecções oportunistas no período inicial após o transplante. Somam-se à imunossupressão, a desnutrição presente em muitos pacientes cirróticos, a presença de infecções recentes, a colonização por germes multirresistentes, procedimento cirúrgico de grande porte e politransfusão.

Nos 3 primeiros meses, em razão da maior incidência de rejeição celular aguda, os receptores ainda são mantidos de forma indiscriminada sob um regime mais intenso de imunossupressão na maior parte das vezes. A identificação de pacientes sob maior risco de rejeição celular aguda nos 3 primeiros meses após o transplante seria de fundamental importância,

De certa forma, o propósito do estudo foi determinar grupos de transplantados de fígado com risco aumentado de rejeição celular aguda nos primeiros 90 dias após o transplante. Isso permitiria o ajuste individualizado da imunossupressão, minimizando seus efeitos adversos, incluindo as infecções oportunistas do período pós-operatório.

A estratégia central para identificação desses grupos de risco foi o estudo das associações dos anticorpos anti-HLA pré-formados, nosso objetivo principal, à rejeição celular aguda no período de 90 dias após o

transplante. A estratégia secundária foi o estudo da compatibilidade HLA à rejeição. Lembrando que, na prática clínica, os transplantes de fígado são realizados sem a pesquisa desses anticorpos e sem a busca de uma melhor compatibilidade HLA.

Nos últimos anos, com o surgimento dos ensaios de fase sólida, recuperou-se o grande entusiasmo com os estudos envolvendo os anticorpos anti-HLA no transplante hepático, buscando-se esclarecer o seu real papel.

Anticorpos anti-HLA já foram associados a uma série de manifestações adversas no transplante de fígado. Apesar de ser evento considerado incomum, a rejeição aguda mediada por anticorpos é a associação que vem ganhando maior interesse e melhor caracterização. Existem, ainda, potenciais associações, incluindo rejeição crônica, hepatite plasmocitária e rejeição celular aguda “clássica”, que é o foco de nosso estudo¹⁹.

Esse mesmo entusiasmo não ocorreu com a compatibilidade HLA, uma vez que, em razão da grande variabilidade, são necessários estudos com grande número de casos. Mesmo assim, alguns estudos mostraram que uma menor compatibilidade HLA também foi associada à rejeição celular aguda.

Nosso estudo mostrou que a sensibilização para anticorpos anti-HLA foi associada a rejeição celular aguda em 90 dias após o transplante, determinando um grupo de risco. Por outro lado, o grau de compatibilidade HLA não teve associação à rejeição celular aguda.

Para determinação dessas associações, nosso estudo foi estruturado, em linhas gerais, da seguinte forma: caracterização imunológica dos transplantes, determinação dos episódios de rejeição celular aguda e estudo das associações dos perfis imunológicos encontrados à rejeição celular aguda precoce, o desfecho do estudo.

Perdas precoces dos enxertos foram excluídas da análise. Como a rejeição celular aguda mais precoce identificada em nosso estudo foi no 5º dia após o transplante, optamos por excluir enxertos perdidos até o 4º dia.

Nenhum óbito ou retransplante até o 4º dia pós-operatório foi relacionado à rejeição celular aguda.

Dessa forma, do total de 153 transplantes realizados no período de estudo, 24 (15,7%) transplantes foram excluídos da análise em razão de óbito ou retransplante até o 4º dia após o procedimento. Foram relacionados, em sua maior parte, ao não funcionamento primário do órgão, hemorragia, sepsis e complicações técnicas. Assim, 129 transplantes foram incluídos na avaliação. Como o período de seguimento foi curto, no caso 90 dias, não ocorreram perdas de seguimento.

No que se refere às características clínicas dos transplantes incluídos no estudo, observamos que as principais indicações de transplante foram a cirrose hepática descompensada, em 52,7% dos casos, seguida pelo carcinoma hepatocelular, em 30,2% dos casos. Distribuição essa que acompanha as principais séries de transplante de fígado do ocidente¹³⁶. Acreditamos que não houve destaque de alguma outra característica clínica quando analisamos, de forma descritiva, a série global, conforme a Tabela 1.

Podemos dividir a caracterização imunológica dos transplantes em 3 etapas principais: caracterização de sensibilizados e não sensibilizados para anticorpos anti-HLA, além de grupos conforme as classes; pesquisa de anticorpos específicos contra o doador (DSA); determinação do grau de compatibilidade HLA.

A primeira etapa envolveu a caracterização dos 2 principais grupos de análise: sensibilizados e não sensibilizados para anticorpos anti-HLA, conforme os fluxogramas das Figuras 2 e 3. Foram determinados ainda os grupos de anticorpos conforme as classes.

Transplantes caracterizados como sensibilizados para anticorpos anti-HLA ocorreram em 35,6% (IC 95%=27,9-44,2) dos casos, sendo consistente com a literatura. A prevalência de sensibilização para anticorpos anti-HLA em candidatos a transplante é bastante variada, 23 a 87%, dependendo da metodologia empregada e dos valores de corte. Além disso, existem poucos estudos prospectivos com esse objetivo^{65,100,102}.

Bishara *et al.*, em estudo de 2002, utilizando ensaios de fase sólida por meio de ELISA, encontraram sensibilização para anticorpos anti-HLA em 56 de 80 receptores pré-transplante, correspondendo a 70%¹⁰⁰.

Goh *et al.*, em 2010, considerando valores de MFI maiores que 1.000 como positivos para anticorpos anti-HLA, observaram sensibilização em 87,3% dos pacientes pré-transplante; no entanto, tratavam-se de casos de retransplante, fator claro para a sensibilização¹⁰².

A escolha do valor de MFI ≥ 1.000 como ponto de corte em nosso estudo foi em razão de estudos pregressos, mostrando possível papel deletério dos anticorpos anti-HLA, incluindo rejeição celular aguda, a partir desse valor¹⁰²⁻¹⁰⁴.

Nas comparações de semelhanças entre os grupos denominados sensibilizados e não sensibilizados (Tabela 2), observamos os seguintes achados relevantes. Apesar de gestação e transfusão de hemoderivados serem fatores bem estabelecidos de sensibilização para anticorpos anti-HLA^{65,66}, não observamos essas associações em nosso estudo. Apesar de tratar-se de estudo prospectivo, existem limitações claras e imprecisões na obtenção de dados referentes a essas duas variáveis, que são retrospectivas.

Além disso, uma maior proporção de pacientes do sexo feminino no grupo de sensibilizados em relação aos não sensibilizados, 60,8 e 26,5% ($p < 0,001$), respectivamente. Acreditamos que tal fato esteja relacionado à gestação provavelmente.

De modo semelhante, observamos uma maior proporção de pacientes em diálise pré-transplante (32,6% vs 12 %; $p = 0,01$) e pacientes com insuficiência hepática aguda grave (8,7% vs 0%; $p = 0,02$) no grupo de sensibilizados. Uma hipótese para tal achado seria que a diálise representaria um marcador de pior condição clínica, estando associada à maior probabilidade de transfusão de hemoderivados talvez, o que levaria à exposição aos antígenos HLA.

Raciocínio na mesma linha pode ser feito em relação à insuficiência hepática aguda grave, em que, além da possibilidade de transfusão,

associa-se o fato de necrose hepática e exposição antigênica após a morte celular. E, por fim, um outro achado foi uma maior proporção de doenças de base consideradas autoimune no grupo de não sensibilizados (19,3% vs 4,3%; $p=0,02$).

No que se refere à distribuição das classes de anticorpos anti-HLA, encontramos em nosso estudo uma maior prevalência dos anticorpos classe I, com 34,1% (IC 95%=26,5-42,6). Anticorpos classe II apresentaram uma prevalência de 7,7% (IC 95%= 4,1-13,9), e classes I e II de 6,2% (IC 95%= 3-12). A literatura mostra prevalência variada das classes de anticorpos anti-HLA, com estudos mostrando prevalência maior da classe I, alguns classe II, outros classes I e II^{102,104,119}.

A importância do estudo das classes residiria na expressão diferente das moléculas HLA dentro do próprio tecido hepático. A maior parte do processo inflamatório na rejeição aguda restringe-se ao espaço porta, no qual os epitélios biliares e vasculares são ricos em antígenos classes I e II. Nas veias centrais, que também são acometidas na rejeição, existe um padrão semelhante. Por outro lado, no parênquima propriamente dito, em que o processo inflamatório é muito menos exuberante, os hepatócitos expressam quantidades menores de moléculas classe I e, habitualmente, não expressam moléculas classe II¹³⁷⁻¹³⁹.

Conforme mencionado anteriormente, a segunda etapa da caracterização imunológica consistiu na determinação dos anticorpos específicos contra o doador (DSA). As análises dos anticorpos encontrados e da tipificação HLA dos respectivos doadores permitiram essa caracterização (Tabela 7). A tipificação HLA do doador não foi realizada em 3 transplantes caracterizados como sensibilizados, possibilitando esse tipo de análise em somente 126 transplantes da série. Nos 3 casos, não houve coleta de material dos doadores para a análise ou o material foi extraviado.

Em nosso estudo, encontramos uma baixa prevalência de anticorpos específicos contra o doador (DSA). Foram observados DSA apenas em 12 transplantes, com uma prevalência de 9,5%(IC 95%=5,4-16,1). De maneira semelhante à caracterização da sensibilização, a presença de DSA depende

da metodologia empregada e dos valores de MFI considerados como relevantes.

Em estudo coorte retrospectivo, admitindo um MFI > 1.000 como positivo, Goh *et al.* encontraram DSA em 24,5% dos casos. No entanto, tratavam-se de 139 casos de retransplante de fígado¹⁰².

Conforme comentado anteriormente, poucos estudos avaliaram prospectivamente sensibilização ou anticorpos específicos contra o doador. O estudo de Musat *et al.*, em coorte prospectiva de 113 transplantes, determinaram a prevalência de DSA para diferentes valores de MFI, iniciando a análise a partir de 300. Para valores de MFI $\geq$ 1.000, observaram prevalência de 32% para classes I ou II¹⁰⁴.

Em razão do pequeno número de casos de DSA, e de forma mais acentuada, para as classes de DSA, acreditamos que o estudo das associações desses grupos tenha sido prejudicado. Foram encontrados, para classes exclusivas, apenas 10 casos classe I (7,9%; IC 95%=4,3-14), e 2 casos classes I e II (1,6%; IC 95%=0,1-6). Nenhum caso DSA classe II exclusiva foi documentado (Tabela 6).

A terceira etapa da avaliação imunológica do estudo envolveu a determinação do grau de compatibilidade HLA, um objetivo secundário. Em razão do grande polimorfismo e da codominância dos genes associados ao sistema HLA, conforme esperado, apenas 8,5% (10) dos transplantes foram classificados como HLA compatíveis (0 a 3 incompatibilidades). Aproximadamente, 70% dos transplantes apresentaram 5 ou 6 incompatibilidades. Nenhum caso com 0 ou 1 incompatibilidade foi identificado (Tabela 8). Em razão da não coleta ou extravio do material, a determinação do grau de compatibilidade HLA não foi possível em 12 transplantes.

Neumann *et al.*, em 2003, avaliando a compatibilidade HLA-A, B e DR em 924 transplantes de fígado, encontraram transplantes classificados como compatíveis (0 a 3 incompatibilidades) em apenas 7,6%(70) dos casos¹²². Navarro *et al.*, em 2006, avaliando 29.675 transplantes nos EUA, encontram 18,1% classificados com compatíveis¹²³. Apesar do número reduzido de

casos, se comparado a outros estudos envolvendo compatibilidade HLA, encontramos resultados semelhantes no que se refere ao grau de compatibilidade.

A divisão em transplantes HLA compatíveis (0 a 3 incompatibilidades) e incompatíveis (4 a 6 incompatibilidades) seguiu outros estudos publicados, como os citados anteriormente. Além disso, nosso estudo estatístico não mostrou qualquer maximização dos resultados finais quando foram utilizadas outras divisões para a compatibilidade.

As comparações de semelhanças entre os grupos caracterizados como HLA compatíveis e incompatíveis não mostraram grandes diferenças (Tabela 9). Encontramos apenas uma maior proporção de transplantes com doador vivo no grupo caracterizado como HLA compatível (20% vs 0%; $p=0,01$).

A etapa seguinte do estudo foi determinar os episódios de rejeição celular aguda em até 90 dias, além de suas estratificações de intensidades em leve, moderada e grave. O período de 90 dias foi escolhido por tratar-se do período de maior risco para RCA e com necessidade de imunossupressão mais intensa. A determinação de grupos de risco nesse período, como já comentado anteriormente, poderia ser determinante para ajustes individualizados de imunossupressão.

Além disso, podemos atribuir a maior incidência de RCA nesse período à maior reatividade imunológica. No período mais tardio, habitualmente, os episódios são associados a ajustes inapropriados da imunossupressão ou aderência irregular ao tratamento.

O estudo mostrou uma incidência de rejeição celular aguda em 90 dias de 14,7%, o que é compatível com dados de literatura^{33,34}. A mediana de ocorrência dos episódios foi de 13 dias.

Nota-se que apenas foram diagnosticados como RCA, casos em que existia evidência de disfunção do fígado, representada por alterações das provas hepáticas, associada à biópsia mostrando rejeição celular aguda conforme o critério Banff. Como a realização de biópsia hepática na presença de alterações dos exames não é protocolar, mas é de julgamento

da equipe médica que conduz o caso no momento, é provável que alguns casos com RCA não foram incluídos. Esse julgamento acaba sendo influenciado pela magnitude das alterações das provas hepáticas e pela probabilidade de outros diagnósticos. Identificamos aqui uma limitação do estudo.

A próxima etapa do estudo foi avaliar as associações dos grupos de interesse à rejeição celular aguda em 90 dias após o transplante. O desenho prospectivo do estudo permitiu uma análise do tipo sobrevida. Foram determinadas as razões de risco (RR), realizadas regressões simples e múltipla de Cox (análises uni e multivariável), e curvas de sobrevida livre de RCA pelo estimador Kaplan-Meier. Lembrando que as análises, conforme as classes dos anticorpos, contemplaram os grupos de forma exclusiva, ou seja, apenas classe I ou classe II, ou, ainda, classes I e II.

Diversas variáveis possivelmente associadas a um risco aumentado de rejeição celular aguda⁴³⁻⁴⁵, ou possivelmente como fatores de confusão, foram incluídas na análise univariável.

Nessa análise, algumas variáveis que não eram o foco de interesse também apresentaram associação significativa. Devemos interpretar esses resultados à luz das limitações desse tipo de análise. Dessa forma, outras raças, que não negra e amarela, foram associadas a um risco aumentado de rejeição em relação à raça branca (RR= 3,8; IC 95%= 1,4-10,2; p=0,006). Outros estudos já haviam demonstrado possível associação de diferentes raças à rejeição celular aguda.

Apenas 2 pacientes haviam sido submetidos a transplante de outro órgão sólido (no caso, transplantes renais), previamente ao transplante de fígado. A análise univariável mostrou risco aumentado de rejeição em 90 dias (RR=10,9; IC 95%=2,5 – 48; p = 0,002). Apesar do risco muito aumentado, observamos que se tratam apenas de 2 casos.

Ainda referente a essas variáveis, observamos associações de sexo e idade do receptor à RCA. Sexo feminino foi marginalmente significativo (RR=2,3; IC 95%=0,9-5,7; p=0,07).

Muitas vezes em nossa prática clínica diária, julgamos que receptores com idade mais avançada apresentam menor imunorreatividade aos enxertos, de modo que utilizamos esquemas imunossupressores reduzidos. Em nosso estudo, observamos que idade ≥ 52 anos foi associada a um risco reduzido de RCA (RR=0,4; IC 95%=0,1-0,9; p=0,04). Tal informação pode suscitar outras investigações nesse contexto.

No que se refere às variáveis de interesse, observamos, na análise univariável, que a sensibilização para anticorpos anti-HLA foi marginalmente significativa para risco aumentado de RCA (RR=2,2; IC 95%=0,9-5,5; p=0,07). Anticorpos classe II também foram associados à RCA, com uma razão de riscos bastante elevada (RR=34,4; IC 95%= 3,1-381,4; p=0,004). No entanto, cabe ressaltar que apenas 2 casos apresentavam exclusivamente anticorpos classe II.

O ponto-chave do estudo consistiu na análise multivariável contemplando as variáveis de interesse, principalmente a comparação entre sensibilizados e não sensibilizados (Tabela 13). Foram criados modelos controlados para as variáveis significativas ou consideradas como tendência na análise univariável. Os ajustes foram para raça, transplante pregresso de órgão sólido, sexo e idade do receptor. Lembrando que, para as análises de classes de anticorpos, foi considerado cada grupo isoladamente.

A presença de sensibilização para anticorpos anti-HLA com MFI ≥ 1.000 associou-se significativamente à rejeição celular aguda em até 90 dias após o transplante, de forma independente. Observamos uma forte correlação com RCA, com uma razão de riscos de 4,3 (IC 95%=1,3-13,5; p=0,012).

Caracteriza-se, dessa forma, o primeiro grupo de risco para RCA em nosso estudo, de forma independente. Na prática clínica, essa informação, associada a outras características clínicas (infecção recente, insuficiência renal, por exemplo), poderão levar a um melhor planejamento dos protocolos de imunossupressão. A exemplo, nossa impressão é que pacientes caracterizados como não sensibilizados possam receber uma

imunossupressão atenuada caso seja necessária, como na presença de infecção em atividade.

O fato da simples sensibilização para qualquer anticorpo anti-HLA estar associada à RCA apresenta um outro caráter de praticidade. Para a determinação do risco, não seriam necessárias análises das classes de anticorpos, nem a realização de tipificação HLA do doador para avaliar se são anticorpos específicos ou não.

Analizando a literatura, poucos estudos abordam a simples sensibilização para anticorpos anti-HLA e RCA, sendo todos retrospectivos. A exemplo, Bishara *et al.*, em estudo retrospectivo de 2002, já citados anteriormente, avaliaram 80 transplantes de fígado. A metodologia empregada para a pesquisa dos anticorpos foi o ELISA. A análise incluiu a comparação estatística simples entre os grupos. Foram observados um número maior de episódios de RCA na primeira semana ($p=0,05$) e nos 3 primeiros meses ($p=0,035$) no grupo de sensibilizados. Entre 3 meses e 1 ano, a associação com RCA foi menos importante ($p=0,076$). Não houve, nesse estudo, uma avaliação quanto ao papel das classes de anticorpos¹⁰⁰.

Na análise multivariável envolvendo as classes de anticorpos, observamos associação tanto dos anticorpos classe I quanto os de classe II à RCA. Anticorpos classe I foram marginalmente significantes, com uma razão de riscos de 2,7 (IC 95%= 0,8-8,8; $p= 0,08$). Forte correlação foi encontrada para anticorpos classes II, com uma razão de riscos de 56,4 (IC 95%= 4,5-709,6; $p=0,002$). No entanto, destacamos que, em apenas 2 casos, identificamos exclusivamente anticorpos classe II.

Tratando-se das interações entre as classes de anticorpos, ou seja, o grupo com anticorpos classes I e II, seria natural imaginar associação à RCA, uma vez que isoladamente cada classe apresentou associação. No entanto, isso não foi observado (RR=1,7; IC 95%=0,3-8,3; $p=0,52$).

Um ponto que claramente chama atenção, é o fato de termos encontrado associações de sensibilização, anticorpos classe I ou classe II à RCA, mas não observamos para os anticorpos específicos contra o doador (DSA) e para as classes de DSA. Foram encontrados: DSA (RR=1,9; IC

95%=0,4-9,7; $p=0,43$); DSA classe I (RR=1,2; IC 95%=0,1-10,6; $p=0,84$); DSA classes I e II (RR=3,1; IC 95%=0,3-28; $p=0,3$). Não foram encontrados DSA classe II exclusivos para a análise.

Atribuímos tal fato à baixa prevalência de DSA em nossa série, em que encontramos apenas 12 casos de DSA (9,5%). Já destacamos anteriormente que, em 3 casos, nos quais foram encontrados anticorpos anti-HLA, a tipificação HLA do doador não estava disponível para definição da especificidade.

Uma discussão que cabe dentro dessa observação é referente à reatividade cruzada ou CREG (do Inglês, *Cross-Reactive Group*). Os anticorpos anti-HLA são específicos para epítomos ou determinantes antigênicos. Alguns antígenos HLA podem compartilhar um ou mais epítomos formando o grupo chamado CREG. Dessa forma, um anticorpo definido como não DSA pode reagir no pós-transplante em contato com um antígeno do doador, se este antígeno pertencer ao mesmo CREG desse reconhecido anticorpo, aparentemente não DSA. Isso poderia, em parte, justificar a associação de sensibilizados à RCA, mas não de DSA, em nosso estudo¹⁴⁰.

Observamos um único estudo que avaliou, de modo relativamente semelhante ao nosso, o papel dos anticorpos anti-HLA pré-formados no transplante de fígado. Trata-se do estudo já citado anteriormente, publicado por Musat *et al.* em 2013. É um estudo tipo coorte prospectivo, em que o desfecho foi RCA em até 90 dias após o transplante. Apesar do tamanho da amostra ser semelhante, 113 transplantes, apenas os enxertos que efetivamente sobreviveram os 90 dias foram considerados¹⁰⁴.

Foram observadas associações de anticorpos anti-HLA pré-formados específicos contra o doador à RCA, mesmo para valores baixos de MFI, no caso, ≥ 300 . Para DSA classe I, foi encontrada uma razão de riscos de 2,7 (IC 95%=1,3-5,8; $p<0,01$) e, para a classe II, de 6 (IC 95%=1,8-19,8; $p<0,01$)¹⁰⁴.

No que se refere à avaliação da compatibilidade HLA, um objetivo secundário em nosso estudo, observamos que não houve associação de uma pior compatibilidade HLA à RCA. Transplantes classificados como HLA compatíveis (0 a 3 incompatibilidades) não apresentaram risco reduzido de RCA (RR=0,9; IC 95%=0,2-4; p=0,89).

Comparado a algumas séries na literatura, nosso estudo apresenta um número pequeno de casos para avaliações relacionadas à compatibilidade HLA no transplante hepático. Observamos alguns estudos com grandes populações, com séries atingindo até 30.000 transplantes aproximadamente. Diferente de nosso estudo, a maior parte dos estudos sugere uma associação de pior compatibilidade HLA à RCA^{121,122,124}.

Avaliando as curvas de sobrevida livre de rejeição celular aguda dos enxertos, obtidas pelo estimador de Kaplan-Meier e acompanhadas pelo teste log-rank, observamos um paralelo com as análises univariável e multivariável.

Para algumas variáveis consideradas de interesse secundário, pudemos observar uma sobrevida livre de RCA em 90 dias inferior (vide Figuras 9, 10, 11 e 12). Sejam elas: idade do receptor < 52 anos (75% vs 91%; p=0,04); transplante prévio de órgão sólido (0% vs 85%; p<0,001); outras raças, que não amarela e negra, em relação à branca (61% vs 89%; p=0,02); sexo feminino (75% vs 89%; p=0,06).

Para as variáveis de interesse, encontramos algumas associações (vide Figuras 13 e 15). O grupo de sensibilizados para anticorpos anti-HLA apresentou sobrevida livre de RCA inferior em 90 dias (75% vs 88%; p=0,07). Anticorpos classe II também apresentaram sobrevida livre de RCA inferior (50% vs 84%; p <0,001), mas trata-se de um grupo pequeno, com apenas 2 casos. Nenhuma outra associação referente à sobrevida livre de RCA foi observada.

Uma avaliação final de nosso estudo consistiu na estratificação dos episódios de RCA de acordo com sua intensidade, baseada no critério Banff. Foram encontrados 10,5%(2) de casos leves, 52,6%(10) de casos moderados e 36,8%(7) de casos graves. Foram realizadas apenas

comparações estatísticas simples entre os grupos. Nenhuma associação significativa foi observada para quaisquer das variáveis de interesse.

Apesar do foco do estudo ser o estabelecimento de associações dos anticorpos à rejeição celular aguda e não explicar essas associações, algumas considerações podem ser feitas a respeito de possíveis mecanismos.

Em primeiro lugar, uma vez que, em linhas gerais, a resposta imunológica aos enxertos envolve vias efetoras celulares e humorais, nos casos de rejeição com componente “classicamente celular”, os anticorpos não seriam responsáveis por agressão direta, mas estariam atuando como mediadores de citotoxicidade¹⁰⁰.

A segunda hipótese estaria relacionada à agressão direta, mas “silenciosa” dos anticorpos. Seria a rejeição aguda mediada por anticorpos, que tem evoluído para uma padronização diagnóstica no transplante de fígado. Afora os raros casos de necrose hemorrágica, como já mencionado anteriormente, seriam casos com componente celular clássico, em que se nota, ainda, lesão microvascular hepática, associada à queda dos níveis de complemento e plaquetas, com disfunção persistente do enxerto, apesar do tratamento para a rejeição. Somam-se a essas alterações histológicas a necessidade de documentação de DSA e C4d tecidual¹⁹.

Cabem alguns comentários a respeito de anticorpos anti-HLA de memória, uma vez que, apesar de não ser o foco de nosso estudo, um dos pacientes incluído no estudo perdeu o enxerto provavelmente em razão da presença desses anticorpos (rejeição aguda mediada por anticorpos). Ainda, esse conceito poderia explicar a associação do grupo de sensibilizados, mas não do grupo DSA, à RCA observada em nosso estudo.

Os anticorpos, após sua produção, alcançam rapidamente o máximo de seus títulos e, na ausência de estímulos antigênicos, começam a diminuir de título com o tempo, até níveis não detectáveis, mesmo com as técnicas mais sensíveis, como o Luminex. Eles são responsáveis pela resposta anamnésica que pode aparecer na primeira semana ou, no máximo, no primeiro mês pós-transplante.

A produção de altos títulos de anticorpos (anticorpos *ex novo*) é rápida e pode estar associada à destruição do enxerto. Isso poderia explicar alguns casos de perda precoce do enxerto relacionados à presença de anticorpos, interpretados de forma equivocada, como de etiologia indefinida, uma vez que a pesquisa de anticorpos pré-formados foi negativa¹²⁰. Além disso, estudos recentes envolvendo o transplante renal mostraram que, em pacientes sensibilizados, porém com DSA ausente, podem existir células B de memória específicas para o doador¹⁴¹.

O caso com provável perda do enxerto secundária aos anticorpos de memória trata-se do caso 5 de nossa série. Trata-se de paciente feminina, portadora de cirrose autoimune, submetida a transplante hepático com doador falecido. Pesquisa de anticorpos anti-HLA pré-formados foi negativa. Na biópsia após revascularização, apenas lesão de reperfusão hepática leve. Paciente teve boa evolução clínica inicial, com comportamento normal do enxerto. Foi utilizada imunossupressão com tacrolimus, micofenolato sódico e corticosteroides.

No entanto, evoluiu no 5º dia pós-operatório com alterações severas das provas hepáticas. Ultrassonografia mostrou fluxos sanguíneos normais para o enxerto. Realizada biópsia hepática no 5º dia pós-operatório, com histologia mostrando rejeição celular aguda grave com características clássicas, sem evidências histológicas de agressão por anticorpos (Figura 31).

Figura 31 - Biópsia hepática no 5º dia pós-operatório mostrando rejeição celular aguda.

Apesar da pesquisa de anticorpos pré-formados ter sido negativa, a avaliação de anticorpos após o transplante foi positiva. O estudo realizado no 7º dia pós-operatório mostrou a presença de anticorpos classe I, com MFI de 3.500.

Instituído tratamento para RCA com corticosteroides. Evolui, no entanto, com piora acentuada das provas hepáticas. Em razão dessa evolução, a biópsia hepática foi repetida no 10º dia pós-operatório. O estudo histológico mostrou, apesar da diminuição evidente no infiltrado inflamatório nos espaços porta, necrose hemorrágica em região centrolobular, em, aproximadamente, 30% da amostra, sugestiva de agressão por anticorpos (Figura 32).

Figura 32 - Biópsia hepática no 10º dia pós-operatório mostrando necrose hemorrágica em região centrolobular.

Ocorreu progressão das provas hepáticas, sendo considerada perda imunológica do enxerto. Submetida a retransplante no 15º dia pós-operatório.

Em relação às perspectivas sobre o tema, acreditamos que o estudo pode servir como ponte para outros, dentro deste universo.

Um primeiro passo seria a tentativa de caracterização de possíveis mecanismos, como já comentado anteriormente, que justifiquem a associação de anticorpos à RCA. A revisão histológica dos casos com rejeição de nossa série, em busca de características de rejeição aguda mediada por anticorpos, seria a estratégia inicial. Além disso, a avaliação do C4d poderá ser realizada para melhor caracterização.

Uma outra extensão seria o estudo de associações dos anticorpos anti-HLA a outras complicações, sejam precoces ou tardias. Em relação às precoces, por exemplo, podemos correlacionar com o não funcionamento do

enxerto e estenose biliar, entre outras. Tardiamente, podemos buscar associações à rejeição crônica.

Além dessas possibilidades, a dinâmica tardia desses anticorpos pode ser avaliada e correlacionada com diversas manifestações. Como se comportam esses anticorpos após 3 meses e 1 ano, por exemplo?

No que se refere à compatibilidade HLA, além de ampliação do grupo de estudo e busca de associações a outras complicações no transplante de fígado, podemos realizar avaliações dirigidas aos *loci* A, B ou DR de forma isolada.

Existem algumas limitações evidentes no estudo. A primeira delas reside na possibilidade que alguns casos de RCA não tenham sido diagnosticados, uma vez que a biópsia de fígado não foi aplicada a todos os casos que apresentavam alterações das provas hepáticas. Outra limitação foi o pequeno número de anticorpos específicos contra o doador encontrados. Além disso, trata-se de estudo envolvendo um único centro.

A importância de nosso estudo reside primeiramente no fato de tratar-se de um estudo tipo coorte prospectivo avaliando o papel dos anticorpos anti-HLA, nosso objetivo principal. Poucos estudos na literatura abordaram o tema de tal forma. A grande maioria das séries são retrospectivas ou são estudos tipo caso-controle.

Um segundo ponto de destaque seria a possibilidade de aplicações práticas de algumas de nossas conclusões, ou, pelo menos, para que possam servir como forma de planejamento para aplicação futura. Citamos, por exemplo, a redução da imunossupressão inicial em pacientes não sensibilizados que apresentem algum grau de disfunção renal ou infecção recente.

Em nosso estudo, ficou clara a associação deletéria dos anticorpos anti-HLA. Com a melhor caracterização dos anticorpos anti-HLA no contexto de rejeição no transplante de fígado, é provável que a denominação clássica de rejeição celular aguda, aceita universalmente, passe, no futuro, a ser chamada apenas de rejeição aguda.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

- A sensibilização para anticorpos anti-HLA pré-formados com MFI ≥ 1.000 foi associada a um risco aumentado de rejeição celular aguda precoce, de forma independente;
- A presença de anticorpos anti-HLA pré-formados classe II com MFI ≥ 1.000 foi associada a um risco aumentado de rejeição celular aguda precoce, de forma independente;
- A presença de anticorpos anti-HLA pré-formados classe I com MFI ≥ 1.000 foi associada a um risco aumentado de rejeição celular aguda precoce, marginalmente significativa, de forma independente;
- As presenças de anticorpos classes I e II, e todos os grupos de DSA não foram associados à rejeição celular aguda precoce;
- A pior compatibilidade HLA não foi associada à rejeição celular aguda precoce.

7 Referências

7 REFERÊNCIAS

1. Starzl TE, Groth CG, Brettschneider L, Penn I, Fulginiti VA, Moon JB, et al. Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Ann Surg.* 1968 Sep;168(3):392-415.
2. Organ Procurement and Transplant Network. Available from <http://optn.transplant.hrsa.gov/>.
3. Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo. Sobrevida atuarial de enxertos e pacientes transplantados de fígado Ed SP, período de Julho de 2006 a Dezembro de 2014. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br>.
4. O'Grady J. The immunoreactive patient: Rejection and autoimmune disease. *Liver Transpl.* 2011 Nov;17(Suppl 3):S29-33.
5. Ramanathan R, Sharma A, Kaspar M, Behnke M, Song S, Stravitz RT, et al. Local allograft irradiation as an adjunct for treating severe resistant rejection after liver transplantation in adults. *Liver Transpl.* 2015 Jan;21(1):47-56.
6. Schramm C, Bubenheim M, Adam R, Karam V, Buckels J, O'Grady JG, et al. Primary liver transplantation for autoimmune hepatitis: a comparative analysis of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transpl.* 2010 Apr;16(4):461-9.
7. Silveira MG, Talwalkar JA, Lindor KD, Wiesner RH. Recurrent primary biliary cirrhosis after liver transplantation. *Am J Transpl.* 2010 Apr;10(4):720-6.
8. Fosby B, Karlsen TH, Melum E. Recurrence and rejection in liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol.* 2012 Jan 7;18(1):1-15.
9. Trotter JF. Hot-topic debate on hepatitis C virus: the type of immunosuppression matters. *Liver Transpl.* 2011 Nov;17(Suppl 3):S20-3.
10. Pedersen M, Seetharam A. Infections after orthotopic liver transplantation. *J Clin Exp Hepat.* 2014 Dec;4(4):347-60.
11. Chak E, Saab S. Risk factors and incidence of de novo malignancy in liver transplant recipients: a systematic review. *Liver Int.* 2010 Oct;30(9):1247-58.

12. Oliveira CP, Stefano JT, Alvares-da-Silva MR. Cardiovascular risk, atherosclerosis and metabolic syndrome after liver transplantation: a mini review. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 May;7(4):361-4.
13. Watt KD, Charlton MR. Metabolic syndrome and liver transplantation: a review and guide to management. *J Hepatol*. 2010 Jul;53(1):199-206.
14. Fisher NC, Nightingale PG, Gunson BK, Lipkin GW, Neuberger JM. Chronic renal failure following liver transplantation: a retrospective analysis. *Transplantation*. 1998 Jul 15;66(1):59-66.
15. Gonwa TA, Mai ML, Melton LB, Hays SR, Goldstein RM, Levy MF, et al. End-stage renal disease (ESRD) after orthotopic liver transplantation (OLT) using calcineurin-based immunotherapy: risk of development and treatment. *Transplantation*. 2001 Dec 27;72(12):1934-9.
16. Cohen AJ, Stegall MD, Rosen CB, Wiesner RH, Leung N, Kremers WK, et al. Chronic renal dysfunction late after liver transplantation. *Liver Transpl*. 2002 Oct;8(10):916-21.
17. Ojo AO, Held PJ, Port FK, Wolfe RA, Leichtman AB, Young EW, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med*. 2003 Sep 4;349(10):931-40.
18. Zivkovic SA. Neurologic complications after liver transplantation. *World J Hepatol*. 2013 Aug 27;5(8):409-16.
19. O'Leary JG, Demetris AJ, Friedman LS, Gebel HM, Halloran PF, Kirk AD, et al. The role of donor-specific HLA alloantibodies in liver transplantation. *Am J Transpl*. 2014 Apr;14(4):779-87.
20. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000 Sep 7;343(10):702-9.
21. Rhodes DA, Trowsdale J. Genetics and molecular genetics of the MHC. *Rev Immunogenet*. 1999;1(1):21-31.
22. McCluskey J, Peh CA. The human leucocyte antigens and clinical medicine: an overview. *Rev Immunogenet*. 1999;1(1):3-20.
23. Marsh SG, Bodmer JG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2000. *Tissue Antigens*. 2001 Mar;57(3):236-83.
24. Mach B. Genetics of histocompatibility. *Curr Op Hematol*. 1994 Jan;1(1):4-11.
25. Parham P, Ohta T. Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science*. 1996 Apr 5;272(5258):67-74.

26. Abbas A. *Cellular and molecular immunology*. 7th ed.: Elsevier; 2012.
27. Rocha PN, Plumb TJ, Crowley SD, Coffman TM. Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunol Rev*. 2003 Dec;196:51-64.
28. Game DS, Lechler RI. Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Transplant Immunol*. 2002 Aug;10(2-3):101-8.
29. Hernandez-Fuentes MP, Warrens AN, Lechler RI. Immunologic monitoring. *Immunol Rev*. 2003 Dec;196:247-64.
30. Terminology for hepatic allograft rejection. International Working Party. *Hepatology*. 1995 Aug;22(2):648-54.
31. Wiesner RH, Ludwig J, van Hoek B, Krom RA. Current concepts in cell-mediated hepatic allograft rejection leading to ductopenia and liver failure. *Hepatology*. 1991 Oct;14(4 Pt 1):721-9.
32. Ruiz R, Tomiyama K, Campsen J, Goldstein RM, Levy MF, McKenna GJ, et al. Implications of a positive crossmatch in liver transplantation: A 20-year review. *Liver Transpl*. 2012 Apr;18(4):455-60.
33. Shaked A, Ghobrial RM, Merion RM, Shearon TH, Emond JC, Fair JH, et al. Incidence and severity of acute cellular rejection in recipients undergoing adult living donor or deceased donor liver transplantation. *Am J Transpl*. 2009 Feb;9(2):301-8.
34. Fisher LR, Henley KS, Lucey MR. Acute cellular rejection after liver transplantation: variability, morbidity, and mortality. *Liver Transpl*. 1995 Jan;1(1):10-5.
35. Snover DC, Sibley RK, Freese DK, Sharp HL, Bloomer JR, Najarian JS, et al. Orthotopic liver transplantation: a pathological study of 63 serial liver biopsies from 17 patients with special reference to the diagnostic features and natural history of rejection. *Hepatology*. 1984 Nov-Dec;4(6):1212-22.
36. Ray RA, Lewin KJ, Colonna J, Goldstein LI, Busuttil RW. The role of liver biopsy in evaluating acute allograft dysfunction following liver transplantation: a clinical histologic correlation of 34 liver transplants. *Human Pathol*. 1988 Jul;19(7):835-48.
37. Ascher NL, Stock PG, Bumgardner GL, Payne WD, Najarian JS. Infection and rejection of primary hepatic transplant in 93 consecutive patients treated with triple immunosuppressive therapy. *Surg Gynecol Obstetr*. 1988 Dec;167(6):474-84.

38. Demetris AJ, Lasky S, Van Thiel DH, Starzl TE, Dekker A. Pathology of hepatic transplantation: a review of 62 adult allograft recipients immunosuppressed with a cyclosporine/steroid regimen. *Am J Pathol.* 1985 Jan;118(1):151-61.
39. Hubscher SG. Histological findings in liver allograft rejection - new insights into the pathogenesis of hepatocellular damage in liver allografts. *Histopathology.* 1991 Apr;18(4):377-83.
40. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology.* 1997 Mar;25(3):658-63.
41. McCaughan GW, Davies S, Waugh J, Painter D, Gallagher ND, Thompson J, et al. Cell surface phenotype of mononuclear cells infiltrating bile ducts during acute and chronic liver allograft rejection. *Transpl Proc.* 1989 Feb;21(1 Pt 2):2201-2.
42. Perkins JD, Wiesner RH, Banks PM, LaRusso NF, Krom RA. Immunohistologic labeling of infiltrating T lymphocytes in hepatic allografts: a rejection indicator. *Transpl Proc.* 1987 Feb;19(1 Pt 3):2474-5.
43. Wiesner RH, Demetris AJ, Belle SH, Seaberg EC, Lake JR, Zetterman RK, et al. Acute hepatic allograft rejection: incidence, risk factors, and impact on outcome. *Hepatology.* 1998 Sep;28(3):638-45.
44. Neuberger J. Incidence, timing, and risk factors for acute and chronic rejection. *Liver Transpl.* 1999 Jul;5(4 Suppl 1):S30-6.
45. Bathgate AJ, Hynd P, Sommerville D, Hayes PC. The prediction of acute cellular rejection in orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl.* 1999 Nov;5(6):475-9.
46. Uemura T, Ikegami T, Sanchez EQ, Jennings LW, Narasimhan G, McKenna GJ, et al. Late acute rejection after liver transplantation impacts patient survival. *Clin Transpl.* 2008 May-Jun;22(3):316-23.
47. Thurairajah PH, Carbone M, Bridgestock H, Thomas P, Hebbar S, Gunson BK, et al. Late acute liver allograft rejection; a study of its natural history and graft survival in the current era. *Transplantation.* 2013 Apr 15;95(7):955-9.
48. Demetris AJ, Murase N, Lee RG, Randhawa P, Zeevi A, Pham S, et al. Chronic rejection. a general overview of histopathology and pathophysiology with emphasis on liver, heart and intestinal allografts. *Ann Transplant.* 1997;2(2):27-44.

49. Blakolmer K, Jain A, Ruppert K, Gray E, Duquesnoy R, Murase N, et al. Chronic liver allograft rejection in a population treated primarily with tacrolimus as baseline immunosuppression: long-term follow-up and evaluation of features for histopathological staging. *Transplantation*. 2000 Jun 15;69(11):2330-6.
50. Demetris A, Adams D, Bellamy C, Blakolmer K, Clouston A, Dhillon AP, et al. Update of the International Banff Schema for Liver Allograft Rejection: working recommendations for the histopathologic staging and reporting of chronic rejection. An International Panel. *Hepatology*. 2000 Mar;31(3):792-9.
51. Quaglia AF, Del Vecchio Blanco G, Greaves R, Burroughs AK, Dhillon AP. Development of ductopaenic liver allograft rejection includes a "hepatic" phase prior to duct loss. *J Hepatol*. 2000 Nov;33(5):773-80.
52. Watson R, Kozlowski T, Nickleit V, Woosley JT, Schmitz JL, Zacks SL, et al. Isolated donor specific alloantibody-mediated rejection after ABO compatible liver transplantation. *Am J Transp*. 2006 Dec;6(12):3022-9.
53. Kamar N, Lavayssiere L, Muscari F, Selves J, Guilbeau-Frugier C, Cardeau I, et al. Early plasmapheresis and rituximab for acute humoral rejection after ABO-compatible liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 2009 Jul 21;15(27):3426-30.
54. Della-Guardia B, Almeida MD, Meira-Filho SP, Torres MA, Venco F, Afonso RC, et al. Antibody-mediated rejection: hyperacute rejection reality in liver transplantation? A case report. *Transpl Proc*. 2008 Apr;40(3):870-1.
55. Rostron A, Carter V, Mutunga M, Cavanagh G, O'Suilleabhain C, Burt A, et al. A case of acute humoral rejection in liver transplantation: successful treatment with plasmapheresis and mycophenolate mofetil. *Transpl Int*. 2005 Nov;18(11):1298-301.
56. Taner T, Stegall MD, Heimbach JK. Antibody-mediated rejection in liver transplantation: current controversies and future directions. *Liver Transpl*. 2014 May;20(5):514-27.
57. Colvin RB. C4d in liver allografts: a sign of antibody-mediated rejection? *Am J Transpl*. 2006 Mar;6(3):447-8.
58. Michaels PJ, Fishbein MC, Colvin RB. Humoral rejection of human organ transplants. *Springer Semin Immunopathol*. 2003 Sep;25(2):119-40.

59. 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 27;78(2):181-5.
60. Pascual J, Samaniego MD, Torrealba JR, Odorico JS, Djamali A, Becker YT, et al. Antibody-mediated rejection of the kidney after simultaneous pancreas-kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Apr;19(4):812-24.
61. 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 Transpl*. 2010 Mar;10(3):464-71.
62. Kfoury AG, Renlund DG, Snow GL, Stehlik J, Folsom JW, Fisher PW, et al. A clinical correlation study of severity of antibody-mediated rejection and cardiovascular mortality in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2009 Jan;28(1):51-7.
63. Torrealba JR, Samaniego M, Pascual J, Becker Y, Pirsch J, Sollinger H, et al. C4d-positive interacinar capillaries correlates with donor-specific antibody-mediated rejection in pancreas allografts. *Transplantation*. 2008 Dec 27;86(12):1849-56.
64. Morrell MR, Patterson GA, Trulock EP, Hachem RR. Acute antibody-mediated rejection after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2009 Jan;28(1):96-100.
65. Fuggle SV, Martin S. Tools for human leukocyte antigen antibody detection and their application to transplanting sensitized patients. *Transplantation*. 2008 Aug 15;86(3):384-90.
66. Lobashevsky AL. Methodological aspects of anti-human leukocyte antigen antibody analysis in solid organ transplantation. *World J Transpl*. 2014 Sep 24;4(3):153-67.
67. Takemoto S, Terasaki PI, Cecka JM, Cho YW, Gjertson DW. Survival of nationally shared, HLA-matched kidney transplants from cadaveric donors. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. *New Engl J Med*. 1992 Sep 17;327(12):834-9.
68. Hsia S, Tong JY, Parris GL, Nghiem DD, Cottingham EM, Rudert WA, et al. Molecular compatibility and renal graft survival--the HLA DRB1 genotyping. *Transplantation*. 1993 Feb;55(2):395-9.

69. Taylor CJ, Smith SI, Sharples LD, Parameshwar J, Cary NR, Keogan M, et al. Human leukocyte antigen compatibility in heart transplantation: evidence for a differential role of HLA matching on short- and medium-term patient survival. *Transplantation*. 1997 May 15;63(9):1346-51.
70. Opelz G. Effect of HLA matching in 10,000 cyclosporine-treated cadaver kidney transplants. *Transpl Proc*. 1987 Feb;19(1 Pt 1):641-6.
71. Opelz G. Importance of HLA antigen splits for kidney transplant matching. *Lancet*. 1988 Jul 9;2(8602):61-4.
72. Anasetti C, Amos D, Beatty PG, Appelbaum FR, Bensinger W, Buckner CD, et al. Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *New Engl J Med*. 1989 Jan 26;320(4):197-204.
73. Gjertson DW, Terasaki PI, Takemoto S, Mickey MR. National allocation of cadaveric kidneys by HLA matching. Projected effect on outcome and costs. *New Engl J Med*. 1991 Apr 11;324(15):1032-6.
74. Beatty PG, Anasetti C, Hansen JA, Longton GM, Sanders JE, Martin PJ, et al. Marrow transplantation from unrelated donors for treatment of hematologic malignancies: effect of mismatching for one HLA locus. *Blood*. 1993 Jan 1;81(1):249-53.
75. Susal C, Opelz G. Current role of human leukocyte antigen matching in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transpl*. 2013 Aug;18(4):438-44.
76. Starzl TE, Marchioro TL, Terasaki PI, Porter KA, Faris TD, Herrmann TJ, et al. Chronic survival after human renal homotransplantation. Lymphocyte-antigen matching, pathology and influence of thymectomy. *Ann Surg*. 1965 Oct;162(4):749-87.
77. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *New Engl J Med*. 1969 Apr 3;280(14):735-9.
78. Bray RA. Flow cytometry crossmatching for solid organ transplantation. *Methods Cell Biol*. 1994;41:103-19.
79. McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation*. 2000 Feb 15;69(3):319-26.
80. Tait BD, Susal 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.

81. Tait BD, Hudson F, Cantwell L, Brewin G, Holdsworth R, Bennett G, et al. Review article: luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. *Nephrology*. 2009 Apr;14(2):247-54.
82. Demetris AJ, Murase N, Nakamura K, Iwaki Y, Yagihashi A, Valdivia L, et al. Immunopathology of antibodies as effectors of orthotopic liver allograft rejection. *Semin Liver Dis*. 1992 Feb;12(1):51-9.
83. McMillan RW, Gelder FB, Zibari GB, Aultman DF, Adamashvili I, McDonald JC. Soluble fraction of class I human histocompatibility leukocyte antigens in the serum of liver transplant recipients. *Clin Transpl*. 1997 Apr;11(2):98-103.
84. Davies HS, Pollard SG, Calne RY. Soluble HLA antigens in the circulation of liver graft recipients. *Transplantation*. 1989 Mar;47(3):524-7.
85. Starzl TE, Ishikawa M, Putnam CW, Porter KA, Picache R, Husberg BS, et al. Progress in and deterrents to orthotopic liver transplantation, with special reference to survival, resistance to hyperacute rejection, and biliary duct reconstruction. *Transpl Proc*. 1974 Dec;6(4 Suppl 1):129-39.
86. Iwatsuki S, Iwaki Y, Kano T, Klintmalm G, Koep LJ, Weil R, et al. Successful liver transplantation from crossmatch-positive donors. *Transpl Proc*. 1981 Mar;13(1 Pt 1):286-8.
87. Gordon RD, Fung JJ, Markus B, Fox I, Iwatsuki S, Esquivel CO, et al. The antibody crossmatch in liver transplantation. *Surgery*. 1986 Oct;100(4):705-15.
88. Moore SB, Wiesner RH, Perkins JD, Nagorney DM, Sterioff S, Krom RA. A positive lymphocyte cross-match and major histocompatibility complex mismatching do not predict early rejection of liver transplants in patients treated with cyclosporine. *Transpl Proc*. 1987 Feb;19(1 Pt 3):2390-1.
89. Fujita S, Rosen C, Reed A, Langham MR, Jr., Howard RJ, Lauwers GY, et al. Significance of preformed anti-donor antibodies in liver transplantation. *Transplantation*. 1997 Jan 15;63(1):84-8.
90. Lunz J, Ruppert KM, Cajaiba MM, Isse K, Bentejewski CA, Minervini M, et al. Re-examination of the lymphocytotoxic crossmatch in liver transplantation: can C4d stains help in monitoring? *Am J Transpl*. 2012 Jan;12(1):171-82.
91. Matinlauri IH, Hockerstedt KA, Isoniemi HM. Equal overall rejection rate in pre-transplant flow-cytometric cross-match negative and positive adult recipients in liver transplantation. *Clin Transpl*. 2005 Oct;19(5):626-31.

92. Donaldson PT, Thomson LJ, Heads A, Underhill JA, Vaughan RW, Rolando N, et al. IgG donor-specific crossmatches are not associated with graft rejection or poor graft survival after liver transplantation. An assessment by cytotoxicity and flow cytometry. *Transplantation*. 1995 Nov 15;60(9):1016-23.
93. Muro M, Marin L, Miras M, Moya-Quiles R, Minguela A, Sanchez-Bueno F, et al. Liver recipients harbouring anti-donor preformed lymphocytotoxic antibodies exhibit a poor allograft survival at the first year after transplantation: experience of one centre. *Transplant Immunol*. 2005 Jun;14(2):91-7.
94. Takaya S, Duquesnoy R, Iwaki Y, Demetris J, Yagihashi A, Bronsther O, et al. Positive crossmatch in primary human liver allografts under cyclosporine or FK 506 therapy. *Transpl Proc*. 1991 Feb;23(1 Pt 1):396-9.
95. Ogura K, Koyama H, Takemoto S, Terasaki PI, Busuttil RW. Significance of a positive crossmatch on outcome in human liver transplantation. *Transpl Proc*. 1992 Aug;24(4):1465.
96. Demetris AJ, Nakamura K, Yagihashi A, Iwaki Y, Takaya S, Hartman GG, et al. A clinicopathological study of human liver allograft recipients harboring preformed IgG lymphocytotoxic antibodies. *Hepatology*. 1992 Sep;16(3):671-81.
97. Katz SM, Kimball PM, Ozaki C, Monsour H, Clark J, Cavazos D, et al. Positive pretransplant crossmatches predict early graft loss in liver allograft recipients. *Transplantation*. 1994 Feb 27;57(4):616-20.
98. Charco R, Vargas V, Balsells J, Lazaro JL, Murio E, Jaurrieta E, et al. Influence of anti-HLA antibodies and positive T-lymphocytotoxic crossmatch on survival and graft rejection in human liver transplantation. *J Hepatol*. 1996 Apr;24(4):452-9.
99. Takaya S, Jain A, Yagihashi A, Nakamura K, Kobayashi M, Takeuchi K, et al. Increased bile duct complications and/or chronic rejection in crossmatch positive human liver allografts. *Transpl Proc*. 1999 Aug;31(5):2028-31.
100. Bishara A, Brautbar C, Eid A, Scherman L, Ilan Y, Safadi R. Is presensitization relevant to liver transplantation outcome? *Human Immunol*. 2002 Sep;63(9):742-50.
101. Castillo-Rama M, Castro MJ, Bernardo I, Meneu-Diaz JC, Elola-Olaso AM, Calleja-Antolin SM, et al. Preformed antibodies detected by cytotoxic assay or multibead array decrease liver allograft survival: role of human leukocyte antigen compatibility. *Liver Transpl*. 2008 Apr;14(4):554-62.

102. Goh A, Scalamogna M, De Feo T, Poli F, Terasaki PI. Human leukocyte antigen crossmatch testing is important for liver retransplantation. *Liver Transpl.* 2010 Mar;16(3):308-13.
103. O'Leary JG, Kaneku H, Susskind BM, Jennings LW, Neri MA, Davis GL, et al. High mean fluorescence intensity donor-specific anti-HLA antibodies associated with chronic rejection Postliver transplant. *Am J Transpl.* 2011 Sep;11(9):1868-76.
104. Musat AI, Pigott CM, Ellis TM, Agni RM, Levenson GE, Powell AJ, et al. Pretransplant donor-specific anti-HLA antibodies as predictors of early allograft rejection in ABO-compatible liver transplantation. *Liver Transpl.* 2013 Oct;19(10):1132-41.
105. Taner T, Gandhi MJ, Sanderson SO, Poterucha CR, De Goey SR, Stegall MD, et al. Prevalence, course and impact of HLA donor-specific antibodies in liver transplantation in the first year. *Am J Transpl.* 2012 Jun;12(6):1504-10.
106. Demetris AJ, Jaffe R, Tzakis A, Ramsey G, Todo S, Belle S, et al. Antibody-mediated rejection of human orthotopic liver allografts. A study of liver transplantation across ABO blood group barriers. *Am J Pathol.* 1988 Sep;132(3):489-502.
107. Gugenheim J, Samuel D, Reynes M, Bismuth H. Liver transplantation across ABO blood group barriers. *Lancet.* 1990 Sep 1;336(8714):519-23.
108. Farges O, Kalil AN, Samuel D, Saliba F, Arulnaden JL, Debat P, et al. The use of ABO-incompatible grafts in liver transplantation: a life-saving procedure in highly selected patients. *Transplantation.* 1995 Apr 27;59(8):1124-33.
109. Lo CM, Shaked A, Busuttil RW. Risk factors for liver transplantation across the ABO barrier. *Transplantation.* 1994 Sep 15;58(5):543-7.
110. Zimmerli M, Lerut J, Muller P, Zimmermann A, Nydegger U. Fluctuation of anti-A and anti-B histo-blood-group antibodies in a patient after liver transplantation. *Infusionstherapie.* 1991 Apr;18(2):91-5.
111. Triulzi DJ, Shirey RS, Ness PM, Klein AS. Immunohematologic complications of ABO-unmatched liver transplants. *Transfusion.* 1992 Nov-Dec;32(9):829-33.
112. Haga H, Egawa H, Shirase T, Miyagawa A, Sakurai T, Minamiguchi S, et al. Periportal edema and necrosis as diagnostic histological features of early humoral rejection in ABO-incompatible liver transplantation. *Liver Transpl.* 2004 Jan;10(1):16-27.

113. 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 Transpl.* 2003 Jun;3(6):708-14.
114. Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol.* 2005 Oct;5(10):807-17.
115. Takemoto SK, Zeevi A, Feng S, Colvin RB, Jordan S, Kobashigawa J, et al. National conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. *Am J Transpl.* 2004 Jul;4(7):1033-41.
116. Sakashita H, Haga H, Ashihara E, Wen MC, Tsuji H, Miyagawa-Hayashino A, et al. Significance of C4d staining in ABO-identical/compatible liver transplantation. *Mod Pathol.* 2007 Jun;20(6):676-84.
117. Ali S, Ormsby A, Shah V, Segovia MC, Kantz KL, Skorupski S, et al. Significance of complement split product C4d in ABO-compatible liver allograft: diagnosing utility in acute antibody mediated rejection. *Transplant Immunol.* 2012 Jan;26(1):62-9.
118. Manez R, Kelly RH, Kobayashi M, Takaya S, Bronsther O, Kramer D, et al. Immunoglobulin G lymphocytotoxic antibodies in clinical liver transplantation: studies toward further defining their significance. *Hepatology.* 1995 May;21(5):1345-52.
119. Musat AI, Agni RM, Wai PY, Pirsch JD, Lorentzen DF, Powell A, et al. The significance of donor-specific HLA antibodies in rejection and ductopenia development in ABO compatible liver transplantation. *Am J Transpl.* 2011 Mar;11(3):500-10.
120. O'Leary JG, Kaneku H, Demetris AJ, Marr JD, Shiller SM, Susskind BM, et al. Antibody-mediated rejection as a contributor to previously unexplained early liver allograft loss. *Liver Transpl.* 2014 Feb;20(2):218-27.
121. Markus BH, Duquesnoy RJ, Gordon RD, Fung JJ, Vanek M, Klintmalm G, et al. Histocompatibility and liver transplant outcome. Does HLA exert a dualistic effect? *Transplantation.* 1988 Sep;46(3):372-7.
122. Neumann UP, Guckelberger O, Langrehr JM, Lang M, Schmitz V, Theruvath T, et al. Impact of human leukocyte antigen matching in liver transplantation. *Transplantation.* 2003 Jan 15;75(1):132-7.
123. Navarro V, Herrine S, Katopes C, Colombe B, Spain CV. The effect of HLA class I (A and B) and class II (DR) compatibility on liver transplantation outcomes: an analysis of the OPTN database. *Liver Transpl.* 2006 Apr;12(4):652-8.

124. Lan X, Zhang MM, Pu CL, Guo CB, Kang Q, Li YC, et al. Impact of human leukocyte antigen mismatching on outcomes of liver transplantation: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2010 Jul 21;16(27):3457-64.
125. Manez R, Mateo R, Tabasco J, Kusne S, Starzl TE, Duquesnoy RJ. The influence of HLA donor-recipient compatibility on the recurrence of HBV and HCV hepatitis after liver transplantation. *Transplantation*. 1995 Feb 27;59(4):640-2.
126. Langrehr JM, Puhl G, Bahra M, Schmeding M, Spinelli A, Berg T, et al. Influence of donor/recipient HLA-matching on outcome and recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Liver Transpl*. 2006 Apr;12(4):644-51.
127. Doran TJ, Geczy AF, Painter D, McCaughan G, Sheil AG, Susal C, et al. A large, single center investigation of the immunogenetic factors affecting liver transplantation. *Transplantation*. 2000 Apr 15;69(7):1491-8.
128. Charatcharoenwittaya P, Pimentel S, Talwalkar JA, Enders FT, Lindor KD, Krom RA, et al. Long-term survival and impact of ursodeoxycholic acid treatment for recurrent primary biliary cirrhosis after liver transplantation. *Liver Transpl*. 2007 Sep;13(9):1236-45.
129. Manousou P, Arvaniti V, Tsochatzis E, Isgro G, Jones K, Shirling G, et al. Primary biliary cirrhosis after liver transplantation: influence of immunosuppression and human leukocyte antigen locus disparity. *Liver Transpl*. 2010 Jan;16(1):64-73.
130. Khettry U, Anand N, Faul PN, Lewis WD, Pomfret EA, Pomposelli J, et al. Liver transplantation for primary biliary cirrhosis: a long-term pathologic study. *Liver Transpl*. 2003 Jan;9(1):87-96.
131. Sanchez EQ, Levy MF, Goldstein RM, Fasola CG, Tillery GW, Netto GJ, et al. The changing clinical presentation of recurrent primary biliary cirrhosis after liver transplantation. *Transplantation*. 2003 Dec 15;76(11):1583-8.
132. Guy JE, Qian P, Lowell JA, Peters MG. Recurrent primary biliary cirrhosis: peritransplant factors and ursodeoxycholic acid treatment post-liver transplant. *Liver Transpl*. 2005 Oct;11(10):1252-7.
133. Balan V, Ruppert K, Demetris AJ, Ledneva T, Duquesnoy RJ, Detre KM, et al. Long-term outcome of human leukocyte antigen mismatching in liver transplantation: results of the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. *Hepatology*. 2008 Sep;48(3):878-88.

134. Schoenfeld DA. Sample-size formula for the proportional-hazards regression model. *Biometrics*. 1983 Jun;39(2):499-503.
135. Peto RPJ. Asymptotically efficient rank invariant test procedures. *J Royal Statist Soc.* 1972;Series A (General):185-207.
136. Kim WR, Smith JM, Skeans MA, Schladt DP, Schnitzler MA, Edwards EB, et al. OPTN/SRTR 2012 Annual Data Report: liver. *Am J Transpl.* 2014 Jan;14(Suppl 1):69-96.
137. Takacs L, Szende B, Monostori E, Rot A, Lapis K, Szecseny A, et al. Expression of HLA-DR antigens on bileduct cells of rejected liver transplant. *Lancet*. 1983 Dec 24-31;2(8365-66):1500.
138. Daar AS, Fuggle SV, Fabre JW, Ting A, Morris PJ. The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. *Transplantation*. 1984 Sep;38(3):287-92.
139. Steinhoff G, Wonigeit K, Pichlmayr R. Analysis of sequential changes in major histocompatibility complex expression in human liver grafts after transplantation. *Transplantation*. 1988 Feb;45(2):394-401.
140. Lucas DP, Leffell MS, Zachary AA. Differences in immunogenicity of HLA antigens and the impact of cross-reactivity on the humoral response. *Transplantation*. 2015 Jan;99(1):77-85.
141. Lucia M, Luque S, Crespo E, Melilli E, Cruzado JM, Martorell J, et al. Preformed circulating HLA-specific memory B cells predict high risk of humoral rejection in kidney transplantation. *Kidney Internat*. 2015 Oct;88(4):874-87.

8 Apêndices

8 APÊNDICES

8.1 APÊNDICE A - Dados Clínicos dos Transplantes

	RGHC	Sexo	Raça	Idade	Gestação	Transfusão prévia	Transplante prévio de órgão sólido	MELD funcional
1	13986331 K	M	B	45	n	n	n	30
2	13965691I	M	B	23	n	s	n	39
3	3260076 I	M	B	65	n	s	n	10
4	13974408 C	M	B	58	n	n	n	33
5	2200723 J	F	N	51	s	n	n	24
6	13861366 H	M	B	47	n	n	n	34
7	5169284 A	M	B	44	n	s	n	29
8	5169284 A	M	B	44	n	s	n	32
9	2200723 J	F	N	51	s	s	n	34
10	2662323 G	F	B	38	n	s	n	25
1	13532261 G	F	B	31	n	s	n	30
12	13998890 B	M	B	65	n	s	n	42
13	13998672 C	M	B	32	n	n	n	32
14	3238126 I	M	A	55	n	s	n	21
15	33498387 I	F	B	36	s	s	n	32
16	13986422 I	M	B	71	n	n	n	8
17	13975894 C	M	B	45	n	n	n	30
18	13956661 H	M	O	19	n	s	n	29
19	14003705 H	F	B	43	s	n	n	36
20	13835696 G	M	B	60	n	n	n	14
21	14003705 H	F	B	43	s	s	n	26
22	13858430 A	F	N	31	s	s	n	33
23	3239377 B	M	B	67	n	s	n	24
24	2500452 D	M	B	53	n	s	n	25
25	14007882G	F	B	54	s	n	n	41
26	13616389 G	M	B	59	n	n	n	15
27	14002817 D	M	O	50	n	s	n	32
28	33597107 F	M	O	56	n	n	n	24

continua

continuação

	RGHC	Sexo	Raça	Idade	Gestação	Transfusão prévia	Transplante prévio de órgão sólido	MELD funcional
29	14006631 C	M	O	41	n	n	n	25
30	13616732 B	F	B	55	n	s	n	33
31	13935817 D	M	B	40	n	s	n	29
32	13994674 J	M	O	51	n	n	n	25
33	13949270 B	M	N	46	n	n	n	21
34	13859866 I	F	O	53	s	n	n	26
35	14002124 J	M	O	57	n	n	n	34
36	13616748 D	M	B	61	n	n	n	9
37	15029437 C	M	B	29	n	n	n	18
38	13627928 B	M	B	56	n	n	n	24
39	14018005 E	F	O	26	n	n	n	41
40	15029437 C	M	B	29	n	s	n	45
41	3184279 F	F	B	55	n	s	s	20
41	13965983 I	M	B	52	n	n	n	17
43	3368500 B	M	O	26	n	n	n	19
44	13609227 K	M	N	55	n	s	n	24
45	14013325 A	M	B	63	n	s	n	42
46	2470837 I	F	O	54	s	n	n	35
47	13677935 E	M	B	40	n	n	n	37
48	13776331 I	M	B	35	n	n	n	32
49	13918073 H	F	B	33	n	n	n	7
50	13593682 I	F	B	48	s	s	n	15
51	13457683 H	M	B	66	n	n	n	9
52	13904292 J	M	B	57	n	n	n	8
53	13953581 J	M	B	60	n	n	n	12
54	13941733 I	F	N	19	n	n	n	42
55	14030016 G	M	B	34	n	s	n	42
56	13928284 A	M	B	57	n	n	n	10
57	13740903 G	M	B	40	n	s	n	40
58	13741712 H	F	B	58	s	n	n	14
59	13964948 J	M	O	53	n	n	n	7
60	15046269 C	F	B	31	n	n	n	12

continua

continuação

	RGHC	Sexo	Raça	Idade	Gestação	Transfusão prévia	Transplante prévio de órgão sólido	MELD funcional
61	13899278 D	F	B	30	n	n	n	6
62	14027796 C	F	B	33	n	n	n	31
63	14034249 K	M	B	51	n	n	n	23
64	3334502E	F	B	61	s	s	s	14
65	7038571I	M	B	56	n	n	n	12
66	13927130G	F	A	60	s	s	n	30
67	13983246K	M	B	60	n	n	n	17
68	13923838B	F	B	63	n	s	n	28
69	14034257J	M	B	50	n	s	n	24
70	3336127K	F	B	62	s	n	n	12
71	3379819K	M	B	67	n	s	n	17
72	14039122C	F	B	53	s	s	n	37
73	13740862F	M	B	59	n	s	n	23
74	13998674A	M	B	57	n	n	n	16
75	13892809B	F	B	57	n	s	n	35
76	14039215J	M	B	47	n	s	n	31
77	14018964G	M	O	48	n	n	n	38
78	14037986C	F	B	59	s	n	n	40
79	14045500I	M	B	51	n	s	n	35
80	14027373F	M	B	60	n	s	n	35
81	3381117I	F	B	41	s	s	n	37
82	14042702C	F	O	45	s	n	n	31
83	13985749K	M	B	38	n	n	n	10
84	2917301J	M	B	71	n	n	n	29
85	2494274C	F	B	57	n	n	n	8
86	2128347D	F	B	68	s	s	n	33
87	33608473H	M	B	61	n	s	n	44
88	13637410E	F	B	39	n	n	n	40
89	14018978K	F	O	67	s	n	n	22
90	14016074F	M	B	61	n	s	n	17
91	13942436B	F	O	47	n	s	n	18
92	14050310K	M	B	48	n	n	n	24

continua

continuação

	RGHC	Sexo	Raça	Idade	Gestação	Transfusão prévia	Transplante prévio de órgão sólido	MELD funcional
93	14020744K	F	B	50	n	s	n	16
94	13688044F	M	B	55	n	n	n	17
95	13609574I	M	N	72	n	s	n	12
96	13993806D	F	B	61	s	s	n	9
97	14045864H	M	B	44	n	s	n	33
98	2552135A	F	B	61	s	s	n	11
99	13802806D	F	B	63	s	s	n	23
100	14030499H	M	O	59	n	n	n	15
101	3200077K	M	B	70	n	n	n	10
102	13736045E	M	B	65	n	s	n	10
103	33609947J	F	O	41	n	n	n	45
104	3309945K	M	B	57	n	s	n	23
105	13875150J	M	A	68	n	n	n	8
106	14020741C	M	B	50	n	s	n	32
107	13800635C	M	B	59	n	n	n	9
108	13997334H	M	O	52	n	n	n	16
109	33535367D	F	B	39	n	s	n	41
110	6062064E	M	N	28	n	n	n	17
111	13810145C	F	B	21	n	n	n	43
112	4063709A	M	B	52	n	n	n	29
113	14023552C	F	B	35	s	s	n	28
114	13841743B	M	O	67	n	n	n	24
115	2656460B	M	B	68	n	s	n	38
116	14015946D	F	B	62	s	s	n	22
117	13570172D	M	B	43	n	s	n	19
118	4011005G	M	B	60	n	s	n	28
119	15070002D	M	B	52	n	n	n	11
120	13790147D	F	B	59	s	n	n	11
121	14061789I	F	B	46	s	n	n	10
122	13491814D	M	B	59	n	s	n	18
123	14016277F	F	B	54	s	s	n	25
124	13639354E	M	B	52	n	n	n	17

continua

conclusão

	RGHC	Sexo	Raça	Idade	Gestação	Transfusão prévia	Transplante prévio de órgão sólido	MELD funcional
125	14022711B	F	B	64	s	s	n	25
126	13756776J	F	O	42	s	s	n	32
127	13639354E	M	B	52	n	s	n	16
128	14038436K	M	B	36	n	s	n	30
129	13980089H	F	O	26	s	s	n	42

Caso	Diálise	Doador	Idade do doador	Sexo do doador	Transplante prévio de fígado	Transplante Duplo	Rejeição	Sensibilização	DSA	HLA COMPATÍVEL
1	n	falecido	43	F	N	N	N	N	N	N
2	s	falecido	12	F	S	N	N	N	N	N
3	n	falecido	52	F	N	N	N	S	N	S
4	n	falecido	48	M	N	N	N	S	N	N
5	n	falecido	33	F	N	N	S	N	N	N
6	s	falecido	36	M	N	N	S	S	N	N
7	n	falecido	40	M	N	N	N	N	N	N
8	n	falecido	22	M	S	N	N	N	N	N
9	s	falecido	22	F	S	N	N	S	S	N
10	n	falecido	50	M	N	S	N	N	N	S
1	n	falecido	6	M	N	N	N	N	N	N
12	s	falecido	26	F	N	N	N	N	N	N
13	n	falecido	51	M	N	N	N	N	N	N
14	n	falecido	23	M	S	N	N	N	N	N
15	n	falecido	35	F	N	N	S	N	N	S
16	n	falecido	17	M	N	N	N	N	N	N
17	n	falecido	55	M	N	N	N	N	N	N
18	n	falecido	17	M	S	N	N	N	N	N
19	s	falecido	19	M	N	N	N	S	N	N
20	n	falecido	46	M	N	N	S	N	N	N
21	n	falecido	24	M	S	N	N	S	N	N
22	n	falecido	23	F	S	N	S	N	N	N
23	n	falecido	35	M	S	N	N	N	N	N
24	n	falecido	55	F	N	N	N	N	N	N
25	n	falecido	53	F	N	N	N	S	N	N
26	n	falecido	65	F	N	N	N	S	N	N
27	s	falecido	39	M	N	N	S	N	N	N
28	n	falecido	59	M	N	N	N	N	N	N
29	n	falecido	52	M	N	N	N	N	N	S
30	n	falecido	42	F	N	N	N	N	N	N
31	s	falecido	19	F	N	N	N	N	N	N
32	n	falecido	39	M	N	N	N	N	N	N
33	n	falecido	28	F	N	N	N	N	N	N
34	n	falecido	31	F	N	N	N	N	N	N
35	n	falecido	49	M	N	N	S	N	N	N

continua

continuação

Caso	Diálise	Doador	Idade do doador	Sexo do doador	Transplante prévio de fígado	Transplante Duplo	Rejeição	Sensibilização	DSA	HLA COMPATÍVEL
36	n	falecido	35	M	N	N	N	N	N	N
37	n	falecido	49	F	N	N	N	N	N	N
38	n	falecido	26	F	N	S	N	S	N	N
39	n	falecido	18	M	N	N	N	N	N	N
40	s	Falecido	41	F	S	N	N	S	N	N
41	n	falecido	53	F	N	N	S	S	N	S
41	n	vivo	44	M	N	N	N	N	N	S
43	n	vivo	22	M	N	N	N	N	N	X
44	n	falecido	38	M	N	N	N	S	S	N
45	s	falecido	62	F	N	N	N	N	N	N
46	s	falecido	38	M	N	N	N	S	N	S
47	n	falecido	33	F	N	N	N	N	N	N
48	n	falecido	51	F	N	N	N	N	N	N
49	n	falecido	18	F	N	N	N	S	N	N
50	n	falecido	9	M	N	N	N	S	S	S
51	n	falecido	58	M	N	N	N	N	N	N
52	n	falecido	21	F	N	N	N	N	N	N
53	n	falecido	31	M	N	N	N	N	N	N
54	n	falecido	43	M	N	N	N	N	N	N
55	n	falecido	50	M	N	N	S	N	N	N
56	n	falecido	24	M	N	N	N	N	N	N
57	n	falecido	49	F	S	N	S	S	N	N
58	n	vivo	37	M	N	N	N	N	N	X
59	n	falecido	56	M	N	N	N	N	N	N
60	n	vivo	29	F	N	N	N	N	N	S
61	n	falecido	37	F	N	N	S	N	N	N
62	n	falecido	44	F	N	N	N	N	N	N
63	n	falecido	25	M	N	N	N	N	N	X
64	n	falecido	19	M	N	N	S	N	N	N
65	n	falecido	50	F	N	N	N	N	N	N
66	n	falecido	14	M	S	N	N	S	N	N
67	n	falecido	36	F	N	N	N	S	N	N
68	s	falecido	26	F	S	N	N	S	N	N
69	n	falecido	52	F	N	N	N	N	N	N
70	n	vivo	31	M	N	N	N	S	X	X

continua

continuação

Caso	Diálise	Doador	Idade do doador	Sexo do doador	Transplante prévio de fígado	Transplante Duplo	Rejeição	Sensibilização	DSA	HLA COMPATÍVEL
71	n	falecido	18	F	N	S	N	N	N	N
72	n	falecido	52	F	N	N	N	N	N	N
73	n	falecido	55	M	N	S	N	N	N	N
74	n	falecido	46	M	N	N	N	N	N	N
75	s	falecido	47	F	N	N	N	S	N	N
76	n	falecido	29	M	S	N	N	S	S	N
77	s	falecido	31	M	N	N	N	S	N	N
78	s	falecido	33	F	N	N	N	S	N	N
79	s	falecido	56	M	N	N	N	S	S	N
80	n	falecido	56	M	N	S	N	N	N	N
81	s	falecido	26	M	S	S	N	N	N	N
82	n	falecido	60	F	N	N	S	S	N	N
83	n	falecido	68	M	N	N	S	S	N	N
84	n	falecido	40	M	N	N	N	N	N	N
85	n	falecido	7	M	N	N	N	S	N	X
86	n	falecido	31	M	N	N	N	S	S	N
87	s	falecido	40	F	N	N	N	S	S	X
88	n	falecido	35	M	N	N	N	S	N	N
89	n	falecido	23	M	N	N	N	N	N	N
90	n	falecido	42	F	N	N	N	N	N	X
91	n	falecido	40	F	N	N	S	S	S	N
92	n	falecido	55	F	N	N	N	N	N	N
93	n	falecido	38	F	N	N	N	S	N	N
94	n	falecido	56	F	N	N	N	S	N	N
95	n	falecido	54	M	N	N	N	S	N	N
96	n	falecido	10	M	N	N	S	S	N	N
97	n	falecido	19	M	N	N	N	S	N	N
98	n	falecido	42	M	N	N	N	S	S	N
99	s	falecido	54	M	N	S	N	S	S	N
100	n	falecido	54	F	N	N	N	N	N	N
101	n	falecido	17	M	N	N	N	N	N	S
102	n	falecido	54	M	N	N	N	N	N	N
103	s	falecido	26	M	N	N	S	S	N	N
104	n	falecido	31	M	N	N	N	N	N	N
105	n	falecido	35	M	N	N	N	N	N	N

continua

conclusão

Caso	Diálise	Doador	Idade do doador	Sexo do doador	Transplante prévio de fígado	Transplante Duplo	Rejeição	Sensibilização	DSA	HLA COMPATÍVEL
106	n	falecido	52	M	N	N	N	S	N	N
107	n	falecido	49	F	N	N	N	S	X	X
108	n	falecido	22	M	N	N	S	N	N	N
109	s	falecido	31	M	N	N	N	S	X	X
110	n	falecido	45	F	N	N	N	N	N	N
111	s	falecido	19	M	N	N	N	S	N	N
112	n	falecido	20	M	N	N	N	N	N	N
113	s	falecido	17	F	N	N	N	N	N	N
114	n	falecido	52	M	N	S	N	N	N	N
115	n	falecido	22	M	N	N	N	N	N	N
116	n	falecido	22	M	S	N	N	N	N	N
117	n	falecido	62	F	N	N	N	N	N	N
118	s	falecido	23	M	S	N	N	N	N	N
119	n	falecido	28	M	N	N	N	N	N	X
120	n	falecido	6	M	N	N	N	N	N	N
121	n	vivo	X	M	N	N	N	N	N	X
122	n	falecido	18	M	N	N	N	N	N	N
123	n	falecido	43	M	N	N	N	S	S	N
124	n	vivo	X	M	N	N	N	N	N	X
125	s	falecido	43	M	N	S	N	N	N	N
126	n	falecido	52	M	N	N	S	S	S	N
127	n	falecido	33	M	S	N	N	N	N	N
128	n	falecido	52	M	N	N	N	N	N	N
129	s	falecido	8	F	N	S	N	N	N	N