

**JENAINÉ OLIVEIRA PAIXÃO**

**Avaliação do efeito da dessensibilização com imunoglobulina polivalente sobre o perfil de anticorpos anti-hla e a incidência de transplantação de pacientes hipersensibilizados candidatos a transplante renal com doador falecido.**

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

Programa de concentração: Nefrologia

Orientadora: Dra. Maria Cristina Ribeiro de Castro

São Paulo

2020

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Paixão, Jenaine Oliveira

Avaliação do efeito da dessensibilização com imunoglobulina polivalente sobre o perfil de anticorpos anti-HLA e a incidência de transplantação de pacientes sensibilizados candidatos a transplante renal com doador falecido / Jenaine Oliveira Paixão. -- São Paulo, 2020.

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

Programa de Nefrologia.

Orientadora: Maria Cristina Ribeiro de Castro.

Descritores: 1.Transplante de rim 2.Antigenos HLA 3.Dessensibilização imunológica 4.Rejeição de enxerto 5.Doadores falecidos 6.Anticorpos 7.Painel de reatividade de anticorpos

USP/FM/DBD-319/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Dedico esta tese a todos os pacientes em terapia renal substitutiva, vencedores em batalhas diárias pela vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, minha base, meu norte e minha força.

À Prof Maria Cristina Ribeiro de Castro, pela excelência em sua trajetória profissional, por inspirar diariamente meu crescimento científico e pessoal e pela excepcional orientação na elaboração desta tese.

Aos amigos da Pesquisa Clínica da Urologia, em especial à Fabiana Agena pelo suporte e apoio, sempre disponível e disposta a compartilhar seu imenso conhecimento em pesquisa clínica.

À equipe do Laboratório de Imunologia do INCOR, em especial à Gislene Bezerra, por auxiliar no levantamento de todos os dados imunológicos.

Ao Serviço de Pós-Graduação da Nefrologia, Eliana e Pedro, a conclusão deste trabalho não seria possível sem o apoio de vocês. Obrigada pela disponibilidade, agilidade e gentileza com que sempre me atenderam.

Aos colegas do Serviço de Nefrologia do Hospital das Clínicas da UFMG, pelo apoio, compreensão e estímulo, imprescindíveis durante todo o processo.

Ao amigo Luiz Roberto, companheiro nesta jornada, pelo apoio nas horas difíceis e por sua alegria em todos os momentos, fundamentais para que eu seguisse em frente.

À minha família,

A meus pais, exemplos de amor, força, perseverança e fé.

Ao meu pai, Eudes Helino da Silva, minha inspiração no enfrentamento dos obstáculos da vida. Obrigada por seu exemplo de ética, honestidade, força, perseverança e fé.

À minha mãe, Maria Dunalva Oliveira da Silva, por todo o seu amor e dedicação, por me ensinar o sentido de família e pelo apoio nos cuidados com a Estela durante esta jornada.

Às minhas irmãs, minhas primeiras e melhores amigas, obrigada por me apoiar e incentivar sempre.

Ao meu marido, Leonardo Carvalho da Paixão, amor da minha vida, por me apoiar e incentivar sempre, por ser um exemplo inspirador de profissional e um pai maravilhoso.

À minha pequena Estela, meu milagre, meu amor e minha felicidade.

*“O conhecimento emerge apenas através da invenção e da reinvenção, através da inquietante, impaciente, contínua e esperançosa investigação que os seres humanos buscam no mundo, com o mundo e uns com os outros”.*

*Paulo Freire*

## NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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 Annelise Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3 ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2011.

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

## SUMÁRIO

**Lista de Abreviaturas**

**Lista de Figuras**

**Lista de Tabelas**

**Resumo**

**Abstract**

<b>1 - INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Imunologia e transplante de órgãos</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Alorreconhecimento</b>	<b>4</b>
<b>1.3 A rejeição no transplante renal</b>	<b>7</b>
<b>1.4 Rejeição celular</b>	<b>8</b>
<b>1.5 Rejeição mediada por anticorpos</b>	<b>10</b>
<b>1.6 O problema da sensibilização no brasil e no mundo.</b>	<b>12</b>
<b>1.7 O processo de sensibilização</b>	<b>13</b>
<b>1.8 Estratégias para o aumento do acesso ao transplante de pacientes sensibilizados.</b>	<b>14</b>
<i>1.8.1 Sistemas de Alocação de órgãos</i>	<b>14</b>
<i>1.8.2 Doação pareada</i>	<b>19</b>
<i>1.8.3 Protocolos de dessensibilização</i>	<b>19</b>
<b>1.9 Novas perspectivas terapêuticas em dessensibilização</b>	<b>24</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Objetivo principal</b>	<b>29</b>
<b>2.2 Objetivos secundários</b>	<b>29</b>
<b>3. PACIENTES E MÉTODOS</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Estudo imunológico</b>	<b>34</b>
<i>3.1.1 Avaliação da resposta humoral</i>	<b>35</b>
<b>3.2 Estudo histológico</b>	<b>36</b>
<i>3.2.1 Imunofluorescência indireta para C4d</i>	<b>36</b>
<i>3.2.2 Immunoperoxidase para C4d</i>	<b>37</b>
<b>3.3 Análise estatística</b>	<b>37</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Resultados relativos à dessensibilização</b>	<b>43</b>

<i>4.1.1 Impacto da dessensibilização sobre a transplantabilidade</i>	<b>43</b>
<i>4.1.2 Impacto da dessensibilização sobre o cPRA e os anticorpos anti-HLA</i>	<b>46</b>
<i>4.1.3 Fatores que impactaram no acesso ao transplante</i>	<b>54</b>
<i>4.1.4 Desfechos dos pacientes que não chegaram ao transplante</i>	<b>56</b>
<i>4.1.5 Eventos adversos associados à dessensibilização</i>	<b>58</b>
<b>4.2 Resultados relativos aos transplantes realizados pós-dessensibilização</b>	<b>59</b>
<i>4.2.1 Análise dos anticorpos específicos contra o doador</i>	<b>60</b>
<i>4.2.2 Sobrevida dos pacientes e causas de óbito</i>	<b>64</b>
<i>4.2.3 Sobrevida do enxerto e causas de perda</i>	<b>68</b>
<i>4.2.4 Complicações infecciosas pós-transplante</i>	<b>73</b>
<i>4.2.5 Rejeição: tipos e impacto na evolução do transplante</i>	<b>74</b>
<b>4.3 Análise comparativa de sobrevida dos pacientes quanto à priorização e à transplantação</b>	<b>78</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>81</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>88</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	<b>89</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO II</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO III</b>	<b>102</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AACE - Anticorpos anticélula endotelial
- ABTO - Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
- APC - Células apresentadoras de antígenos
- ATG - Imunoglobulina antitimócitos
- AVCh - Acidente vascular cerebral hemorrágico
- CAPPesq - Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
- CDC - *Complement Dependent Cytotoxicity*
- cPRA- *Calculated Panel Reactive Antibody*
- DRC - Doença renal crônica
- DS - Dessensibilização
- DSA - *Donor Specific Antibodies*
- DTAB - Brometo de dodeciltrimetilamônio
- EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid
- FCXM - *Flow cytometry crossmatch*
- FMUSP - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- HLA - *Human Leucocyte Antigens*
- iDSA - *Donor Specific Antibody (immunodominant)*
- IF - Imunofluorescência
- IP- Imunoperoxidase
- IVIg - Imunoglobulina humana polivalente
- KAS - *Kidney Allocation System*
- KDRI - *Kidney Donor Risk Index*
- MDRD - *Modification of Diet in Renal Disease*
- MFI - *Mean Fluorescence Intensity*
- MHC - *Major Histocompatibility Complex*
- MICA - *MHC class I chain-related antigen A*
- MiHA - *Minor histocompatibility antigen*
- NK - *Natural Killer*
- PCR - *Polymerase Chain Reaction*
- PCR-SSP - *Polymerase Chain Reaction- Sequence Specific Primers*

PF - Plasmaferese

PRA - *Panel Reactive Antibody*

PTLD - *Posttransplant Lymphoproliferative Disease*

RAMA - Rejeição aguda mediada por anticorpos

RCMA - Rejeição crônica mediada por anticorpos

SAPE - Solução de estreptavidina conjugada com ficoeritrina

SBN - Sociedade Brasileira de Nefrologia

SES/MG - Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais

SES/SP - Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo

SNT - Sistema Nacional de Transplantes

TCE - Traumatismo crânio-encefálico

TCR - *T cell receptor*

TFG - Taxa de filtração glomerular

Th1 - *T helper 1*

Th2 - *T helper 2*

TNF - *Tumor necrosis factor*

UNOS - *United Network for Organ Sharing*

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

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Pacientes incluídos no estudo.....	40
<b>Figura 2:</b> Número de transplantes ao longo do acompanhamento.....	44
<b>Figura 3:</b> Relação temporal do início da TRS, início da IVIg e transplante em meses .....	45
<b>Figura 4:</b> Curva de Kaplan-Meyer demonstrando o impacto da priorização sobre o tempo em lista dos pacientes.....	46
<b>Figura 5:</b> Pacientes incluídos na análise da dinâmica dos anticorpos.....	47
<b>Figura 6:</b> Representação das médias $\pm$ 1 DP do impacto da dessensibilização sobre o cPRA. A: Todos os pacientes B: Pacientes que transplantaram C: Pacientes que permaneceram em lista.....	48
<b>Figura 7:</b> Evolução da somatória do número de Ac em todos os pacientes (n=30).....	51
<b>Figura 8:</b> Evolução da somatória do número de Ac dos pacientes que transplantaram (n=11).....	51
<b>Figura 9:</b> Evolução da somatória do número de Ac pacientes que permaneceram em lista (n=19).....	52
<b>Figura 10:</b> Correlação doses de IVIg e evolução MFI dos anticorpos....	53
<b>Figura 11:</b> Causas de óbitos dos pacientes que permaneceram em lista para transplante.....	57
<b>Figura 12:</b> Sobrevida dos pacientes que permaneceram em lista comparada à sobrevida geral dos pacientes do estudo.....	58
<b>Figura 13:</b> Sobrevida dos pacientes que permaneceram em lista, comparando-se os priorizados com os não priorizados por falência de acesso vascular.....	58
<b>Figura 14:</b> Evolução dos DSA antes e após a dessensibilização.....	61
<b>Figura 15:</b> Evolução dos IDSA antes e após a dessensibilização .....	64
<b>Figura 16:</b> Média $\pm$ 1 Desvio padrão para pré e pós DS – iDSA .....	64
<b>Figura 17:</b> Sobrevida geral dos pacientes do estudo durante o período de acompanhamento.....	65

<b>Figura 18:</b> Sobrevida dos pacientes que transplantaram: pacientes com rejeição.....	66
<b>Figura 19:</b> Sobrevida dos pacientes que transplantaram: pacientes com RAMA vs sem RAMA.....	66
<b>Figura 20:</b> Sobrevida dos pacientes que transplantaram: com rejeição celular vs sem rejeição celular.....	67
<b>Figura 21:</b> Sobrevida dos pacientes que transplantaram: priorizados vs não priorizados .....	68
<b>Figura 22:</b> Sobrevida do enxerto censurada para óbito: com rejeição vs sem rejeição.....	69
<b>Figura 23:</b> Sobrevida censurada para óbito dos enxertos sem rejeição vs rejeição celular.....	70
<b>Figura 24:</b> Sobrevida censurada para óbito dos enxertos, comparando-se pacientes sem RAMA vs com RAMA.....	70
<b>Figura 25:</b> Sobrevida censurada para óbito dos enxertos, comparando-se pacientes priorizados vs não priorizados. ....	71
<b>Figura 26:</b> Causas de perda do enxerto renal .....	72
<b>Figura 27:</b> Infecções precoces após o transplante renal.....	73
<b>Figura 28:</b> Curvas de sobrevida, comparando-se pacientes priorizados e não priorizados, que transplantaram e que permaneceram em lista.....	79
<b>Figura 29:</b> Causas dos óbitos dos pacientes do estudo.....	80

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Dados demográficos.....	42
<b>Tabela 2:</b> Impacto da dessensibilização sobre os valores percentuais médios do cPRA .....	48
<b>Tabela 3:</b> Médias e desvios padrão para pré e pós DS – todos os pacientes.....	49
<b>Tabela 4:</b> Número médio de anticorpos (Classe I e Classe II), divididos em categorias de MFI, pré e pós dessensibilização.....	50
<b>Tabela 5:</b> Índices de correlação e <i>p-value</i> para doses de IVIg e as médias e somatório de MFI.....	53
<b>Tabela 6:</b> Análise de Regressão Logística Univariada dos possíveis fatores que impactaram o acesso dos pacientes ao transplante.....	54
<b>Tabela 7:</b> Odds Ratio da Análise Univariada dos possíveis fatores que impactaram o acesso dos pacientes ao transplante.....	55
<b>Tabela 8:</b> Modelo Inicial da Regressão Logística Múltipla.....	56
<b>Tabela 9:</b> Modelo Final da Regressão Logística Múltipla.....	56
<b>Tabela 10:</b> <i>Odds Ratio</i> das variáveis do modelo Final da Regressão Logística Múltipla.....	56
<b>Tabela 11:</b> Dados dos doadores.....	59
<b>Tabela 12:</b> Variação do MFI-DSA pré DS e no momento do TX.....	61
<b>Tabela 13:</b> Impacto da dessensibilização sobre o MFI dos iDSA.....	63
<b>Tabela 14:</b> Avaliação da função do enxerto renal dos pacientes que transplantaram e evoluíram com e sem rejeição.....	72
<b>Tabela 15:</b> Distribuição dos episódios de rejeição.....	74
<b>Tabela 16:</b> Características dos pacientes que transplantaram em relação à rejeição.....	76
<b>Tabela 17:</b> Tratamento e resposta dos episódios de rejeição (celular, RAMA, RCMA e mista) .....	77
<b>Tabela 18:</b> Ocorrência de rejeição por número de DSA no momento do transplante.....	78

## RESUMO

Paixão, JO. Avaliação do efeito da dessensibilização com imunoglobulina polivalente sobre o perfil de anticorpos anti-HLA e a incidência de transplantação de pacientes sensibilizados candidatos a transplante renal com doador falecido. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2020.

**INTRODUÇÃO** Dentre as opções de terapia renal substitutiva disponíveis atualmente, o transplante renal apresenta melhores resultados em termos de sobrevida, qualidade de vida e menores custos. Entretanto, a escassez de órgãos e o número crescente de pacientes com DRC contribuem para o aumento do tempo de espera em lista, com elevadas taxas de mortalidade desses pacientes. Em comparação com os pacientes não sensibilizados, aqueles com anticorpos anti-HLA apresentam uma desvantagem significativa no sistema de alocação, permanecendo na lista de espera por mais tempo, com altas taxas de mortalidade e morbidade, principalmente em países onde não há sistema de alocação específico para pacientes altamente sensibilizados. A redução dos anticorpos anti-HLA, por meio de tratamento imunomodulador, mostrou-se eficiente e segura nos transplantes com doadores vivos. Os resultados da adoção de apenas IVIG para aumentar o acesso a transplantes com doador falecido em pacientes altamente sensibilizados são mostrados aqui. **PACIENTES E MÉTODOS:** esta análise retrospectiva avaliou pacientes sensibilizados, inscritos para transplante renal com um doador falecido, apresentando muitos CDC-XM positivos de células T e / ou B no WL e que foram submetidos a um protocolo de dessensibilização (DS), usando IVIg 2g / kg / mês, de janeiro de 2003 a dezembro de 2013, e seguido ao longo de  $58,9 \pm 22,9$  meses. Os pacientes estavam em terapia de substituição renal por uma média de  $91 \pm 60$  meses, quando IVIg foi iniciado. Os transplantes foram liberados com o primeiro doador apresentando CDC-XM de células T e B negativas. **RESULTADOS:** Dos 45 pacientes avaliados, 6 pacientes foram excluídos (3 pacientes obtiveram doador vivo e 3 não completaram o mínimo de três doses de IVIG). Dos 39 pacientes restantes, 14 (35,9%) foram transplantados no seguimento médio de  $58,9 \pm 22,9$  meses, 9 (64,3%) apresentando anticorpos específicos do doador A, B ou DR (DSA). O tempo médio no WL antes do MD foi de  $75 \pm 41$  meses e após o MD foi de  $20 \pm 11$  meses ( $p < 0,01$ ) para aqueles que vão ser transplantados. A terapia com IVIg resultou em uma diminuição na classe média I ( $78,38 \pm 25,99$  vs.  $69,54 \pm 31,18$ ,  $p = 0,0074$ ) e na classe II ( $74,36 \pm 27,50$  vs.  $61,79 \pm 36,26$ ,  $p = 0,04$ ). Houve uma diminuição significativa no número de anticorpos anti-HLA antes e após DS: em MFI até 1500 ( $10,67 \pm 10,60$  a  $3,67 \pm 8,57$ ,  $p = 0,0002$ ) e em MFI entre 5000 e 10000 ( $16,9 \pm 10,8$  a  $13,2 \pm 11,2$ ,  $p = 0,004$ ). O número médio de infusões IVIg foi de  $10 \pm 11$  durante o seguimento. Houve uma redução significativa no DSA imune dominante (iDSA) dos pacientes que transplantaram com anticorpos anti-doador específicos ( $3615,33 \pm 1514$  vs.  $2020 \pm 1299$ ,  $p = 0,03$ ). Pacientes com prioridade de transplante por falha de acesso para diálise apresentaram maiores taxas de transplante do que aqueles sem prioridade: 70% vs 21% ( $p < 0,003$ ). O seguimento

médio após o transplante foi de  $18,18 \pm 16,67$  meses. Em 60 meses, não diferença entre a sobrevida dos pacientes que transplantaram e a dos que permaneceram em lista: 71,43% vs 77%,  $p=0,320$ . Em ambos os grupos, a principal causa de óbito foi sepse relacionada ao acesso para diálise (71% no grupo 1 e 67% no grupo 2). A sobrevida dos pacientes que transplantaram foi de 93%, 85,71% e 78,57% no 1°, 2° e 3° ano consecutivamente. A sobrevida do enxerto censurada para óbito foi de 100% em 2 anos e 76,36% em 3 anos, sendo a nefropatia por BK (60%) a principal causa de perda de enxerto. A taxa de RAMA foi de 35,71% (tratados com aférese, Rituximabe e IVIG) com apenas 1 perda do enxerto devido à RCMA após 51 meses. Apenas os pacientes que foram enxertados com 2 ou mais DSA apresentaram ABMR (100 x 0%,  $p < 0,02$ ). A função renal (MDRD) foi semelhante em pacientes que progrediram com e sem rejeição. Não ocorreram efeitos colaterais graves relacionados ao uso de IVIg. CONCLUSÕES: Em resumo, propõe-se que a dessensibilização, utilizando apenas IVIg, é eficaz e segura na redução de anticorpos anti-HLA, reduzindo o tempo de espera para o transplante renal em pacientes altamente sensibilizados e sem perspectiva de um transplante com doador vivo, especialmente quando o paciente encontra-se priorizado em lista para transplante.

Descritores: Transplante de rim; Antígenos HLA; Dessensibilização imunológica; Rejeição de enxerto; Doadores falecidos; Anticorpos; Painel de reatividade de anticorpos.

## ABSTRACT

Paixão, JO. *Effect of polyvalent immunoglobulin on the profile of anti-HLA antibodies and the transplantation of sensitized renal transplant recipients with deceased donor*. [Thesis]. São Paulo, "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2020.

**INTRODUCTION:** Among the renal replacement therapy options currently available, kidney transplantation presents better results in terms of survival, quality of life and lower costs. However, the scarcity of organs and the growing number of patients with CKD contribute to the increase in waiting time on the list, with high mortality rates for these patients. Compared to non-sensitized patients, those with anti-HLA antibodies have a significant disadvantage in the allocation system, remaining on the waiting list for a longer time, with high mortality and morbidity rates, especially in countries where there is no specific allocation system for highly sensitized patients. The reduction of anti-HLA antibodies, using immunomodulatory treatment, proved to be efficient and safe in transplants with living donors. The results of adopting only IVIG to increase access to transplants with deceased donor in highly sensitized patients are shown here. **METHODS AND PATIENTS:** this retrospective analysis evaluated sensitized patients, enrolled for kidney transplantation with a deceased donor, presenting many positive T and/or B-cell CDC-XM on the WL and who underwent a desensitization (DS) protocol using IVIg 2g/kg/month, from 2003 to 2013, and followed over  $58,9 \pm 22,9$  months. Patients had been on renal replacement therapy for an average of  $91 \pm 60$  months when IVIg was initiated. Transplants were cleared with the first donor presenting a negative T and B-cell CDC-XM. **RESULTS:** Of the 45 patients evaluated, 6 patients were excluded (3 patients obtained a living donor and 3 did not complete the minimum of three doses of IVIG). Of the remaining 39 patients, 14 (35.9%) were transplanted during the FUT, 9 (64.3%) presenting A, B or DR donor specific antibodies (DSA). Mean time on the WL before DS was  $75 \pm 41$  months and after DS was  $20 \pm 11$  months ( $p < 0,01$ ) for those who get to be transplanted. IVIg therapy resulted in a decrease in mean class I ( $78.38 \pm 25.99$  vs.  $69.54 \pm 31.18$ ,  $p=0.0074$ ) and class II ( $74.36 \pm 27.50$  vs.  $61.79 \pm 36.26$ ,  $p=0.04$ ). There was a significant decrease in the number of anti-HLA antibodies, as expressed on single PRA before and after DS: on MFI up to 1500 ( $10.67 \pm 10.60$  to  $3.67 \pm 8.57$ ,  $p=0.0002$ ) and on MFI between 5000 and 10000 ( $16.9 \pm 10.8$  to  $13.2 \pm 11.2$ ,  $p=0.004$ ). The median number of IVIg infusions were  $10 \pm 11$  over the FUT. There was a significant reduction in the immune dominant DSA (iDSA) of the patients who transplanted with specific anti-donor antibodies ( $3615.33 \pm 1514$  vs.  $2020 \pm 1299$ ,  $p=0.03$ ). Patients with transplant on priority due to access failure for dialysis presented higher transplantation rates than those with no priority: 70% vs. 21% ( $p < 0.003$ ). Mean FUT after transplantation was  $18.18 \pm 16.67$  months. In 60 months, the overall patient survival was not different for patients who transplanted or not: 71.43% vs. 77%,  $p= 0,320$ . In both groups, the main cause of death was sepsis related to dialysis access (71% in group 1 and 67% in group 2). Patient

survival of transplanted patients was 93%, 85,71% and 78,57% at 1, 2 and 3 years. Death-censored graft survival was 100% at 2 years and 76,36% at 3 years, been BK nephropathy (60%) the main cause of graft loss. ABMR rate was 35.71% (treated with apheresis, Rituximab and IVIG), with one graft loss due to CAMR at 51 months. Only patients who were grafted with 2 or more DSA presented ABMR (100 vs. 0%,  $p < 0.02$ ). Renal function (MDRD) were similar in patients who progressed with and without rejection. No serious side effects related to IVIg use occurred. CONCLUSIONS: In summary, we propose that desensitization using only IVIG is effective and safe in decreasing anti-HLA antibodies, reducing the waiting time for kidney transplantation in highly sensitized patients that have no perspective of a living donor transplant, mainly in patients on priority.

Descriptors: Kidney transplant; HLA antigens; Desensitization; Graft rejection; Deceased donors; Antibodies; Panel reactive antibody.

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a doença renal crônica (DRC) tem sido considerada um problema de saúde pública em todo o mundo. A *National Kidney Foundation* analisou os dados do US Renal Data System (USRDS), evidenciando que cerca de 14,8% da população adulta nos EUA apresenta algum grau de perda de função renal. Existe uma estimativa de cerca de 30 milhões de adultos com doença renal crônica (DRC) naquele país e um gasto anual de cerca de \$100 bilhões em 2015 (1). Dentre as modalidades de terapia renal substitutiva, o transplante renal oferece melhor qualidade de vida e maior sobrevida aos pacientes, quando comparado à permanência em diálise (2). Segundo dados da Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO), o Brasil é hoje o segundo país que mais realiza transplantes renais no ocidente, e o primeiro quando se considera o financiamento público. O número de transplantes realizados aumentou na última década, passando de 4.656 procedimentos em 2010 para 6283 procedimentos realizados em 2019, um aumento de 26%. Paralelamente, houve um aumento progressivo do número de pacientes necessitando de terapia renal substitutiva nos últimos anos, passando de 54.523 pacientes em 2009 para 139.691 pacientes em 2019, um aumento 55.5%. Desses pacientes, 24,9% encontram-se inscritos em lista para transplante renal (3).

O Brasil realizou 6.283 transplantes renais em 2019. Entretanto, o número anual estimado de transplantes necessários no país seria de 12.510 procedimentos ao ano (3). Tais dados demonstram que o aumento da capacidade de transplantação no país não tem acompanhado o número crescente de pacientes em lista, evidenciando a necessidade de ampliação dos programas de transplante

renal, com aumento no número de procedimentos realizados anualmente. As principais dificuldades encontradas para o aumento dos transplantes renais no país são a elevada taxa de negativa de doação pelos familiares (43%), o baixo índice de notificação de morte encefálica e de aproveitamento dos órgãos captados e as limitações financeiras dos programas de transplante renal (3).

Em consequência, o tempo de espera em lista no Brasil é elevado, quando comparado ao de outros países. Dados da Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo (SES-SP) demonstraram que, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2015, o tempo médio de espera por um rim foi de 31,8 meses (4). Dentre os pacientes inscritos em lista, existe um grupo que apresenta tempo de espera médio por um órgão ainda maior: os sensibilizados. Pacientes sensibilizados são aqueles que, em consequência à exposição prévia a antígenos HLA (do inglês, *human leucocyte antigens*) heterólogos, por meio de hemotransfusões, gestações e/ou transplantes de órgãos sólidos, desenvolvem anticorpos anti-HLA. A expressão de tais anticorpos é demonstrada mediante o cPRA (do inglês, *panel reactive antibody*) e mensurada por meio de testes imunológicos baseados em citotoxicidade (CDC) ou em ensaios de fase sólida, como a citometria de fluxo, além do cálculo do cPRA (do inglês, *calculated panel reactive antibody*) por intermédio da aplicação de algoritmo que permite prever as chances do paciente apresentar provas cruzadas positivas, baseando-se no perfil de HLA populacional. O cPRA é apresentado por meio de valores percentuais, sendo os pacientes sensibilizados aqueles que apresentam valores superiores a zero. O percentual de cPRA utilizado para a definição de paciente hipersensibilizado varia na literatura, sendo adotado cPRA maior ou igual a 85% pelos países europeus (5) e cPRA maior ou igual a 80% nos EUA (6). No Brasil, o cPRA maior ou igual a 80% é o mais frequentemente utilizado.

Comparados aos pacientes não sensibilizados, pacientes que apresentam anticorpos anti-HLA possuem desvantagem significativa na alocação dos órgãos de doadores falecidos. Dados da casuística dos Estados Unidos, antes da alteração do sistema de alocação de órgãos implementada em 2014 naquele país, demonstravam uma taxa de transplantes de 6,5% ao ano para pacientes hipersensibilizados comparados aos 18 a 20% dos pacientes não sensibilizados, o que determina períodos de espera por um órgão compatível extremamente elevados (6).

É importante ressaltar que os pacientes em lista geralmente apresentam muitas comorbidades, o que determina elevadas taxas de mortalidade. No Brasil, a mortalidade anual dos pacientes inscritos em lista no ano de 2019 foi de 18,2% ao ano (7), sendo de 15% no Estado de São Paulo (4).

Diante de tal cenário, faz-se necessária a busca por estratégias que possibilitem o aumento do acesso à transplantação dos pacientes sensibilizados no país.

### **1.1 Imunologia e transplante de órgãos**

O transplante, para substituir a função de órgãos doentes é, atualmente, uma importante terapia médica. No entanto, na maioria dos casos, as respostas imunes adaptativas constituem o principal impedimento ao transplante bem-sucedido.

A relação entre a existência de anticorpos específicos contra o doador detectados pela prova cruzada positiva e desfechos renais desfavoráveis foi definitivamente estabelecida em 1969, quando Patel e Terasaki publicaram um estudo demonstrando que provas cruzadas positivas realizadas retrospectivamente, utilizando soros de receptores de transplantes renais com linfócitos dos seus

respectivos doadores, associavam-se a rejeições hiperagudas em 80% dos pacientes, com perda do enxerto renal nas primeiras 48h após o transplante (8). Estudos relacionados revelaram ainda que o risco de rejeição era maior quando a positividade da prova cruzada devia-se à presença de anticorpos contra antígenos HLA do doador. Surgia, então, o paradigma: não realizar transplantes de órgãos nos quais o receptor possuísse um ou mais anticorpos contra antígenos HLA do doador (9). Desde então, provas cruzadas têm sido utilizadas rotineiramente e, quando positivas, são consideradas contraindicação à transplantação, sendo este o melhor fator preditivo isolado de sobrevida do enxerto renal em curto prazo.

## 1.2 Alorreconhecimento

Quando um órgão proveniente de um indivíduo não idêntico é transplantado, inicia-se no receptor uma série de eventos imunológicos denominados resposta aloimune. A resposta aloimune inicia-se pelo reconhecimento dos aloantígenos pelos linfócitos T, o alorreconhecimento. Esse processo pode ocorrer de duas formas distintas:

- o alorreconhecimento direto através da ativação de linfócitos T do receptor por células apresentadoras de antígenos do doador, que deixam o enxerto e migram para tecidos linfoides secundários do receptor. O complexo peptídeo-molécula HLA do doador é reconhecido como não-próprio pelo TCR (do inglês, *T cell receptor*) do receptor e inicia-se o mecanismo primário de indução de citotoxicidade (9,14);

- o alorreconhecimento indireto no qual proteínas alogênicas são captadas por células apresentadoras de antígenos do receptor e apresentadas aos linfócitos T por moléculas do MHC (do inglês, *major histocompatibility complex*) próprias, desencadeando o processo citotóxico (9,14)

Mais recentemente, uma nova via de alorreconhecimento foi descrita: a via semidireta, que envolve o contato intercelular e a distribuição e captação de vesículas exossomais, como estímulos à resposta imunológica das células T (15).

Os genes responsáveis por codificar o MHC, chamado nos seres humanos de HLA, codificam os antígenos mais fortemente relacionados com o processo de alorreconhecimento (15-17). O MHC foi assim denominado devido a seu papel central na rejeição de enxertos. A frequência de células T específicas para qualquer molécula do MHC estranha é relativamente elevada, fazendo as diferenças nos loci do MHC serem o desencadeador mais potente da rejeição dos enxertos (18).

O loci HLA encontra-se no braço curto do cromossomo 6 e é a região mais polimórfica de todo o genoma humano. Os haplótipos HLA são transferidos dos pais por meio de herança mendeliana co-dominante. O HLA é dividido em duas classes: classe I, subdividido em A, B e C; e classe II, subdividido em DP, DQ e DR. As moléculas de HLA classe I são expressas em todas as células nucleadas do organismo e, geralmente, estão envolvidas na apresentação de pequenos antígenos (9 a 11 aminoácidos), como proteínas virais e fragmentos proteicos endógenos, para os linfócitos T CD8+. As moléculas de HLA de classe II são expressas pelas células apresentadoras de antígeno (APC), como células dendríticas, macrófagos, linfócitos B, células endoteliais, além de algumas células epiteliais, células musculares lisas e fibroblastos, que são capazes de apresentar antígenos após estímulos de citocinas específicas, como o TNF-alfa (do inglês,

*tumor necrosis factor*) e o interferon-gama (IFN-gama) (15,18).

As APCs são células capazes de processar peptídeos antigênicos, expondo-os por intermédio da molécula HLA classe II na superfície celular. Os antígenos HLA classe II são moléculas maiores (12 a 28 aminoácidos), derivadas de proteínas extracelulares nos linfócitos T CD4+. As citocinas liberadas em resposta aos diversos tipos de agressão determinam a hiperexpressão de moléculas HLA classe II nas células epiteliais e endoteliais, otimizando o alorreconhecimento (15,19).

Além dos antígenos HLA, outros peptídeos endógenos, conhecidos como complexo de histocompatibilidade menor (MiHA, do inglês minor histocompatibility antigen), são capazes de ocupar sítios de ligação de moléculas do MHC, sendo reconhecidos pelos linfócitos T CD8+, contribuindo para o processo de rejeição de enxertos. O MiHA é codificado no cromossomo Y, podendo induzir resposta aloimune quando um órgão proveniente de um doador masculino é transplantado em uma receptora feminina (19).

Os antígenos ABO são capazes de desencadear resposta imune nociva ao enxerto. Atualmente, transplantes ABO incompatíveis estão sendo realizados com ótimos resultados por meio da utilização de protocolos para a remoção dos anticorpos antes da realização do transplante (20, 21). Utilizando-se a estratégia de dessensibilização, cerca de 30% dos doadores vivos, que eram recusados no passado por incompatibilidade ABO, podem atualmente realizar a doação. Entretanto, os anticorpos podem retornar aos níveis pré-tratamento, aderir à microvasculatura e ativar o sistema complemento (apesar de geralmente eles não causarem injúrias ao endotélio), causando a rejeição do órgão (20, 21).

Os antígenos relacionados ao MHC classe I A (MICA, do inglês, *MHC class I chain-related antigen A*) e os antígenos relacionados ao MHC classe I B (MICB, do

inglês, *MHC class I chain-related antigen B*) são dois membros de uma família de genes divergentes do HLA classe I, situados próximos do HLA B no MHC, que codificam proteínas expressas na superfície de células endoteliais (21, 22). Tais genes apresentam natureza bastante polimórfica, o que reforça que os anticorpos presentes no soro de receptores são capazes de reagir contra esses antígenos e conduzir a um processo de rejeição, funcionando como alvos para a resposta imune celular e humoral (22, 23).

Outro sistema não-HLA envolvido nos processos de alorreconhecimento é o sistema VEC (do inglês, *vascular endothelial cell*). Os anticorpos direcionados contra o sistema VEC são denominados anticorpos anticélula endotelial (ACE), e inicialmente foram associados a doenças autoimunes, por sua associação com as vasculites. Similarmente aos anticorpos anti-HLA, os ACE são capazes de desencadear reações de hiperreatividade vascular e microinflamação, aumento de expressão de moléculas de adesão, incremento de mecanismos pró-coagulantes e apoptose celular, que culminam no remodelamento vascular, vasculopatia obliterativa e fibrose tissular. Tais alterações constituem a reação tissular às agressões imunomediadas (24, 25).

### **1.3 A Rejeição no transplante renal**

A introdução de drogas imunossupressoras mais potentes na década de 1980, como os inibidores de calcineurina, e os avanços na imunologia do transplante promoveram alterações nas características da rejeição de enxertos ao longo dos anos. No início dos anos 1960, alterações clínicas, como febre, além de dor e inchaço no enxerto, eram frequentes nos diagnósticos de rejeição aguda.

Atualmente, tais alterações são praticamente inexistentes, sendo a elevação da creatinina um marcador diagnóstico isolado frequente, não se podendo deixar de mencionar os casos de rejeição subclínica, diagnosticados apenas pela biópsia renal. Entretanto, os episódios de rejeição que ocorrem atualmente costumam ser mais severos e, infelizmente, as taxas de sobrevida dos enxertos no longo prazo mantêm-se praticamente inalteradas (26).

#### 1.4 Rejeição celular

Após o processo de alorreconhecimento, os linfócitos T citotóxicos CD8+ são ativados pelos antígenos HLA de classe I, dando início à expansão clonal de células alorreativas, que induzem à citotoxicidade, por meio da liberação de grânulos citotóxicos, perforinas e granzimas, que causam a apoptose e lise celular. Os linfócitos T auxiliares CD4+ são ativados pelos antígenos HLA classe II e iniciam a produção de citocinas (27). De acordo com seu perfil funcional e as citocinas produzidas, os linfócitos T auxiliares são classificados em Th1 (do inglês, *T helper 1*) e Th2. As células T auxiliares CD4+ Th1 produzem principalmente interleucina-2 (IL-2), responsável por potencializar o estímulo à expansão clonal de linfócitos T CD8+, estimular a produção de IFN-gama e de TNF-alfa e a imunidade celular pró-inflamatória por meio da ativação de monócitos, macrófagos e células NK (do inglês, *Natural Killer*). As células T auxiliares CD4+ Th2 regulam a ativação de linfócitos B, produzindo IL 4, IL5, IL10 e IL13, que, além de estarem envolvidas na resposta humoral, possuem função imuno-reguladora ou anti-inflamatória (27).

Aparentemente, quatro fenômenos regulatórios estão envolvidos na regulação da ativação clonal de linfócitos auxiliares Th1 e Th2. O IFN-gama inibe a

proliferação clonal de células Th2 e não de Th1, o que explica a maior presença de células com fenótipo Th1 em reações imunes em presença de INF-gama, como nos casos de rejeição. Outro fator envolvido é a população predominante de células apresentadoras de antígenos (APC) no processo de alorreconhecimento, capaz de ativar diferentemente células Th1 e Th2. Por exemplo, linfócitos B esplênicos parecem estimular a ativação de células Th2 e não células Th1, enquanto macrófagos e células dendríticas parecem estimular mais células Th1 e não Th2. A concentração de antígenos também parece desempenhar papel na determinação da população de células T auxiliares a ser estimulada, sendo a exposição à elevada carga antigênica associada com a inibição da proliferação de clones celulares Th1, mas não Th2. Por último, a resposta das células Th1 e Th2 à exposição prévia à IL2 é antagônica, sendo a produção de linfocinas e a proliferação das células Th1 inibidas por tal citocina, o que desvia a resposta imune predominantemente para o perfil Th2 (27).

O endotélio vascular desempenha um papel crítico na interface entre as células do parênquima do órgão transplantado e o sistema imune do receptor, sendo o alvo principal das agressões imunes após o transplante renal. As células endoteliais são responsáveis pela regulação do processo de diapedese das células imunes do receptor para o enxerto, mecanismo importante nos processos de rejeição (28). Utilizando moléculas de adesão expressas no endotélio do enxerto, os linfócitos T do receptor aderem ao endotélio e o atravessam. Uma vez que atingem o parênquima do órgão, eles proliferam no espaço intersticial e invadem as paredes dos túbulos renais, causando a tubulite. Ocorre ainda a produção de citocinas inflamatórias por tais células, que atraem mais leucócitos para a área. Os linfócitos T CD8+ citotóxicos atravessam a membrana basal dos túbulos, onde

proliferam e induzem a apoptose das células tubulares. As células tubulares lesadas podem transformar-se em miofibroblastos mesenquimais, promovendo a fibrose intersticial. A perpetuação de tais processos determina necrose do epitélio e da membrana basal tubular, culminando em atrofia intersticial progressiva e disfunção do enxerto (28, 29, 30).

### **1.5 Rejeição mediada por anticorpos**

Anticorpos contra as moléculas HLA, contra células endoteliais e contra antígenos dos grupos sanguíneos ABO são os mais frequentemente associados aos processos de rejeição mediada por anticorpos, que se inicia dias após a transplantação. A exposição aos antígenos do doador promove a formação de anticorpos capazes de ativar a cascata do complemento e lesar o enxerto, em uma reação que é potencializada nos casos de exposição prévia aos antígenos HLA apresentados pelo doador (29, 30).

Os alvos desses anticorpos são, inicialmente, as células do endotélio peritubular e glomerular do enxerto. O endotélio lesado libera moléculas que estimulam a agregação plaquetária, como o fator de Von Willebrand e P-selectina, interleucinas que estimulam a adesão dos linfócitos ao endotélio glomerular (causando a glomerulite) e peritubular (marginação e pericapilarite) e citocinas responsáveis pela ativação do sistema complemento. A formação do complexo de ataque à membrana desencadeada pela ativação do sistema complemento determina necrose e apoptose das células endoteliais, assim como o desprendimento das células endoteliais da membrana basal vascular, resultando em microtromboses, hemorragias e necrose da parede arterial nos casos mais

graves (29, 30).

O diagnóstico da rejeição aguda mediada por anticorpos, de acordo com os critérios do Banff 2013 (31), requer a apresentação de todos os três critérios diagnósticos:

- evidência histológica de injúria tecidual aguda (glomerulite ou capilarite peritubular, arterite intimal ou transmural, microangiopatia trombótica sem outra causa e injúria tubular aguda sem outra causa provável);
- evidência histológica de interação entre o endotélio e anticorpos, definido como pelo menos um dos achados: deposição de C4d padrão linear nos capilares peritubulares, inflamação microvascular (no mínimo moderada) e aumento na expressão de proteínas tissulares indicativas de injúria tecidual;
- detecção de DSA (do inglês, *donor-specific antibodies*), anti-HLA ou não, no soro do receptor.

O diagnóstico precoce da rejeição aguda mediada por anticorpos (RAMA) e a rápida instituição do tratamento são cruciais para o prognóstico do enxerto renal.

O processo de injúria tecidual da RAMA pode perpetuar e tornar-se crônico, determinando um prognóstico ruim para o enxerto. Redfield et al. estudaram 123 pacientes com diagnóstico de rejeição crônica mediada por anticorpos (RCMA) por cerca de nove anos e 76% dos pacientes haviam perdido o enxerto renal 1,9 anos após o diagnóstico, demonstrando o pobre prognóstico de tal condição (32).

Os critérios diagnósticos para a RCMA sobrepõem-se aos da forma aguda, diferindo quanto aos achados que evidenciam lesão tecidual crônica, sendo necessário ao menos um dos achados: glomerulopatia do transplante (na ausência de microangiopatia trombótica), proliferação das camadas da membrana basal dos capilares peritubulares, identificada à microscopia eletrônica, e achados de fibrose

da íntima arterial sem outra etiologia definida. Os achados referentes às evidências histológicas de interação entre o endotélio e anticorpos e referentes à detecção de C4d são os mesmos para as condições aguda e crônica (32).

### **1.6 O problema da sensibilização no Brasil e no mundo**

A sensibilização anti-HLA é hoje uma das principais barreiras para a realização e o sucesso do transplante de órgãos sólidos. O percentual de pacientes sensibilizados, aguardando por um órgão é considerável e crescente. Cerca de 30% dos pacientes inscritos em lista para transplante renal nos Estados Unidos apresentavam algum grau de sensibilização até 2014 (34). Tais pacientes apresentavam tempo de espera em lista prolongado, quando comparados a pacientes não sensibilizados, acumulando-se nas listas. Informações fornecidas pela SES/SP demonstram que 15,8% dos pacientes inscritos para transplante nesse estado apresentam cPRA acima de 80% (4). Em levantamento dos dados fornecidos pela Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais (SES/MG), observa-se que, dos 2828 pacientes ativos em lista atualmente, 34% apresentam algum grau de sensibilização (cPRA acima de 5%), enquanto 14% apresentam cPRA acima de 80% (35).

As estratégias para aumentar o acesso de tais pacientes à transplantação são, frequentemente, dispendiosas e não estão disponíveis em muitos centros transplantadores do país. No STR-HC-USP, os tratamentos de dessensibilização, utilizando imunoglobulina humana polivalente (IVIg), são realizados desde 2003. São encaminhados pacientes de diversas cidades brasileiras onde o tratamento não se encontra disponível, tornando a perspectiva de transplantação desses pacientes

precária. Geralmente, os pacientes encontram-se em terapia renal substitutiva há longos períodos, apresentam diversas comorbidades, complicações relacionadas à terapia renal substitutiva e dificuldades de acesso para diálise. Em nossa casuística, todos os pacientes que foram priorizados em lista por falência de acesso para diálise iniciaram o processo no STR-HC-USP, apesar de já apresentarem critérios para solicitação de priorização anteriormente. A IVIg utilizada foi, em geral, disponibilizada pelas centrais estaduais e setores responsáveis por medicação de alto custo, após justificativa médica.

### **1.7 O processo de sensibilização**

A sensibilização anti-HLA é hoje uma das principais barreiras para a realização e para o sucesso do transplante de órgãos sólidos. A formação de anticorpos anti-HLA de classe I e II decorre de eventos que determinam a exposição do paciente a antígenos HLA de outros indivíduos por transplantes prévios, gestações ou abortamentos e hemotransfusões. Tais anticorpos são capazes de ativar diferentes células, iniciar a resposta imune e contribuir para o processo de rejeição (29, 30, 34).

Os diferentes eventos sensibilizadores estimulam o sistema imunológico de maneiras e intensidades distintas. Estudo retrospectivo com 722 pacientes, publicado em 2017, demonstrou que transplantes prévios de órgãos sólidos são os eventos com maior potencial de aloimunização, particularmente para antígenos HLA de classe II, comparados a gestações e hemotransfusões. As gestações são mais associadas à aloimunização do que as hemotransfusões e associam-se, principalmente, ao aumento nas taxas de antígenos HLA de classe I (36).

A presença de anticorpos específicos pré-formados no receptor contra antígenos HLA do doador era, até há pouco tempo, uma contraindicação absoluta ao transplante, pelo risco elevado de desenvolvimento de RAMA, que ocorre dentro de minutos a horas (rejeição hiperaguda), dentro de poucos dias ou mesmo de forma indolente, e leva quase sempre à perda do enxerto (37,38).

Atualmente, são considerados transplantes imunologicamente incompatíveis os realizados entre doador e receptor com títulos elevados de isoaglutininas anti-ABO e/ou anti-HLA que cursam com prova cruzada positiva.

## **1.8 Estratégias para o aumento do acesso ao transplante de pacientes sensibilizados.**

### *1.8.1 Sistemas de Alocação de órgãos*

A alocação dos órgãos de doadores falecidos é realizada de maneira distinta nos diversos países. No Brasil, o Sistema Nacional de Transplantes (SNT), criado em 1997, é responsável pela gestão, regulamentação e monitorização dos transplantes de órgãos e tecidos realizados em todo o território nacional. A seleção dos potenciais receptores para fins de transplante de rim passou a ser processada mediante identidade no sistema ABO e por exame de histocompatibilidade, avaliando-se as incompatibilidades no sistema HLA entre doador e receptor (39, 40).

No sistema de alocação atualmente vigente no Brasil, as compatibilidades HLA são pontuadas, atribuindo-se 5 pontos para cada identidade DR, 2 pontos para cada identidade B e 0,5 ponto para cada identidade A, podendo o paciente pontuar

de 0 (zero) a 15 (quinze) por esses critérios (39,40).

Algumas outras condições também garantem pontuação, como idade inferior a 18 anos (4 pontos), tempo de espera em lista (1 ponto para o primeiro ano e 0,5 pontos para cada ano subsequente até o total de 5 pontos), diabetes (3 pontos) e nefrectomia por doação renal prévia (10 pontos). Os pacientes, que apresentam PRA classe I maior do que 80%, recebem 4 (quatro) pontos adicionais e os com PRA classe I entre 50% e 79% recebem 2 (dois) pontos adicionais em sua pontuação final (39,40).

Tal sistema de alocação garante eficiência e equidade na transplantação para a maioria dos pacientes, exceto para pacientes hipersensibilizados e homozigotos HLA-DR. De acordo com os dados da SES-SP de 2011, a transplantabilidade de pacientes com PRA maior do que 80% é 3,5 vezes menor do que dos paciente sem anticorpos anti-HLA (4). No mesmo período, nos pacientes listados no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), a frequência de pacientes com qualquer grau de sensibilização também foi de 25%. Em levantamento de dados da SES-SP realizado por Gerbase e colaboradores, referente ao período de 01/01/2002 a 31/12/2015, foram realizados 13.232 transplantes com órgãos provenientes de doadores falecidos no estado. Desses órgãos transplantados, apenas 3,4% foram recebidos por pacientes com cPRA maior ou igual a 80%, apesar desses pacientes corresponderem a 13,5% dos pacientes inscritos em lista naquele período. Dados do mesmo levantamento revelaram ainda que 22,6% dos pacientes com cPRA maior ou igual a 80% aguardavam por um órgão em lista há mais de sete anos (84 meses).

A busca por estratégias que tornem mais equânime a alocação dos órgãos provenientes de doadores falecidos é uma realidade em diversos países. Há 25

anos, o sistema Eurotransplant iniciou o *Eurotransplant Acceptable Mismatch Program*, o maior programa de acesso ao transplante renal direcionado aos pacientes sensibilizados. O objetivo do programa era aumentar o acesso à transplantação por meio da previsão de provas cruzadas positivas pelo método CDC. Após dois anos de espera em lista, os pacientes hipersensibilizados (PRA maior do que 85%) recebiam prioridade máxima no sistema de alocação e antígenos aceitáveis, aqueles contra os quais o paciente nunca desenvolveu anticorpos, eram definidos por laboratório de referência. Tal abordagem aumentava o número de potenciais doadores para os pacientes sensibilizados e, portanto, a sua chance de transplantação. Os resultados de dez anos da implementação do programa foram publicados em 2014, demonstrando que, entre 1989 e 2014, foram realizados mais de 1.000 transplantes de pacientes altamente sensibilizados, com sobrevida do enxerto em 10 anos comparável a dos transplantes realizados em não sensibilizados fora do programa. Estudo publicado recentemente demonstrou que a alocação baseada em antígenos aceitáveis resulta em sobrevida do enxerto significativamente superior em 10 anos, quando comparados a transplantes de pacientes hipersensibilizados realizados pelo sistema de alocação baseado na exclusão de antígenos inaceitáveis (*unacceptable mismatches*), atualmente adotado nos Estados Unidos (41).

Após mais de uma década de debates e utilizando-se da análise de modelos de simulação, o OPTN (do inglês *Organ Procurement and Transplantation Network*), nos Estados Unidos, aprovou, em dezembro de 2014, um novo sistema de alocação de rins, o KAS (do inglês *Kidney allocation system*), dando prioridade aos pacientes hipersensibilizados, por meio de pontuação diferenciada para os mesmos no sistema de alocação (42, 43).

No novo KAS, utiliza-se a classificação de risco do doador (KDRI, do inglês *kidney donor risk index*) e a estimativa de sobrevida do receptor (EPTS, do inglês *estimated posttransplant survival*). O objetivo é que órgãos de doadores que apresentem KDRI superior a 20% sejam destinados a receptores com EPTS também superior a 20%. A equidade do sistema baseia-se na priorização dos pacientes hipersensibilizados e no aumento do compartilhamento regional e nacional dos órgãos. Pontuação adicional é atribuída aos pacientes com cPRA maior do que 19%, sendo a priorização máxima atribuída localmente para pacientes com cPRA de 98%, regionalmente para pacientes com cPRA de 99% e nacionalmente para aqueles com cPRA de 100% (42, 43). Como resultado, após 12 meses de implementação do novo sistema, houve aumento de 366% nas taxas de transplantação de pacientes com cPRA de 99% e 100%, passando de 2,2% pré-KAS para 10,1% no fim de 2015. Pacientes com cPRA de 98% também dobraram a taxa de transplantação, passando de 1,2% para 2,4% no mesmo período. Observou-se ainda o aumento das sobrevidas média de pacientes (7%) e de enxertos (2,8%) com o novo sistema de alocação (44). À medida que tais pacientes eram transplantados, a proporção de transplantes destinados a esse grupo diminuiu, tendo atingido um equilíbrio próximo a 9%. O tempo médio de espera para pacientes com anticorpos cPRA 98% - 100% caiu de 19 anos pré-KAS para 3,2 anos após a implementação do KAS (45).

Estudos cristalográficos das moléculas dos antígenos HLA demonstraram que os anticorpos anti-HLA reagem com partes específicas da molécula antigênica, os epítomos, denominados “eplets”. Rene Duquesnoy observou que diferentes moléculas de HLA serão reconhecidas pelo mesmo anticorpo, se essas moléculas apresentarem um ou mais eplets em comum, reconhecidos por esse anticorpo.

Dessa forma, seriam considerados antígenos aceitáveis aqueles diferentes do próprio paciente e que não possuíssem eplets reconhecidos pelos anticorpos do receptor. A partir de tais descobertas, Duquesnoy et al. desenvolveram o HLA matchmaker, um programa de compatibilidade doador-receptor baseado em eplets (46). Na prática clínica, o programa tem sido adotado pelo sistema Eurotransplant no programa Eurotransplant Acceptable Mismatch para identificar doadores para pacientes hipersensibilizados. Outras possíveis aplicações clínicas do programa são a monitorização do desenvolvimento de anticorpos HLA clinicamente relevantes após o transplante renal e a análise da evolução de anticorpos em pacientes submetidos em protocolos de dessensibilização, nos quais a identificação da remoção de anticorpos epítipo-específicos pode aumentar as chances de identificação de um possível doador.

O programa HLA matchmaker é complexo e requer a criação de arquivos temporários e inserção manual dos resultados laboratoriais, o que demanda tempo e abre a possibilidade de ocorrência de erros humanos. Diante disso, em 2011, Semiramis do Monte et al. desenvolveram um software, o EpHLA, que automatiza e, dessa forma, simplifica a análise de epítopos aceitáveis e inaceitáveis com base no algoritmo HLA matchmaker (47). A implementação de tal programa permite uma análise simples e automatizada dos dados, utilizando o algoritmo HLA matchmaker, prevenindo os possíveis erros decorrentes do processamento manual dos dados. Baseado na tipificação HLA e nos resultados de ensaios de fase sólida, estratégias já amplamente utilizadas, é possível por meio do EpHLA gerar dados automaticamente que servirão de suporte para a equipe transplantadora, facilitando a definição mais acurada do risco de desenvolvimento de rejeição mediada por anticorpos e possibilitando o aumento do número de potenciais doadores para

pacientes hipersensibilizados. Esse processo tem sido usado na distribuição de órgãos para pacientes sensibilizados na região Nordeste do Brasil.

### *1.8.2 Doação pareada*

A doação pareada é uma alternativa para os pacientes hipersensibilizados que possuem doadores vivos incompatíveis é a doação renal pareada. Tal doação é realizada quando doadores de dois ou mais pares de doador-receptor são incompatíveis (tipo sanguíneo incompatível ou prova cruzada positiva) com seus receptores, podendo ocorrer os transplantes por meio da troca dos pares de doador-receptor. As novas duplas formadas podem apresentar prova cruzada negativa, ausência de anticorpos pré-formados (DSA) e estes, quando existentes, podem ocorrer em níveis mais baixos, demandando tratamentos para dessensibilização menos agressivos (21).

O primeiro transplante do tipo foi realizado em 2000, nos Estados Unidos, apesar de ter sido proposto, pela primeira vez, em 1986, por Rapaport (48). Programas de doação renal pareada bem estruturados existem em países como Canadá, Austrália, Holanda, Coreia do Sul, além dos Estados Unidos. Diversas questões éticas e legais estão envolvidas no desenvolvimento de tais programas, o que dificulta sua implementação e sua consolidação como alternativa para pacientes hipersensibilizados em todo o mundo. A estratégia da doação pareada ainda não é uma realidade brasileira.

### *1.8.3 Protocolos de dessensibilização*

A dessensibilização é um processo no qual terapias imunomodulatórias são administradas em candidatos a transplante renal com o objetivo de eliminar ou reduzir os níveis de anticorpos anti-HLA, que impedem a transplantação. Tal processo tem-se tornado uma alternativa terapêutica importante, aumentando as chances de transplantação dos pacientes sensibilizados.

O desenvolvimento de novas terapias imunomodulatórias, associadas ao refinamento das ferramentas de estratificação do risco imunológico, permitiu grandes avanços rumo à transposição da barreira imunológica aos transplantes. A reatividade imunológica do paciente é reduzida por meio de procedimentos, como a plasmaferese e medicações imunomoduladoras, como a Imunoglobulina Humana Polivalente (IVIg), e pelo efeito imunossupressor dirigido aos linfócitos B (Rituximabe) e/ou plasmócitos (Bortezomibe), citocinas (Tocilizumab) e outras. Novas drogas têm surgido como potenciais opções terapêuticas no processo de dessensibilização, como a IgG Endopeptidases (Ides), o Belimumase, o Eculizumabe, o Obinutuzumabe e Berinert (49).

Grande parte dos pacientes sensibilizados conseguem realizar um transplante com os protocolos de dessensibilização atuais, estando esses tratamentos disponíveis em vários centros de excelência no exterior, porém em apenas alguns centros transplantadores no Brasil. Os pacientes hipersensibilizados, quando não submetidos a tratamentos para dessensibilização, permanecem em lista de espera por longos anos, com risco crescente de morte em diálise e sem perspectivas de melhora de qualidade de vida. Os dados da literatura médica atual demonstram que pacientes sensibilizados submetidos à dessensibilização e transplantados, quando comparados a pacientes mantidos em diálise à espera de um doador HLA compatível, apresentam redução significativa na mortalidade (33,

34).

Entretanto, a imensa maioria dos dados que corroboram a eficácia dos tratamentos de dessensibilização são provenientes de estudos que contemplam predominantemente pacientes que possuem doadores vivos, excluindo-se parcela significativa dos pacientes hipersensibilizados, que aguardam por órgão proveniente de doadores falecidos.

As preparações comerciais de Imunoglobulina Humana Polivalente (IVIg) são compostos de Imunoglobulinas do isotipo G (IgG), confeccionados a partir do plasma de um “pool” de doadores humanos saudáveis. São geralmente compostas por 97% de IgG e apenas traços de IgM e IgA. As proporções de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 são comparáveis às do soro humano. Os mecanismos de ação da IVIg são complexos, envolvendo a modulação da expressão e funcionamento dos receptores Fc nas células efectoras, interferência na ativação das vias do complemento e na ação de citocinas inflamatórias por meio da estimulação do perfil Th2, fornecimento de anticorpos anti-idiotípicos, além de efeitos na ativação, diferenciação e funções efectoras de linfócitos T e B (50). Inicialmente utilizada no tratamento de imunodeficiências primárias e doenças autoimunes, seu efeito imunomodulador tem-se revelado extremamente importante no transplante dos pacientes hipersensibilizados.

A IVIg tem sido utilizada em diversos protocolos de dessensibilização, em receptores de transplantes HLA incompatíveis e no tratamento de episódios de RAMA. A dose utilizada nos diversos protocolos de dessensibilização varia de 100 mg/Kg (quando associada com plasmaferese) até 2g/kg e é usualmente administrada durante as sessões de hemodiálise ou em infusão lenta nos pacientes não dialíticos.

Poucos e raros são os efeitos colaterais relacionados à infusão dessa droga. Nos casos mais extremos, existem relatos de trombose vascular, meningite asséptica e anafilaxia grave (50, 53).

A utilização da IVIg como agente imunomodulador em protocolo de dessensibilização foi primeiro documentada em uma série de casos publicada em 2002 por Glotz et al.. Em tal estudo, 15 pacientes com cPRA maior que 50% ou com prova cruzada CDC positiva contra um doador vivo receberam três doses mensais de IVIg 2g/kg. A taxa de transplantação foi de 86,6%, sendo 11 transplantes com doadores falecidos e dois com doadores vivos, após negatização da prova cruzada. A sobrevida do enxerto após um ano foi de 61,5%, tendo dois pacientes perdido os enxertos por nefropatia por poliomavírus, uma perda por trombose do enxerto no pós-transplante imediato e uma perda por nefrotoxicidade dos inibidores da calcineurina. Apenas um paciente perdeu o enxerto após episódio de rejeição (51).

Em 2003, Jordan et al. avaliaram a resposta *in vitro* do tratamento com IVIg do soro de pacientes sensibilizados, como preditiva do resultado da dessensibilização com IVIg. Um total de 93% dos pacientes apresentou redução do PRA (candidatos a transplante com doador falecido) ou negatização da prova cruzada (candidatos com doador vivo), quando o soro foi tratado com IVIg. Três pacientes não obtiveram a resposta esperada e não foram submetidos à dessensibilização. Foram realizados 24 transplantes renais com doador vivo, após uma única dose de IVIg 2g/kg, e 16 transplantes com doador falecido (12 de rim, um de coração-fígado, um de coração-rim, um de fígado-rim e um cardíaco). A taxa de rejeição foi de 31%. A maioria dos episódios ocorreu entre a segunda e a quarta semana após o transplante. Nessa série, a sobrevida do paciente e enxerto em 24 meses foi de 97,6% e 89,1%, respectivamente (52).

A eficácia da IVIg como agente imunomodulador, capaz de reduzir os níveis de anticorpos anti-HLA e aumentar as taxas de transplantação de pacientes hipersensibilizados, foi definitivamente demonstrada no estudo controlado e randomizado, conduzido por Jordan et al., o *NIH- IGO2 trial*, publicado em 2004 (53). Esse estudo multicêntrico demonstrou que a IVIg na dose de 2g/kg mensalmente (4 doses pré-transplante e 4 doses após o transplante) aumentou a taxa de transplantação de pacientes hipersensibilizados de 17% no grupo controle para 35% no grupo que recebeu IVIg,  $p < 0,05$ . A taxa de transplantação do grupo de pacientes candidatos a rins de doadores falecidos foi de 31% no grupo tratamento contra 12% no grupo controle,  $p = 0,0137$ . A sobrevida do enxerto encontrada foi de 80% no grupo que recebeu IVIG e 75% no grupo placebo após 30 meses de seguimento.

Diversos protocolos utilizando IVIg têm sido descritos e demonstram sua ação positiva na redução dos anticorpos e do cPRA de pacientes hipersensibilizados (51-55). Montgomery et al., utilizando protocolo com dose baixa de IVIg (100 mg/kg) associada a plasmaferese, demonstraram benefício significativo na sobrevida dos pacientes. Quando comparados a pacientes hipersensibilizados que permaneceram em lista, aguardando um órgão compatível, pacientes hipersensibilizados que transplantaram com doadores vivos após serem submetidos ao protocolo de dessensibilização apresentaram sobrevida significativamente maior, atingindo-se um aumento de 100% após 8 anos de acompanhamento (56).

Estudos posteriores demonstraram, entretanto, que a utilização de IVIg isoladamente pode não ser suficiente para manter os níveis baixos dos anticorpos anti-HLA, estando associada a um efeito rebote da produção de anticorpos após a

suspensão do medicamento e no pós-transplante, favorecendo a ocorrência de episódios de rejeição. Pacientes que apresentam títulos muito elevados de anticorpos anti-HLA apresentaram apenas resposta parcial em alguns estudos (57).

Associado a tais achados, o melhor entendimento do papel dos linfócitos B na RAMA e na sobrevida do enxerto impulsionou a busca de novas estratégias para otimizar a dessensibilização, como a associação do anticorpo monoclonal anti-CD20, Rituximabe, aos protocolos com IVIg (58-64).

O Rituximabe é um anticorpo monoclonal anti-linfócitos B CD20+. O antígeno CD20 é uma fosfoproteína transmembrana expressa na superfície das células B jovens e maduras. Após ligar-se ao antígeno CD20, o Rituximabe afeta o funcionamento das células B, induzindo a ativação da cascata de complemento com consequente citotoxicidade e o reconhecimento dos linfócitos B pelos macrófagos, induzindo a fagocitose e a ativação das células NK (natural killer cells). Indicado para o tratamento de Linfomas de células B (refratários ou recidivas), Leucemia Linfocítica Crônica, Artrite Reumatoide e para o tratamento de doenças linfoproliferativas pós-transplantes (PTLD, do inglês *posttransplant lymphoproliferative disease*), têm sido atualmente utilizados *off label* em protocolos de dessensibilização para transplantes incompatíveis (ABO incompatíveis e os com prova cruzada positiva) e para o tratamento de RAMA.

O Rituximabe leva à redução das células B presentes no sangue periférico em cerca de um a três dias após a administração e uma depleção completa de células B na maioria dos pacientes em torno de seis semanas. Vários trabalhos têm demonstrado a eficácia da combinação de doses elevadas de IVIg e Rituximabe na redução dos títulos de anticorpos anti-HLA e no aumento das taxas de transplantação dos pacientes hipersensibilizados (58, 60).

O maior impacto da terapia imunossupressora com drogas anti-CD20 para dessensibilização deve-se à sua ação no controle da alosensibilização e na resposta amnética, traduzidas em menores taxas de RAMA (61, 62). Trata-se de uma droga relativamente segura, apesar de associar-se a uma maior incidência de viremia por poliomavírus (mas não de nefropatia ou perda de enxerto por BK vírus) (63). Toyoda et al., em estudo com 361 pacientes hipersensibilizados, dos quais 170 foram submetidos a um protocolo de dessensibilização com IVIg e Rituximabe, não encontraram diferenças nas taxas de infecção fúngica, infecções bacterianas sendo apenas a incidência de viremia por poliomavírus superior no grupo submetido à dessensibilização (64).

A plasmaferese (PF) é um método de remoção mecânica de anticorpos anti-HLA utilizada no tratamento da RAMA e que tem sido utilizada em associação com IVIg em baixas doses (0,1g/kg) em protocolos de dessensibilização de pacientes candidatos a transplante renal com doador vivo. A PF não é utilizada como estratégia para dessensibilização para transplante com doadores falecidos, pois não garante uma redução sustentada dos títulos dos anticorpos, que permita ao paciente aguardar por um órgão em lista.

### **1.9 Novas perspectivas terapêuticas em dessensibilização**

Vários agentes imunossupressores têm sido estudados como alternativas em protocolos de dessensibilização pré-transplante. O Bortezomibe é um agente anticélulas plasmocitárias que atua inibindo o proteossoma 26s e causando a apoptose dessas células. É utilizado para o tratamento do Mieloma Múltiplo e, atualmente, utilizado com sucesso no tratamento de RAMA (65). Woodle e col.

conseguiram demonstrar a queda dos anticorpos imunodominantes (iDSA) e uma taxa de transplantação de 43% (19 de 44 pacientes), utilizando protocolo de dessensibilização com Bortezomibe, plasmaferese e Rituximabe. Eles obtiveram taxas de RAMA relativamente baixas, 18,8% em 6 meses, quando comparadas a outros protocolos (66). Jeong et al. demonstraram aumento na taxa de transplantação de pacientes com doador falecido, utilizando protocolo com IVIg em altas doses, Bortezomibe e Rituximabe em estudo com 19 pacientes hipersensibilizados (67).

O Tocilizumabe é um anticorpo monoclonal, antagonista da interleucina seis, utilizado para o tratamento de artrite reumatoide e artrite reumatoide juvenil. A IL6 é uma citocina envolvida em numerosos processos inflamatórios e imunomodulatórios, sendo essencial para a manutenção das defesas do indivíduo. A sua produção excessiva está envolvida em diversas doenças autoimunes, em processos inflamatórios crônicos e no processo de rejeição de enxertos. A droga foi estudada como alternativa para a dessensibilização de pacientes resistentes a outros protocolos de dessensibilização, com bons resultados (68). Neste trabalho, dez pacientes, que não responderam a um protocolo de dessensibilização com IVIg, Rituximabe e plasmaferese, foram submetidos a protocolo com IVIg e Tocilizumabe. A taxa de transplantação foi de 70%, sem episódios de RAMA em biópsias protocolares e boa função do enxerto renal em 12 meses, MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*)  $60 \pm 25$ ml/min. Houve queda estatisticamente significativa nos títulos e no número de DSA no momento do transplante e após a cirurgia. Apesar de tratar-se de estudo pequeno, os bons resultados sugerem benefício da droga e indicam a necessidade de realização de ensaios controlados para melhor determinação de sua eficácia e segurança.

Outra droga que tem sido estudada com resultados promissores em protocolos de dessensibilização é a IgG Endopeptidase (IdesR). A IgG Endopeptidase é uma enzima bacteriana produzida pelo *Streptococcus pyogenes*, capaz de clivar as quatro subclasses de IgG em fragmentos Fc. A inativação das moléculas de IgG inibe tanto a citotoxicidade dependente do complemento, quanto a citotoxicidade dependente de anticorpos. Em estudo publicado recentemente, Jordan et al. obtiveram bons resultados de protocolos, utilizando Ides em 25 pacientes com doadores vivos incompatíveis. A taxa de transplantação foi de 96% (24 dos 25 pacientes), com ocorrência de RAMA em 46,1% dos pacientes e relativa segurança no uso da droga (69).

O Obinutuzumabe é um anticorpo monoclonal anti-CD20 utilizado no tratamento da Leucemia Linfocítica Crônica. Tal medicamento difere-se do Rituximabe por reconhecer o epítipo tipo II do antígeno CD20 presente tanto em células pré-B quanto em linfócitos B maduros, enquanto o Rituximabe reconhece apenas o epítipo tipo I, presente em células maduras. Atualmente, estão em andamento dois ensaios clínicos na Europa e nos Estados Unidos para avaliar a farmacocinética, a eficácia e a segurança da droga no tratamento de pacientes hipersensibilizados (49).

Outro inibidor de Linfócitos B em estudo é o Belimumabe, um anticorpo que inibe o crescimento e a diferenciação de células B, bloqueando o estimulador de linfócitos B (BlyS, do inglês B lymphocyte stimulator). Atualmente, é utilizado no tratamento do Lupus Eritematoso Sistêmico e ainda não teve sua eficácia comprovada no tratamento de pacientes hipersensibilizados (49).

Diversos outros agentes depletórios de linfócitos B encontram-se em estudo para o tratamento de diversas doenças autoimunes, porém ainda sem avaliação

para o uso em pacientes hipersensibilizados.

O Eculizumabe, anticorpo monoclonal contra a proteína C5 da cascata do complemento, foi testado por Bentall et al. no tratamento de pacientes hipersensibilizados com prova cruzada por citometria de fluxo positiva contra seus doadores vivos, que obteve excelente resultado na redução da incidência de RAMA após 3 meses do transplante, 7,7% (2/26) no grupo tratado com Eculizumabe contra 41,2% (21/51) no grupo controle. Entretanto, a continuidade do seguimento dos pacientes demonstrou taxas semelhantes de sobrevida do enxerto nos dois grupos após 3 anos (70).

O inibidor da C1 Esterase, o C1-INH, atua sobre C1 Esterase, importante protease que regula a via clássica do complemento. A droga vem sendo estudada como um imunossupressor importante no tratamento da RAMA (71), na prevenção da função retardada do enxerto secundária à lesão decorrente da isquemia - reperfusão e, mais recentemente, no tratamento de pacientes hipersensibilizados para a prevenção da RAMA, com bons resultados (72).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Principal**

- Avaliar o impacto do uso de altas doses de IVIg sobre a taxa de transplantação em pacientes altamente sensibilizados, inscritos em lista para transplante renal, aguardando órgão proveniente de doador falecido.

### **2.2 Objetivos Secundários**

- Avaliar o impacto da dessensibilização sobre o número e os títulos de anticorpos anti-HLA desses pacientes.
- Avaliar a evolução do enxerto renal, os episódios de rejeição, a sobrevida do enxerto e dos pacientes no grupo submetido a transplante renal com doador falecido após dessensibilização.

### 3. PACIENTES E MÉTODOS

Trata-se de estudo retrospectivo observacional que avaliou 45 pacientes com DRC, inscritos em lista para transplante renal isolado com doador falecido, que apresentavam níveis elevados de cPRA no acompanhamento, testados em lista previamente com recusas por provas cruzadas positivas e que foram submetidos a protocolo de dessensibilização, utilizando IVIg. Foram incluídos pacientes que iniciaram a dessensibilização a partir de 2003 até 31/12/2003, com acompanhamento dos resultados até 31 de dezembro de 2016. O estudo foi realizado na Serviço de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (STR HC-FMUSP). Foram dessensibilizados os pacientes que preencheram todos os critérios de inclusão e nenhum critério de exclusão.

Os critérios de inclusão para dessensibilização consistiram em:

- pacientes com idade superior a 16 anos;
- pacientes com DRC inscritos em lista para transplante isolado de rim proveniente de doador falecido;
- pacientes com cPRA superior a 50%, testados em lista previamente com provas-cruzadas positivas.

Os critérios de exclusão para dessensibilização foram:

- pacientes candidatos a transplante de múltiplos órgãos ou com transplante prévio de outro órgão, que não o rim;
- pacientes que, durante o período analisado, receberam alguma droga em fase de investigação.

- pacientes com pouco tempo de espera ou nunca testados em lista.

O protocolo de dessensibilização consistiu na administração de IVIg na dose de 2g/kg por mês, com monitorização de cPRA e na determinação da intensidade de fluorescência dos anticorpos de classe I e classe II, Luminex Single Antigen® a cada 6 meses de tratamento. As amostras de sangue para as análises imunológicas foram coletadas em período superior a 21 dias após a última dose de IVIg.

Os dados imunológicos foram coletados dos resultados dos exames realizados pelos pacientes selecionados no Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração – INCOR.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com o número 1.629.278, em 08/07/2016 (Anexo I).

Foram avaliados os dados epidemiológicos relacionados à doença renal crônica e à terapia renal substitutiva, as comorbidades, os dados imunológicos e os eventos sensibilizadores, o perfil dos anticorpos anti-HLA antes e após o tratamento com IVIg, a taxa de transplantação dos pacientes e os fatores que possivelmente impactaram em tal taxa, além da dessensibilização.

Os pacientes submetidos à dessensibilização foram subdivididos em dois grupos:

- pacientes que foram submetidos a transplante renal com doador falecido após o início do protocolo de dessensibilização;
- pacientes que permaneceram em lista para transplante renal.

No grupo de pacientes que transplantaram, foram avaliados também dados referentes à cirurgia do transplante, o perfil clínico dos doadores e a compatibilidade com o receptor, a evolução dos enxertos renais (por meio da análise dos resultados

de creatinina sérica, da relação urinária/plasmática de proteínas e da análise de depuração de creatinina pela fórmula do MDRD (Modification of diet in renal disease) IV, dos anticorpos anti-HLA no pós-transplante, assim como a análise minuciosa dos anticorpos específicos contra linfócitos T e B do doador (DSA), ambos por meio de análise por Single Antigen®. O tempo de espera em lista antes e após o tratamento foi avaliado, assim como a ocorrência de eventos infecciosos, neoplasias, a sobrevida do paciente e dos enxertos, as causas de óbito dos pacientes e de perda dos enxertos. A ocorrência de episódios de rejeição e sua resposta ao tratamento estabelecido foi avaliada, tendo os pacientes sido submetidos a biópsias renais protocolares nas duas primeiras semanas após o transplante (desde que não houvesse contraindicação ao procedimento), ou na presença de alterações laboratoriais, como a piora de função renal (elevação de 20% na creatinina sérica) e o início de proteinúria (relação proteína/creatinina superior a 30mg/g).

Em relação à terapia de indução para o transplante, todos os pacientes receberam Timoglobulina (ATG) 6 mg/kg de peso por 4-7 dias e Metilprednisolona, e 42,85% dos pacientes receberam também IVIg na dose de 2g/kg no Pós-operatório imediato. A imunossupressão de manutenção inicialmente utilizada por todos os pacientes foi composta por corticoide oral na dose inicial de 0,5 mg/kg com redução progressiva até 5 mg/d (100%), micofenolato de sódio (MMS) ou micofenolato de mofetila (MMF) como droga antiproliferativa (em dose inicial plena: 1440 mg/ de MMS ou 2000 mg de MMF). Tacrolimo foi o inibidor de calcineurina utilizado por todos os pacientes (dose inicial de 0,15 mg/kg).

Os episódios de rejeição foram classificados por Banff 2009 (Anexo II) e incluíram a pesquisa de C4d por imunofluorescência (IF) ou imunoperoxidase (IP),

na falta de tecido renal para análise por IF. As biópsias renais foram realizadas pela equipe de Urologia da STR-HC-FMUSP, preferencialmente pela via percutânea, e avaliadas na Divisão de Anatomia Patológica da FMUSP.

Foi considerada rejeição aguda mediada por anticorpos anti-HLA aquela que apresentava disfunção do enxerto renal associada a pelo menos dois dos seguintes achados: biópsia do enxerto evidenciando lesão histológica compatível com rejeição, deposição de C4d difusa ou focal em capilares peritubulares e presença de DSA circulantes. Os episódios de rejeição celular ou mediada por anticorpos foram tratados conforme a rotina do serviço.

Em relação à evolução do enxerto renal após tratamento dos episódios de rejeição, a recuperação total da função do enxerto foi definida pelo retorno da creatinina sérica aos valores prévios à rejeição. A recuperação parcial foi definida pela melhora da função do enxerto renal, porém com a creatinina sérica estabelecendo-se em valores superiores aos prévios à rejeição.

A fórmula para estimar a taxa da filtração glomerular (TFG) utilizada foi a equação MDRD simplificada, que utiliza quatro variáveis (idade, cor, gênero e creatinina sérica). Para gênero e cor, existe um multiplicador: se negros, 1,21; se mulheres não negras, 0,742; e para todos os outros indivíduos, 1,0, conforme equação a seguir:

$$\text{TFG} = 175 \times [\text{creatinina}]^{1,154} \times [\text{idade}]^{0,203} \times 0,742 \text{ (se mulher)} \times 1,210 \text{ (se negro)}.$$

Nos pacientes que permaneceram em lista, foram analisados os dados demográficos, os dados imunológicos e a evolução dos anticorpos anti-HLA, a mortalidade dos pacientes e as causas de óbito.

Foram realizadas, ainda, análises multivariadas comparativas dos dois grupos. Em ambos os grupos, foi realizada a avaliação da segurança relacionada ao uso da IVIg.

Análises complementares foram realizadas, comparando-se os pacientes inscritos em lista que haviam sido priorizados no sistema de alocação, em decorrência da falta de acesso para diálise (acesso vascular e peritoneal), com os pacientes que não haviam sido priorizados.

### **3.1 Estudo Imunológico**

Foram avaliados o cPRA e o perfil de anticorpos anti-HLA dos pacientes, iniciando-se com o material coletado antes do início das infusões de IVIg. Foi analisada a evolução do cPRA e dos anticorpos anti-HLA até o término do tratamento com IVIG, utilizando-se os soros encaminhados ao Laboratório de Histocompatibilidade do INCOR-HC-FM-USP. Para a análise, foram incluídos todos os anticorpos apresentados pelos pacientes, independente do título apresentado.

Para a análise de sua evolução, os anticorpos anti-HLA foram divididos em pré e pós-tratamento e categorizados, conforme o MFI apresentado nos testes

*Single Antigen*®:

- Categoria A: <1500
- Categoria B: 1500 a 2499
- Categoria C: 2500 a 4999
- Categoria D: 5000 a 10000
- Categoria E: > 10000

Para cada categoria, foram avaliados a média, a mediana e a somatória dos

valores de MFI e o número de anticorpos anti-HLA de classes I e II nas diferentes categorias, antes e após o tratamento com IVIg.

No grupo de pacientes submetidos a transplante renal, a análise dos anticorpos específicos contra o doador (DSA) foi realizada antes e após o transplante renal.

### *3.1.1 Avaliação da resposta humoral*

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

Foram coletados fragmentos de baço ou linfonodos dos doadores falecidos para a realização das análises. Estes foram reduzidos a fragmentos menores para a liberação das células presentes no parênquima tecidual. A suspensão celular obtida foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos e ressuspensa em RPMI a 10%. A contagem celular foi ajustada para obter concentração de 15 a 20 x 10<sup>6</sup> células/ml. Após o processo de congelamento, os linfócitos totais foram distribuídos em tubos de criopreservação e refrigerados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

Foram realizados testes de citotoxicidade dependente de complemento sempre que os pacientes concorreram a órgãos de potenciais doadores falecidos e os transplantes foram liberados diante de prova cruzada negativa para linfócitos T e B. As análises por citometria de fluxo foram realizadas retrospectivamente, sempre que estivessem disponíveis células viáveis do doador falecido para análise. Os testes de microesfera marcadas (Luminex®) e Single Antigen® foram realizados

durante todo o período em que os pacientes receberam IVIG, no momento do transplante renal e após o transplante, a para monitorização dos títulos de anticorpos e do cPRA a partir do sétimo PO. As técnicas utilizadas em cada um dos métodos encontram-se descritas no anexo III.

### **3.2 Estudo histológico**

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

#### *3.2.1 Imunofluorescência indireta para C4d*

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

### 3.2.2 Imunoperoxidase para C4d

A técnica de imunoperoxidase para C4d foi utilizada na impossibilidade da análise por IF pela ausência de material. Para tal análise é utilizado fragmento renal preservado em parafina. Antes da realização da técnica de imunoperoxidase para C4d, as lâminas contendo fragmentos de biópsia renal de 2 µm de espessura foram submetidas à desparafinização. Em seguida, as mesmas foram submetidas à hidratação.

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

### 3.3 Análise estatística

Para a análise estatística, descrevem-se os dados quantitativos (Idade, PRA CL I, MFI) através das médias e desvios padrão e utiliza-se o *teste t-Student* ou o *teste não-paramétrico de Wilcoxon* (quando indicado) para a comparação entre os

grupos. Para os dados atributos (sexo, raça, etc.) foi realizada a descrição por meio das frequências e percentuais e utilizou-se o *teste Exato de Fisher* para a comparação entre os grupos. Para os dados não atributos (incidência de RAMA, rejeição geral, perda de enxerto), foi realizada a descrição através das frequências e percentuais e utilizado o *teste Exato de Fisher*, o *teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis* e o *teste Log-Rank* para a comparação entre os grupos. Na avaliação do impacto das variáveis na chance de transplantação, foi realizada uma análise de regressão logística, inicialmente univariada e, posteriormente, multivariada. Utilizou-se o nível de significância de 5% nas comparações.

#### 4. RESULTADOS

No período de janeiro de 2003 a dezembro de 2013, um total de 83 pacientes hipersensibilizados foram submetidos a tratamento de dessensibilização no STR-HC-FMUSP.

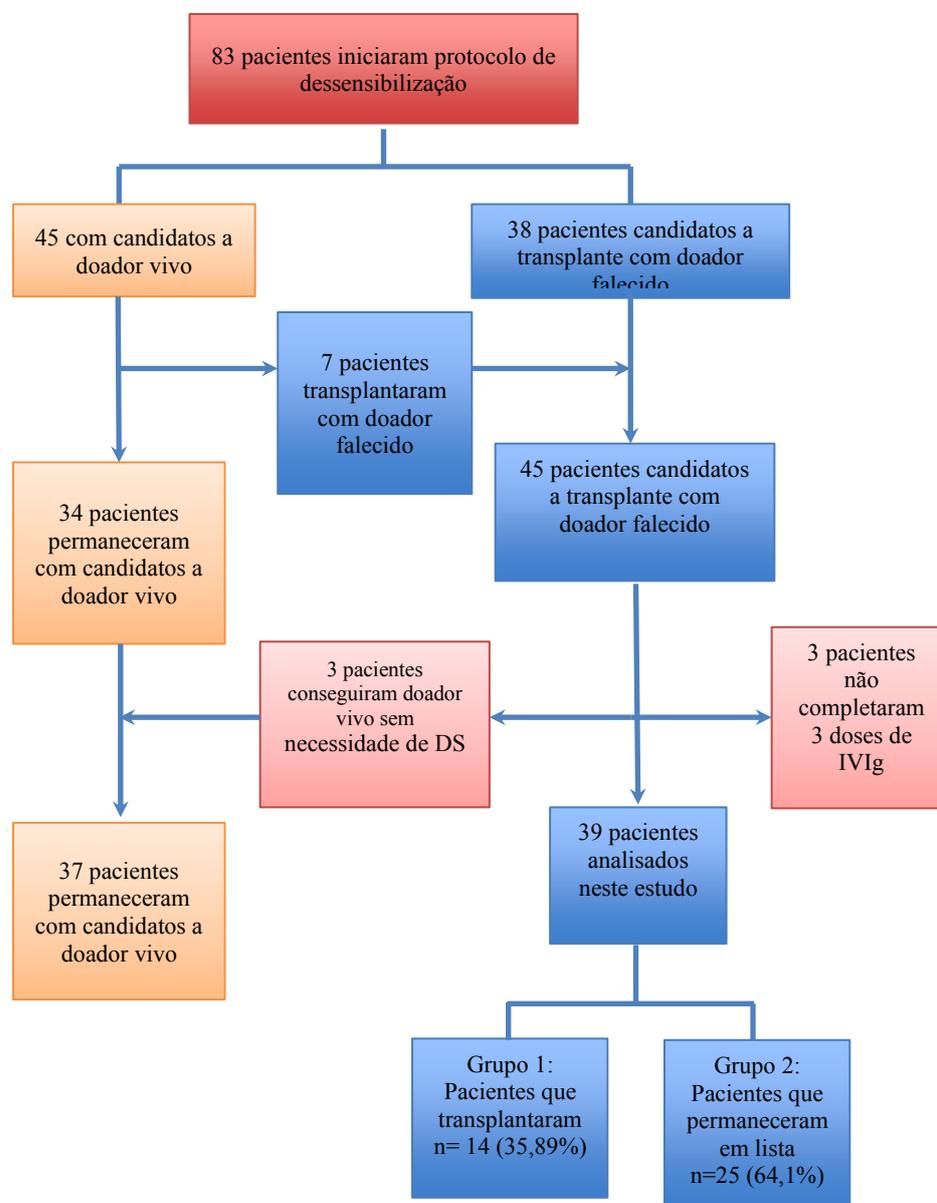
Destes, 45 pacientes possuíam candidatos a doadores vivos em condições para realizar a doação após estudo pré-transplante, apesar de apresentarem provas cruzadas por citotoxicidade dependente do complemento e/ou por citometria de fluxo positivas. Durante o período de preparação para o transplante, sete desses pacientes foram contemplados com órgãos provenientes de doadores falecidos e tiveram seus dados analisados juntamente com os demais pacientes que iniciaram o protocolo de dessensibilização sem possíveis doadores vivos, candidatos a receber um enxerto proveniente de doadores falecidos.

Um total de 45 pacientes compunham inicialmente o grupo de pacientes candidatos a órgãos provenientes de doadores falecidos. Entretanto, 3 pacientes transplantaram com doadores vivos compatíveis durante o processo de dessensibilização e serão analisados juntamente com os pacientes que apresentavam doadores vivos em outro estudo.

Além disso, três pacientes receberam um número de doses de IVIG insuficiente (inferior a três doses mensais de 2g/kg), sendo excluídos do estudo por não terem completado o mínimo protocolo de dessensibilização proposto.

Durante o período de seguimento de  $58,9 \pm 22,9$  meses, dos 39 pacientes submetidos ao protocolo, 14 (35,89%) foram transplantados. Os outros 25 pacientes permaneceram aguardando por um órgão em lista.

A inclusão e alocação dos pacientes encontra-se ilustrada na figura 1.



**Figura 1:** Pacientes incluídos no estudo

Um total de 39 pacientes candidatos a receber um transplante com doador falecido foi submetido ao protocolo de dessensibilização, tendo recebido ao menos três doses mensais de 2g/kg de IVIg. Os pacientes eram em sua maioria do sexo feminino, sendo 26 mulheres (66,6%), 24 pacientes da cor branca (61,5%), com média de idade de  $47,3 \pm 12,2$  anos. Quase 50% dos pacientes eram procedentes

de outros estados, 18 pacientes (46,2%). O tempo médio de terapia renal substitutiva dos pacientes foi de  $95 \pm 68$  meses no momento do início do protocolo, sendo  $91 \pm 62$  meses nos pacientes que transplantaram e  $97 \pm 72$  meses nos pacientes que permaneceram em lista. A terapêutica mais frequente era a hemodiálise, adotada como modalidade de terapia renal substitutiva por 36 pacientes (92,3%). A etiologia da DRC foi descrita como indeterminada em 11 pacientes (28,2%), sendo a causa determinada mais frequente a glomerulonefrite crônica em 9 pacientes (23%), seguida pela nefropatia hipertensiva em 6 pacientes (15,38%).

Como principais comorbidades apresentadas pelos pacientes, destacam-se a hipertensão arterial sistêmica (HAS), presente em 36 casos (92,3%), o hiperparatireoidismo secundário em 17 casos (43,5%), a insuficiência coronariana em 5 casos (12,8%), o diabetes mellitus em 5 casos (12,8%), e as hepatites B em 4 casos (10,26) e C em 8 casos (20,51%). Em relação à priorização por falta de acesso para o tratamento dialítico, 20 pacientes (51,28%) foram priorizados durante o seguimento (10 foram transplantados e 10 permaneceram em lista).

O PRA médio dos pacientes no início do protocolo de dessensibilização era  $80,24 \pm 26,85$  de Classe I e de  $73,29 \pm 29,75$  Classe II. Os pacientes que transplantaram no decorrer do seguimento, possuíam cPRA inicial médio de  $75,13 \pm 25,92$  para Classe I e  $66,77 \pm 32,07$  para Classe II, enquanto os pacientes que não transplantaram apresentavam cPRA inicial médio de  $83,84 \pm 26,86$  (Classe I) e  $77,07 \pm 27,63$  (Classe II).

Os pacientes foram analisados quanto à ocorrência de eventos sensibilizadores: gestação, transplante prévio e transfusão de hemocomponentes. Todos os 39 pacientes receberam ao menos 1 hemotransfusão (100%), 26 (66,6%)

havia sido transplantados anteriormente, sendo 10 (71,42%) dentre os pacientes do grupo 1 e 16 (64%) dentre os pacientes do grupo 2,  $p=0.7334$ . Dentre as pacientes do sexo feminino, 18 (69,23%) tiveram gestações, representando 46,15% do total de pacientes.

Os principais dados demográficos dos pacientes encontram-se demonstrados na tabela 1, e mostram que diferenças demográficas significativas não foram encontradas nos grupos que conseguiram em relação aos que não conseguiram transplantar.

**Tabela 1:** Dados demográficos

<b>Característica</b>	<b>Geral (N=39)</b>	<b>Pacientes que transplantaram (n=14)</b>	<b>Pacientes que permaneceram em lista (n= 25)</b>	<b>p-value</b>
Gênero	Feminino	10 (71,4%)	16 (64%)	0,7334
	Masculino	4 (28,6%)	9 (36%)	
Raça	Branca	9 (64,3%)	14 (56%)	0,7397
	Não Branca	5 (35,7%)	11 (44%)	
Modalidade TRS	HD	13 (92,9%)	23 (92%)	1,0000
	DP	1 (7,1%)	2 (8%)	
	O	6 (42,9%)	14 (56%)	
Tipo sanguíneo	AB	1 (7,1%)	2 (8%)	0,5550
	A	7 (50,0%)	7 (28%)	
	B	0 (0,0%)	2 (8%)	
<b>Gestação prévia</b>		<b>5 (50,0%)</b>	<b>1 (7%)</b>	<b>0,0501</b>
Transfusão prévia		14 (100,0%)	25 (100%)	1,0000
Transplante prévio		10 (71,4%)	16 (84%)	0,4221
Causa da DRC	GNC	4 (28,6%)	6 (24%)	0,5951
	HAS	1 (7,1%)	5 (20%)	
	Indeterminada	5 (35,7%)	5 (20%)	

	Outras	4 (28,6%)	9 (36%)	
	ICO	0 (0,0%)	6 (24%)	0,0705
	IAM	0 (0,0%)	1 (4%)	1,0000
	AVC	1 (7,1%)	0 (0%)	0,3590
Comorbidades	HAS	14 (100,0%)	25 (100%)	1,0000
	DM	1 (7,1%)	4 (16%)	0,6365
	Hep B	3 (21,4%)	1 (4%)	0,1228
	Hep C	3 (21,4%)	5 (20%)	1,0000
Idade (anos)		42,7 ± 12,0	49,9 ± 11,9	0,0819
Tempo Diálise em meses		91 ± 62	97 ± 72	0,7949

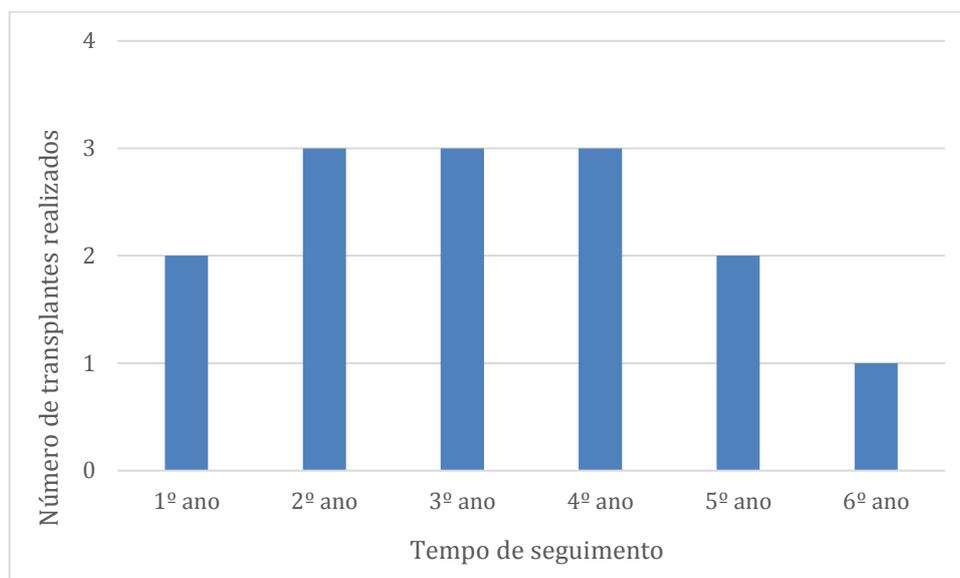
#### 4.1 Resultados relativos à dessensibilização

##### 4.1.1 Impacto da dessensibilização sobre a transplantabilidade

A taxa de transplantação dos pacientes submetidos ao protocolo de dessensibilização foi de 35,89% no período médio de acompanhamento de 58,9 ± 22,9 meses, mínimo de 15 meses e máximo de 117 meses. O tempo médio de tratamento com IVIG até a realização do transplante renal para esses pacientes foi de 19 ± 11 meses. O número médio de doses de IVIg utilizadas pelos pacientes até o final do período de observação foi de 13,87 ± 11,03. Nos pacientes que transplantaram, esse número foi de 8 ± 4 doses, enquanto os pacientes que permaneceram em lista continuaram recebendo IVIG e tinham recebido, em média, 17 ± 12 doses, p=0.0267.

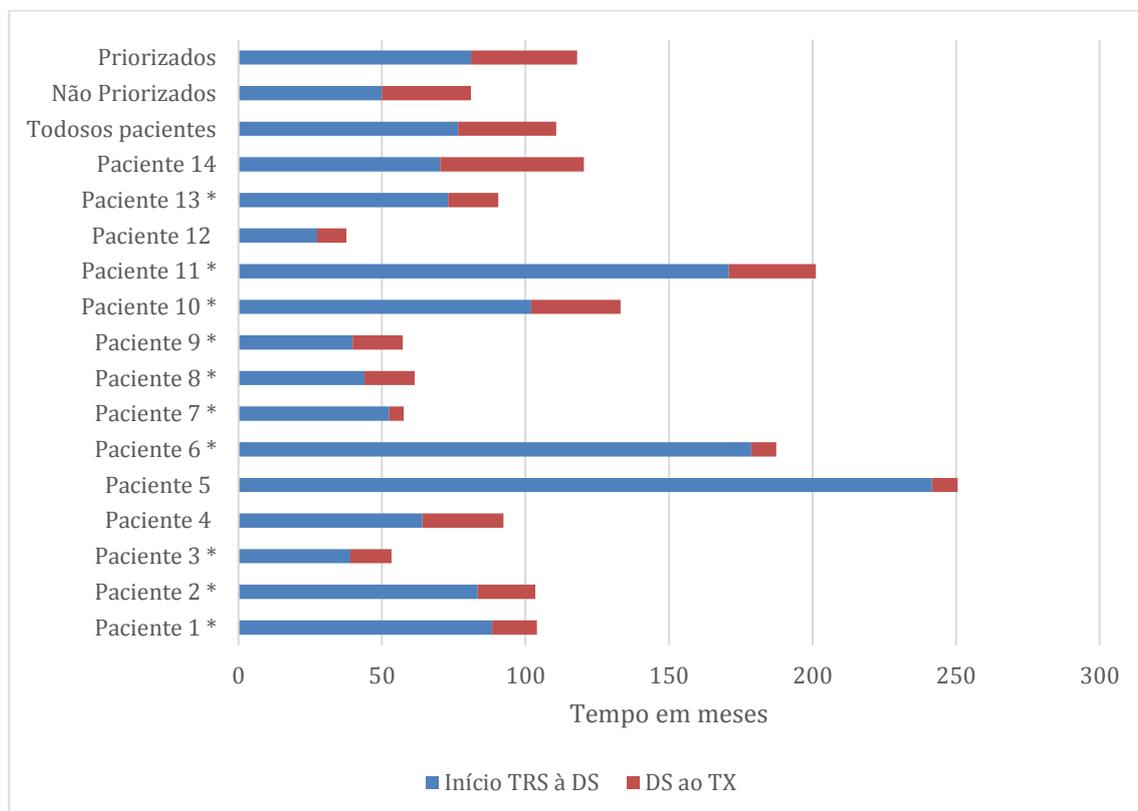
A figura 2 abaixo ilustra a distribuição do número de transplantes ao longo

dos anos de acompanhamento dos pacientes.



**Figura 2:** Número de transplantes ao longo do acompanhamento

Os pacientes submetidos ao protocolo de dessensibilização encontravam-se em terapia renal substitutiva em média há  $91 \pm 60$  meses (mediana 71 meses, mínimo de 27 e máximo de 242 meses) antes de iniciarem o protocolo de DS. Após o início da dessensibilização, o tempo médio para a realização do transplante foi  $19 \pm 11$  meses (mediana 17, mínimo de 5 e máximo de 50 meses) para os 14 pacientes que transplantaram. Os tempos relacionados ao início da TRS, início da dessensibilização e o transplante renal dos pacientes estão demonstrados, em meses, na figura 3 abaixo.



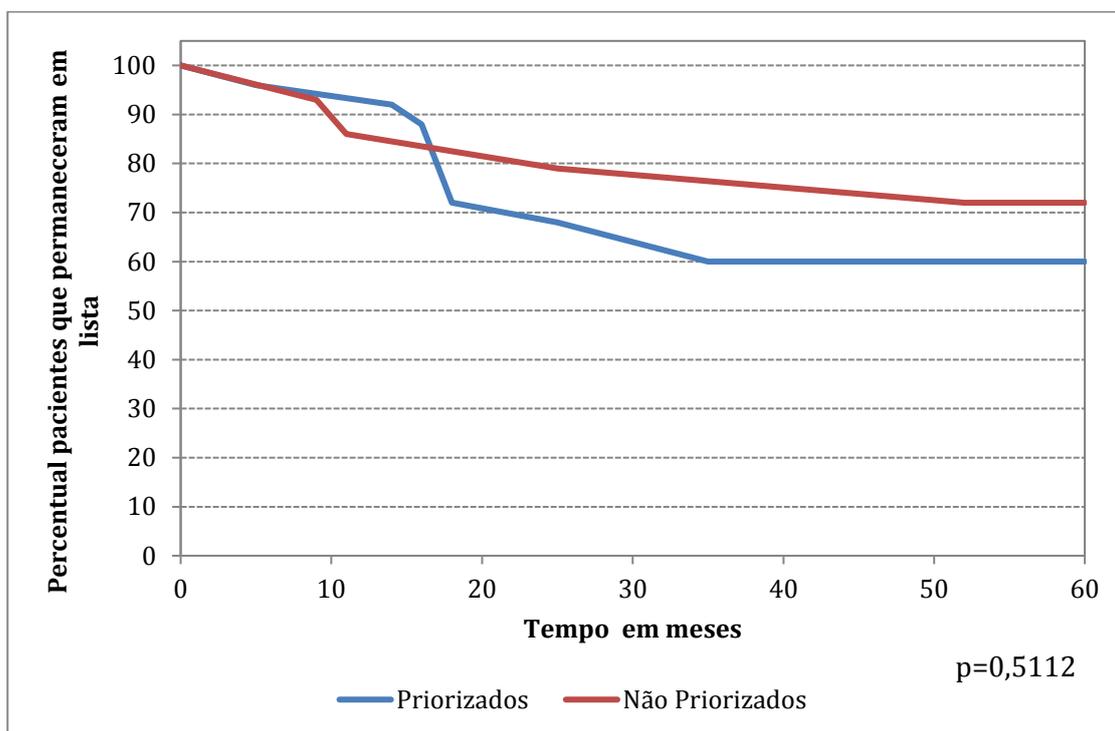
**Figura 3:** Relação temporal do início da TRS até início da IVIg e início IVIg e transplante em meses

**\*: pacientes priorizados.**

Nos pacientes priorizados transplantados (n=10), houve redução significativa do tempo em diálise antes e após a dessensibilização. Os pacientes permaneceram em lista por  $87,2 \pm 48,45$  meses antes do início do protocolo e  $18,3 \pm 7,9$  meses até o transplante,  $p=0,003$ . Os pacientes não priorizados que transplantaram (n=4) também apresentaram redução nos tempos em lista (apesar de não estatisticamente significativa) de  $100,75 \pm 83,19$  meses antes do início da dessensibilização para  $24,25 \pm 16,67$  meses após,  $p=0,123$ .

Para avaliar o impacto da priorização dos pacientes sobre o tempo em lista, utilizou-se uma curva de Kaplan-Meier. Para avaliar a diferença encontrada nas curvas, calculou-se o valor de p através do Log Rank, que não demonstrou

significância estatística ( $p=0,5112$ ).



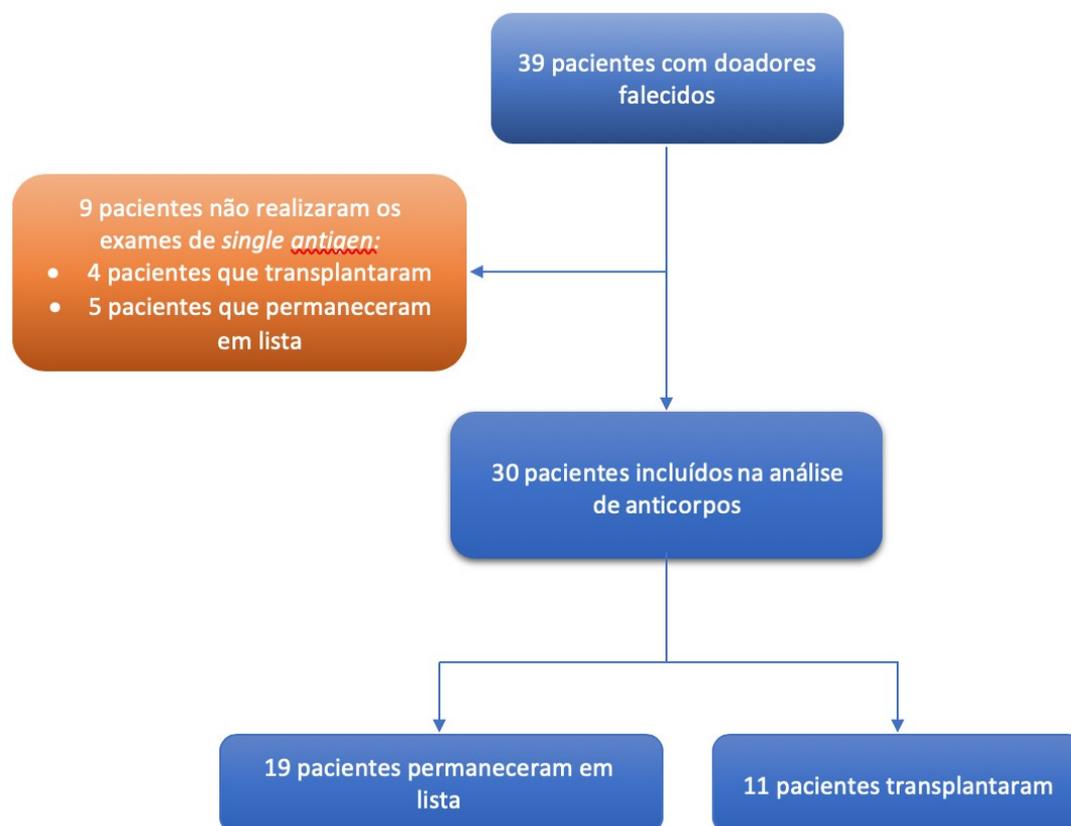
**Figura 4:** Curva de Kaplan-Meier demonstrando o impacto da priorização sobre o tempo em lista dos pacientes

O número médio de doses de IVIg utilizada pelos pacientes priorizados que transplantaram foi de  $8,1 \pm 4,5$  (mediana de 7,5) doses, enquanto os pacientes que transplantaram não priorizados utilizaram em média  $8 \pm 3,5$  (mediana de 8) doses,  $p=0,9691$ .

#### 4.1.2 Impacto da dessensibilização sobre o cPRA e os anticorpos anti-HLA

Do total de 39 pacientes inicialmente submetidos ao protocolo de dessensibilização, 9 pacientes iniciaram o tratamento antes de 2010, período em que a realização do exame *single antigen* não era disponível em nossa instituição, não tendo sido incluídos na análise da dinâmica dos anticorpos durante a

dessensibilização (Figura 5).



**Figura 5:** Pacientes incluídos na análise da dinâmica dos anticorpos

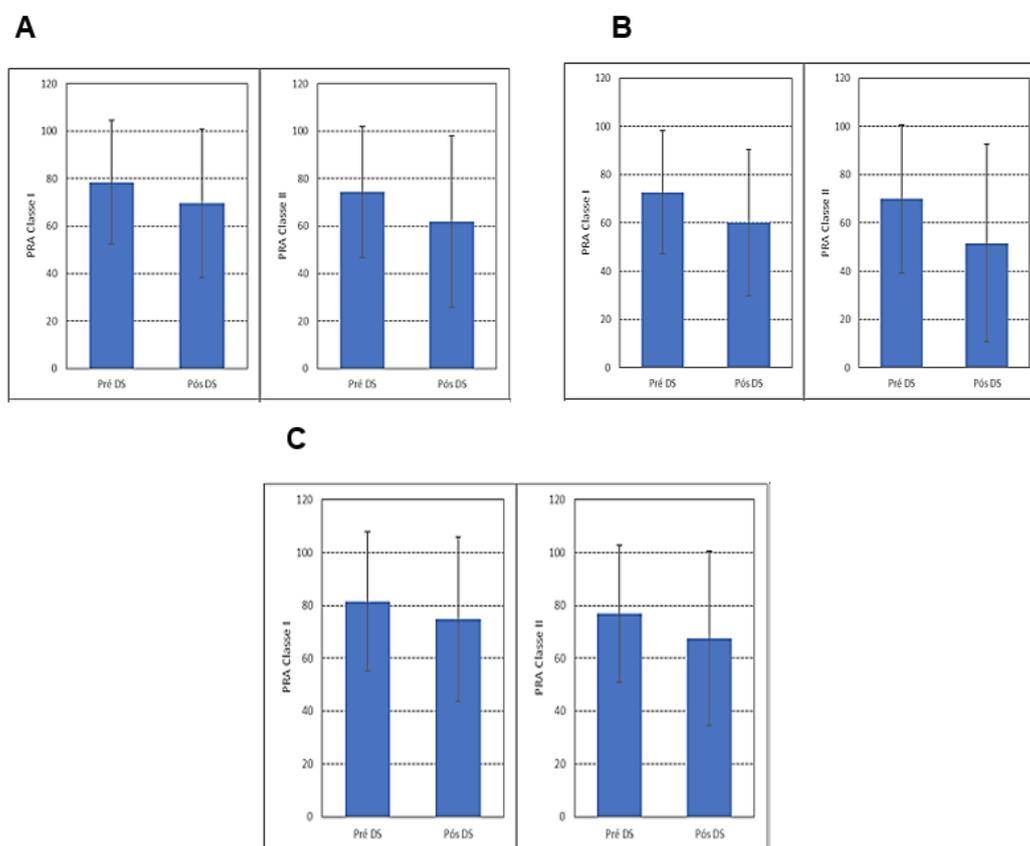
Dos 39 pacientes incluídos no protocolo de dessensibilização para doador falecido, após uma mediana de 7 doses de IVIg, em mediana de 31 meses, foram transplantados 14 pacientes (35,89%). Destes, 71,4% eram priorizados (n=10) e 28,5% (n=4) não eram priorizados,  $p=0,09$ . Cerca de 60% dos pacientes não chegaram ao transplante com essa dose de IVIG, embora tenham apresentado queda de painel. Faz-se então necessária a determinação de quais pacientes beneficiam-se da manutenção do tratamento por mais tempo até que o transplante ocorra.

Na análise dos valores médios de cPRA, observou-se uma queda estatisticamente significativa nos valores percentuais no cPRA de classes I e II, como demonstrado na tabela 2.

**Tabela 2:** Impacto da dessensibilização sobre os valores percentuais médios do cPRA

Distribuição dos pacientes	cPRA	Pré DS	Pós DS	p-value
Total de pacientes (n=30)	cPRA CL I	78,38 ± 25,99	69,54 ± 31,18	<b>0,0074</b>
	cPRA CL II	74,36 ± 27,50	61,79 ± 36,26	<b>0,0433</b>
Pacientes que transplantaram (n=11)	cPRA CL I	72,71 ± 25,49	60,14 ± 30,32	0,1455
	cPRA CL II	69,93 ± 30,64	51,64 ± 40,84	0,3848
Pacientes que permaneceram em lista (n=19)	cPRA CL I	81,56 ± 26,24	74,80 ± 31,01	<b>0,0162</b>
	cPRA CL II	76,84 ± 25,90	67,48 ± 32,93	<b>0,0464</b>

As médias ± 1 DP dos cPRA de classes I e II dos 30 pacientes estão ilustradas na figura 6.



**Figura 6:** Médias ± 1 DP do impacto da dessensibilização sobre o cPRA A: Todos os pacientes B:

Pacientes que transplantaram C: Pacientes que permaneceram em lista.

O impacto da dessensibilização sobre as médias e os somatórios dos MFI dos anticorpos dos pacientes encontram-se demonstrados na tabela 3.

**Tabela 3:** Impacto da dessensibilização na média e no somatório do MFI dos Ac dos pacientes nos diferentes grupos

Distribuição dos pacientes	Variável MFI	Pré DS	Pós DS	p-value
Pacientes totais (n=30)	Média MFI Geral	5940,5 ± 2391,6	6288,0 ± 2599,0	0,2434
	Somatório MFI	349799,8 ± 237736,9	299586,6 ± 215522,0	0,156
Pacientes que transplantaram (n=11)	Média MFI Geral	4864,3 ± 1671,6	5124,6 ± 2269,5	0,123
	Somatório MFI	228868,9 ± 91593,3	195803,1 ± 142023,1	0,3652
Pacientes que permaneceram em lista (n=19)	Média MFI Geral	6563,6 ± 2558,3	6961,6 ± 2591,3	0,2253
	Somatório MFI	419812,5 ± 268861,0	359671,8 ± 230730,8	0,2935

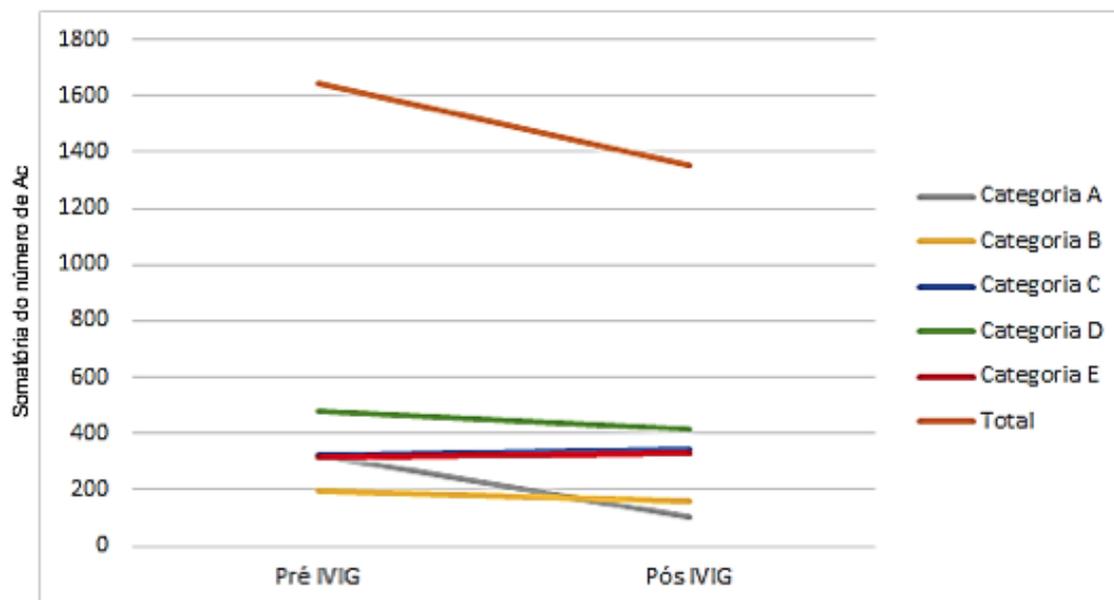
A análise do número médio de anticorpos (Classe I e Classe II), dividido por categorias de MFI, encontra-se demonstrada na tabela 4. Observa-se queda mais acentuada no número de anticorpos da categoria A, variação esta que foi estatisticamente significativa. Também houve queda estatisticamente significativa no número de anticorpos da categoria D, anticorpos em título superior a 5000 e que potencialmente podem cursar com provas cruzadas por citotoxicidade positivas, impedindo a transplantação.

**Tabela 4:** Número médio de anticorpos (Classe I e Classe II), divididos em categorias de MFI, pré e pós dessensibilização

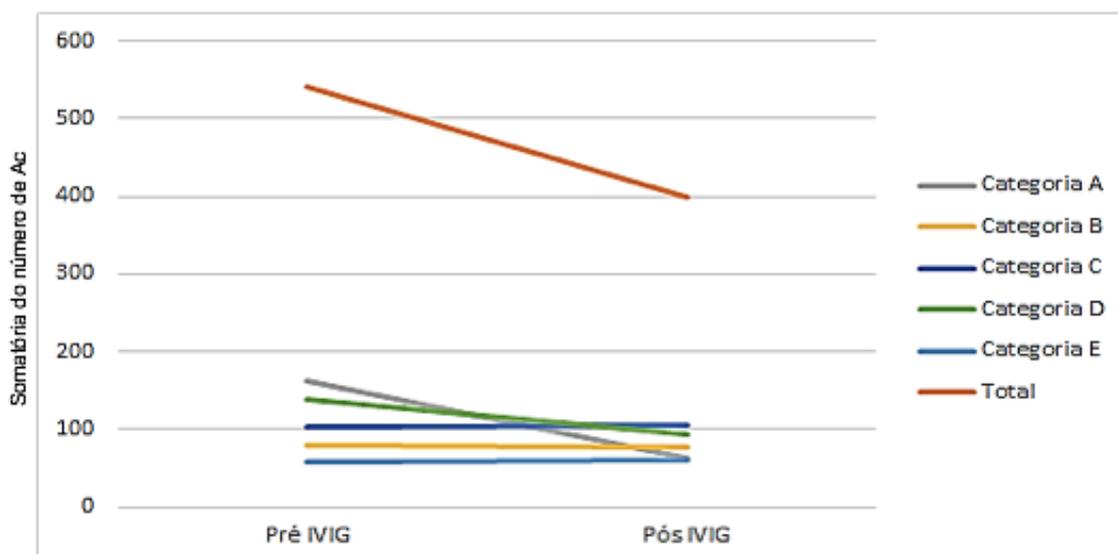
	<b>Categorias de Ac</b>	<b>Pré-DS(n)</b>	<b>Pós-DS(n)</b>	<b>p-value</b>
Pacientes (N total) (n=30)	<b>Categoria A</b>	<b>10,67 ± 10,60</b>	<b>3,67 ± 2,57</b>	<b>0,0002</b>
	Categoria B	6,3 ± 4,9	5,8 ± 5,5	0,3102
	Categoria C	11,1 ± 7,0	11,5 ± 8,4	0,8329
	<b>Categoria D</b>	<b>16,9 ± 10,8</b>	<b>13,2 ± 11,2</b>	<b>0,0486</b>
	Categoria E	11,7 ± 13,5	11,2 ± 11,3	0,9440
Pacientes que transplantaram (n=11)	<b>Categoria A</b>	<b>14,73 ± 14,47</b>	<b>5,82 ± 8,85</b>	<b>0,0352</b>
	Categoria B	7,2 ± 6,1	7,0 ± 3,3	0,8779
	Categoria C	9,5 ± 5,2	9,6 ± 7,7	10,000
	Categoria D	12,6 ± 6,2	8,5 ± 8,9	0,1221
	Categoria E	5,2 ± 5,2	5,5 ± 5,8	0,8281
Pacientes que permaneceram em lista (n=19)	<b>Categoria A</b>	<b>8,32 ± 6,99</b>	<b>2,42 ± 8,39</b>	<b>0,0103</b>
	Categoria B	5,7 ± 4,1	5,1 ± 6,5	0,3240
	Categoria C	12,1 ± 7,8	12,5 ± 8,8	0,8823
	Categoria D	19,3 ± 12,2	15,9 ± 11,7	0,1859
	Categoria E	15,4 ± 15,4	14,5 ± 12,4	0,8736

Analisando-se a evolução do número total de anticorpos antes e após a dessensibilização por categorias de titulação, observa-se queda no número total globalmente e separadamente nos pacientes que transplantaram e naqueles que permaneceram em lista. A redução mais pronunciada no número de anticorpos ocorreu na categoria A (anticorpos com títulos até 1500), tanto no total dos pacientes como naqueles que transplantaram e nos que permaneceram em lista. Nessa categoria, o número de anticorpos reduziu 68,80% no geral, tendo reduzido 60,5% nos transplantados e 77% nos demais pacientes. Nas demais categorias, observou-se redução mais discreta em alguns grupos, além de discretas elevações

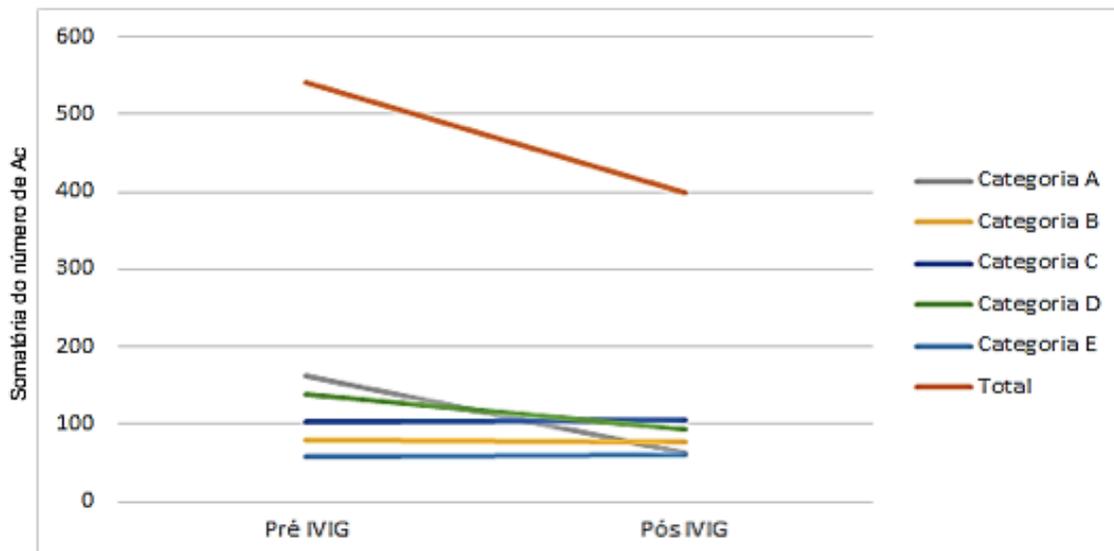
no número de anticorpos em outros. Os dados descritos encontram-se demonstrados nas figuras 7, 8 e 9.



**Figura 7:** Evolução da somatória do número de Ac em todos os pacientes (n=30)



**Figura 8:** Evolução da somatória do número de Ac dos pacientes que transplantaram (n=11)

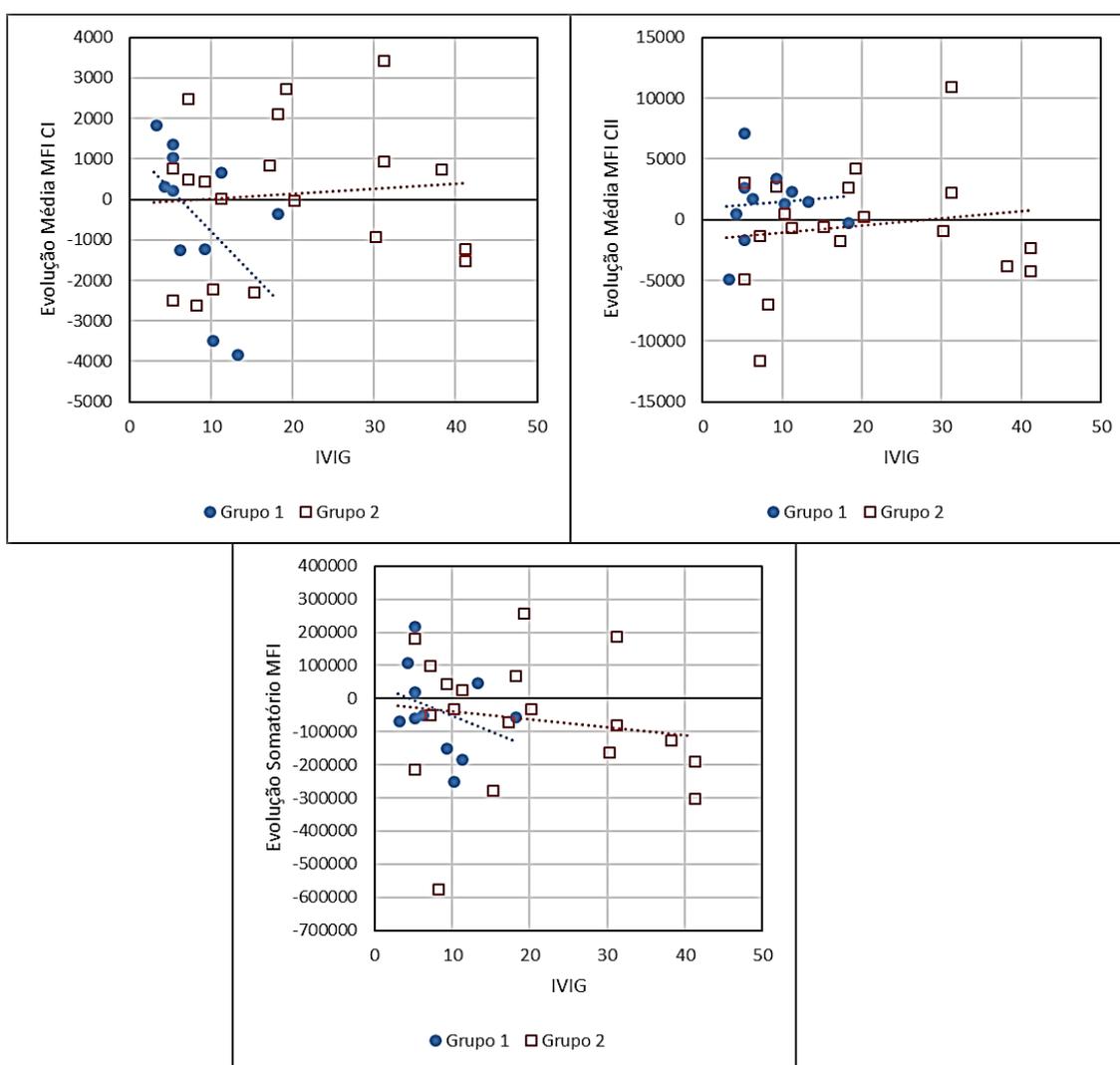


**Figura 9:** Evolução da somatória do número de Ac pacientes que permaneceram em lista (n=19)

Analisando-se as correlações entre o número de doses de IVIg recebidas pelos pacientes e a evolução da média da somatória dos MFI dos anticorpos, de forma geral e separadamente para os grupos, notam-se baixas correlações positivas entre as doses de IVIg e as médias, com exceção para os anticorpos de classe I nos pacientes que transplantaram, que apresentaram queda mais acentuada. Para o somatório dos MFI, nota-se uma discreta correlação negativa. No geral, as correlações não foram estatisticamente significativas. Os achados descritos estão demonstrados na tabela 5 e na figura 10 abaixo.

**Tabela 5:** Índices de correlação e *p-value* (entre parênteses) para doses de IVIg e as médias e somatório de MFI

Variável	Pacientes totais (n=30)	Pacientes que transplantaram (n=11)	Pacientes que permaneceram em lista (n=19)
Média MFI CI	0,05 (0,8034)	-0,51 (0,1055)	0,08 (0,7390)
Média MFI CII	0,02 (0,9105)	0,08 (0,8112)	0,16 (0,5250)
Soma MFI	-0,18 (0,3339)	-0,33 (0,3222)	-0,15 (0,5439)



**Figura 10:** Correlação doses de IVIg e evolução do MFI dos anticorpos

#### 4.1.3 Fatores que impactaram no acesso ao transplante

Para avaliar os possíveis fatores que impactaram o acesso dos pacientes ao transplante em processo de dessensibilização, foi realizada uma Análise de Regressão Logística, inicialmente, de forma univariada e, posteriormente, uma análise multivariada.

A tabela 6 demonstra o resultado da análise Univariada e a tabela 7, os valores de *Odds Ratio*. A priorização apresentou p-value relativamente próximo da nota de corte (0,05), indicando uma tendência de significância.

**Tabela 6:** Análise de Regressão Logística Univariada dos possíveis fatores que impactaram o acesso dos pacientes ao transplante

Fonte	Parâmetros	Graus de liberdade	Qui-quadrado	p-value
<b>Priorização</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3,381</b>	<b>0,0659</b>
Gênero	1	1	0,222	0,6375
Gênero/Gestação	2	2	2,888	0,2360
TX Prévio	1	1	0,770	0,3803
Num TX Prévio	1	1	1,998	0,1575
Num Gestações	1	1	0,221	0,6380
Num Transfusões	1	1	0,090	0,7647
Delta PRA Classe I	1	1	0,625	0,4293
Delta PRA Classe II	1	1	0,917	0,3383
Delta Soma MFI	1	1	0,170	0,6798
Delta Num AC (C, D e E)	1	1	0,001	0,9796
Delta Num AC (B e C)	1	1	0,002	0,9654
Delta Soma AC (C, D e E)	1	1	0,163	0,6863
Delta Soma AC (B e C)	1	1	0,015	0,9038

**Tabela 7:** *Odds Ratio* da análise Univariada dos possíveis fatores que impactaram o acesso dos pacientes ao transplante

Fonte	Nível 1	Nível 2	<i>Odds Ratio</i>	IC95%
Priorização	Sim	Não	<b>3,750</b>	0,917; 15,342
Gênero	Feminino	Masculino	1,406	0,341; 5,808
Gênero/Gestação	Feminino/Sem	Feminino/Com	4,333	0,742; 25,294
	Feminino/Sem	Masculino	3,750	0,587; 23,936
	Masculino	Feminino/Com	1,156	0,241; 5,530
TX Prévio	Não	Sim	2,133	0,393; 11,592
Num TX Prévio			0,499	0,190; 1,308
Num Gestação			0,885	0,532; 1,473
Num Transfusões			1,012	0,938; 1,091
Delta PRA Classe I			0,988	0,958; 1,018
Delta PRA Classe II			0,989	0,965; 1,012
Delta Soma MFI	(10.000 pontos)		1,009	0,966; 1,055
Delta Num AC (C, D e E)			1,001	0,959; 1,044
Delta Num AC (B e C)			1,002	0,927; 1,082
Delta Soma AC (C, D e E)	(10.000 pontos)		0,990	0,945; 1,038
Delta Soma AC (B e C)	(10.000 pontos)		0,985	0,776; 1,251

Na tabela 8, tem-se o resultado do modelo inicial da Regressão Logística Múltipla com todas as variáveis e nenhuma delas mostrou-se significativa. Foi realizada então a continuação da redução do modelo, retirando-se as variáveis menos importantes, obtendo-se o modelo final apresentado na tabela 9, onde se tem que somente a priorização foi significativa. Na tabela 10, tem-se os *Odds Ratio*, demonstrando que pacientes priorizados tiveram 6,6 vezes mais chances de transplantar do que os não priorizados.

**Tabela 8:** Modelo Inicial Regressão Logística Múltipla

Fonte	Parâmetros	Graus de liberdade	Qui-quadrado	p-value
Priorização	1	1	2,001	0,1571
Gênero/Gestação	2	2	1,403	0,4958
Num TX Prévio	1	1	0,587	0,4435
Num Transfusões	1	1	0,004	0,9512
Delta PRA Classe I	1	1	0,052	0,8196
Delta PRA Classe II	1	1	0,032	0,8590
Delta Soma MFI	1	1	0,028	0,8676
Delta Soma AC (C, D e E)	1	1	0,026	0,8720

**Tabela 9:** Modelo Final da Regressão Logística Múltipla

Fonte	Parâmetros	Graus de liberdade	Qui-quadrado	p-value
Priorização	1	1	<b>5,178</b>	<b>0,0229</b>

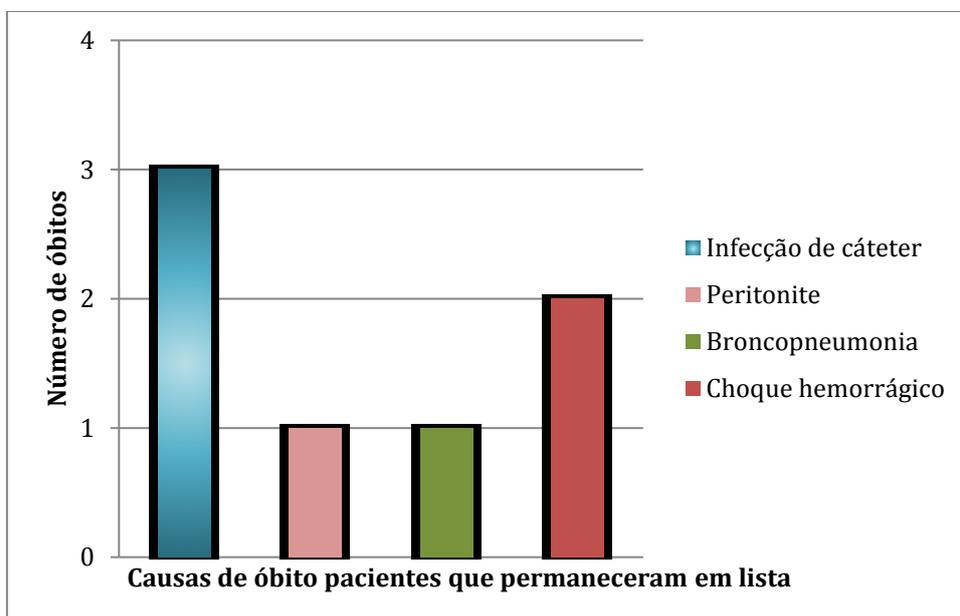
**Tabela 10:** Odds Ratio das variáveis do modelo Final da Regressão Logística Múltipla.

Fonte	Nível 1	Nível 2	Odds Ratio	IC95%
Priorização	Sim	Não	6,642	1,300; 33,929

#### 4.1.4 Desfechos dos pacientes que não chegaram ao transplante

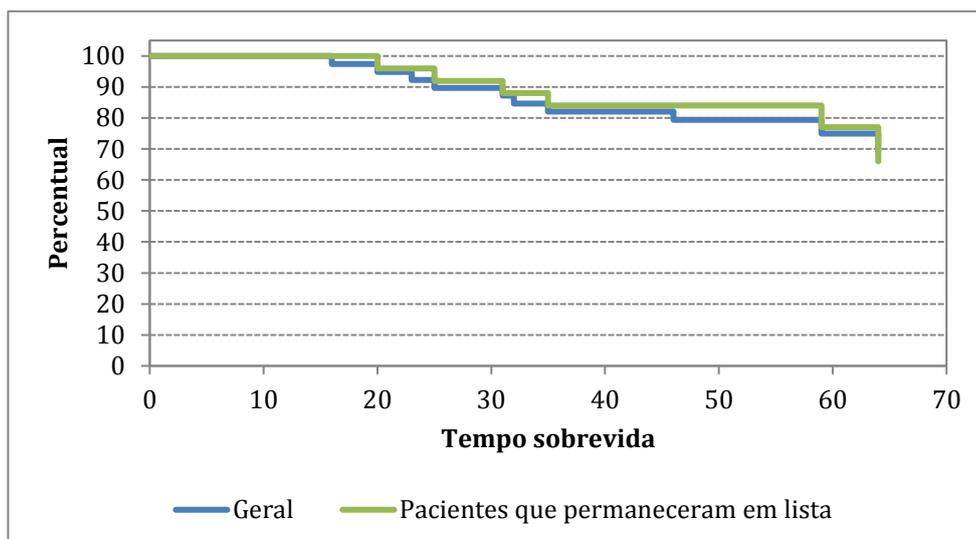
Os pacientes que permaneceram em lista foram acompanhados por período médio de 57 +/- 20 meses (mediana 57 meses). Durante esse período, houve seis óbitos (24%) nesse grupo de pacientes. O choque séptico foi a causa do óbito de dois pacientes (28,58%), ambos relacionados à infecção dos cateteres venosos de diálise. Os outros óbitos ocorreram por morte súbita, abdome agudo, tromboembolismo pulmonar (TEP), edema agudo de pulmão (EAP) e choque hemorrágico. A distribuição das causas de óbito dos pacientes que não

transplantaram encontra-se na figura 11.

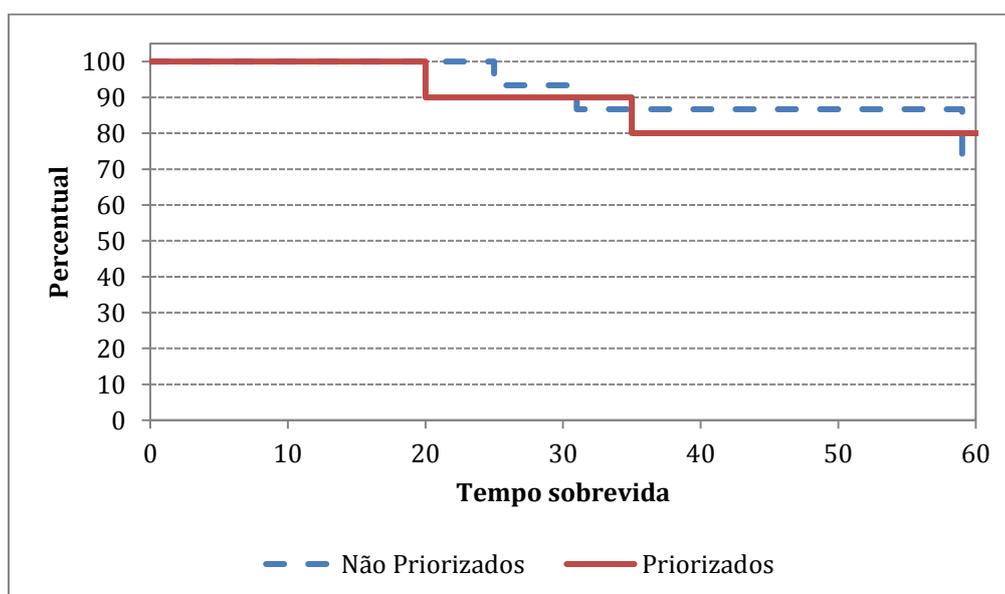


**Figura 11:** Causas de óbitos dos pacientes que permaneceram em lista para transplante

A sobrevida dos pacientes que permaneceram em lista foi semelhante à sobrevida dos pacientes totais do estudo, como evidenciado pela figura 12. Comparando-se os pacientes que permaneceram em lista e que se encontravam priorizados por falência de acesso vascular, com aqueles sem priorização, também se observam sobrevidas semelhantes, dados demonstrados na figura 13.



**Figura 12:** Sobrevida dos pacientes que permaneceram em lista comparada à sobrevida geral dos pacientes do estudo



**Figura 13:** Sobrevida dos pacientes que permaneceram em lista, comparando-se os priorizados com os não priorizados por falência de acesso vascular

#### 4.1.5 Eventos adversos associados à dessensibilização

A dessensibilização com IVIg foi bem tolerada pelos pacientes, tendo sido relatados apenas 2 episódios de hipervolemia associada à administração da droga.

Nenhum evento adverso mais grave associado à administração da IVIG foi relatado. Entre os eventos não severos, o mais comum foi cefaleia durante os dias de uso da droga.

#### 4.2 Resultados relativos aos transplantes realizados pós-dessensibilização

O tempo médio de seguimento dos 11 pacientes que foram transplantados foi de  $54,57 \pm 20,71$  meses, sendo  $18,18 \pm 16,67$  meses após o transplante renal. O tempo médio de isquemia fria dos rins doados foi de  $28,21 \pm 3,78$  horas. Realizaram biópsia em tempo zero 9 pacientes (64,28%), tendo sido obtido o diagnóstico de necrose tubular aguda (NTA) em 88,8% dos casos e o achado de microangiopatia trombótica em uma biópsia de enxerto. A taxa de função retardada do enxerto renal foi de 85,71%.

Os dados referentes aos doadores falecidos encontram-se descritos na tabela 11 abaixo.

**Tabela 11:** Dados dos doadores

Gênero	Feminino 8 (57,15%) Masculino 6 (42,85%)
Idade Média	$45,28 \pm 14,57$ anos
Creatinina média à doação	$2,0 \pm 1,25$ mg/dl
Doador de Critério Expandido	5 (35,7%)
Comorbidades	HAS 3 (21,4%)
Causa de óbito dos doadores	HSA 7 (50%) TCE 4 (28,57%) AVCh 3 (21,4%)

HSA: Hemorragia subaracnóidea TCE: Traumatismo cranioencefálico AVEh: Acidente vascular encefálico hemorrágico.

#### 4.2.1 Análise dos anticorpos específicos contra o doador

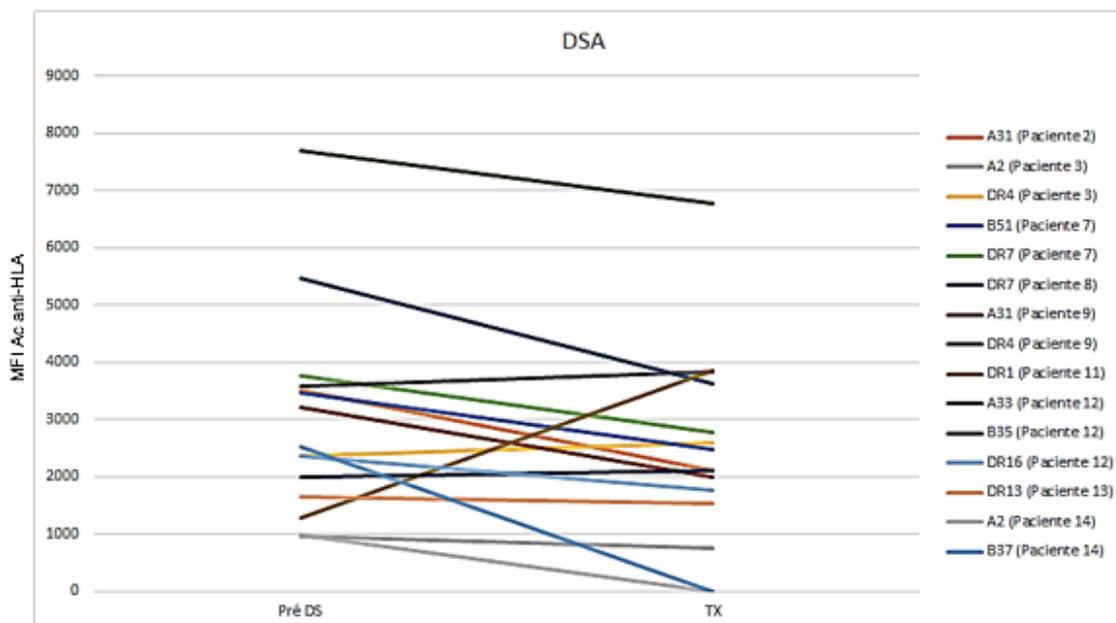
Para avaliação de presença de DSA, foram analisados apenas anticorpos contra antígenos A, B e DR. A média de incompatibilidades HLA (loci A, B e DR) dos pacientes com seus respectivos doadores foi de  $3,78 \pm 1,88$ . Apenas 1 paciente apresentava zero incompatibilidades HLA A, B e DR com seu doador. A presença e a intensidade dos DSA identificados no momento do transplante foi avaliada retrospectivamente nos soros dos pacientes coletados antes do início do protocolo.

Dentre os 14 pacientes que transplantaram, 9 (64,28%) apresentavam anticorpos específicos contra os antígenos doadores (DSA) no momento do transplante, sendo 6 deles (66,6%) priorizados e 3 (33,3%) não priorizados. A maioria desses pacientes apresentava DSA contra antígenos de classe I e classe II simultaneamente (n=5; 55,5%), 1 (11,1%) apresentava apenas DSA contra antígenos de classe I e 2 pacientes (22,2%) apresentavam apenas DSA contra antígenos de classe II.

O painel dos pacientes que transplantaram com DSA variava no início da DS entre 98 e 22% de classe I (média de  $68 \pm 26\%$ ) e entre 94 e 6% (média de  $78,6 \pm 32\%$ ) de classe II.

Cinco pacientes encontraram um doador contra quem nunca apresentaram anticorpos anti-HLA específicos, e seus cPRA variavam entre 29 a 94% de classe I (média de  $70,6 \pm 24\%$ ) e de 0 a 83% de classe II (média de  $61,2 \pm 31\%$ ).

Entre aqueles que transplantaram apresentado DSA contra o doador, a evolução dos títulos dos DSA antes da dessensibilização e no momento do transplante renal está demonstrada na figura 14.



**Figura 14:** Evolução dos DSA antes e após a dessensibilização

O valor médio dos MFI dos DSA antes da dessensibilização foi de  $2983,93 \pm 1725,28$ , mediana de 2511. Após a dessensibilização, no momento do transplante, o valor médio dos MFI dos DSA foi de  $2412,86 \pm 1646,93$ , mediana de 2115,  $p=0,36$ . A tabela 12 demonstra a variação absoluta e relativa dos MFI dos DSA apresentada pelos pacientes, no início da dessensibilização (pré-DS) e no momento do transplante (TX).

**Tabela 12:** Variação do MFI-DSA pré DS e no momento do TX

Paciente	DSA	Pré-DS	TX	Evolução
Paciente 2	A31	3509	2115	↓ 39,73%
Paciente 3	A2	960	760	↓ 20,84%
	DR4	2361	2585	↑ 8,7%
Paciente 7	B51	3458	2483	↓ 28,2%

	DR7	3765	2768	↓ 26,5%
Paciente 8	DR7	5476	3621	↓ 33,88%
Paciente 9	A31	3210	2002	↓ 37,64%
	DR4	3569	3825	↑ 6,7%
Paciente 11	DR1	1289	3862	↑ 66,7%
	A33	1987	2104	↑ 5,52%
Paciente 12	B35	7689	6776	↓ 11,88%
	DR16	2349	1768	↓ 24,74%
Paciente 13	DR13	1647	1524	↓ 7,5%
Paciente 14	A2	976	0	↓ 100%
	B37	2511	0	↓ 100%

Não se observou queda significativa nos Ac anti-HLA A, B e DR dos pacientes 3, 11 e 13, que justificasse a negatificação da prova cruzada por citotoxicidade. Nesses casos, a tipagem mais completa do HLA, incluindo-se Cw e DQ, poderia identificar a queda de outros DSA que justificasse a negatificação das provas cruzadas e o transplante desses pacientes.

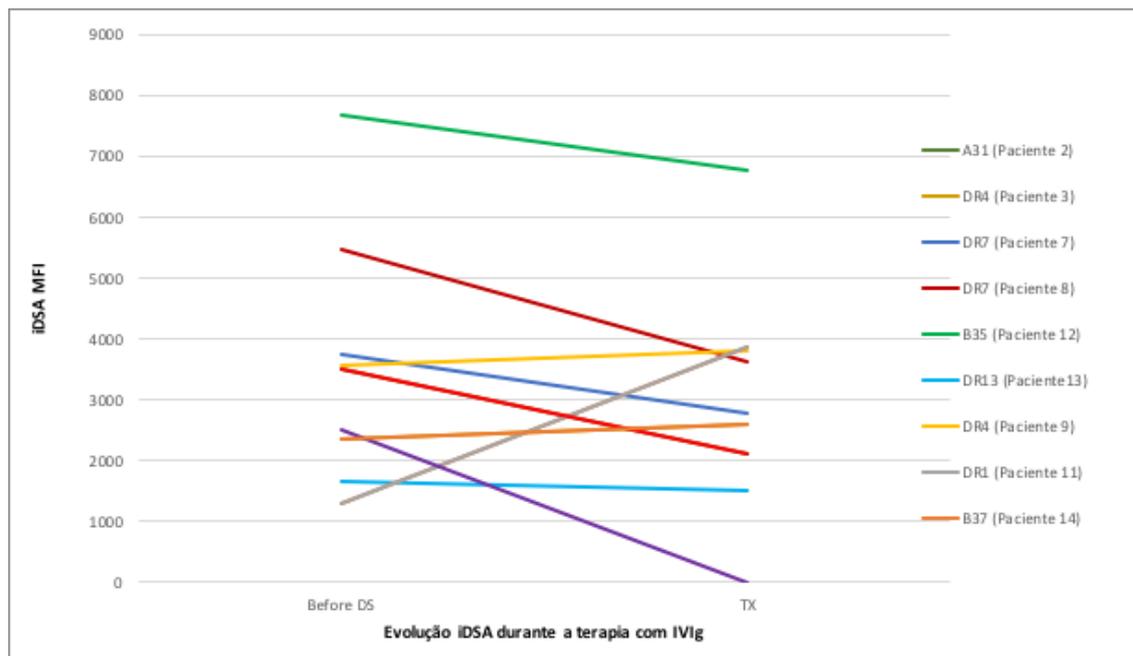
Dentre os nove pacientes que transplantaram com DSA, 6 (66,6%) haviam sido priorizados em lista por falta de acesso vascular. Dos 5 pacientes que transplantaram sem DSA, 4 (80%) haviam sido priorizados em lista por falência de acesso vascular, tendo sido testados centenas de vezes antes de conseguirem um doador possível.

Analisando o MFI do DSA imunodominante (iDSA) dos pacientes submetidos à dessensibilização, observou-se a redução na média dos valores dos iDSA. Todos

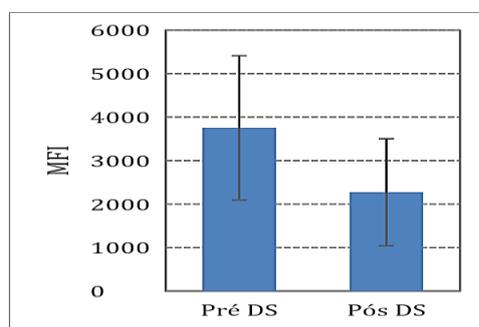
os iDSA que reduziram e permitiram a ocorrência de prova cruzada CDC negativa pós dessensibilização ocorreram na faixa de 1600 a 6776 (categorias B e C). A evolução dos iDSA antes e após a dessensibilização encontra-se demonstrada na tabela 13 e nas figuras 15 e 16.

**Tabela 13:** Impacto da dessensibilização sobre o MFI dos iDSA

iDSA	PRÉ DS	PÓS DS	p-value
A30	3509	2115	
DR4	2361	2585	
DR13	3765	2768	
DR7	5476	3621	
DR4	3569	3825	
B35	6776	1741	
DR15	2924	0	
B37	2511	0	
DR15	1647	1525	
Mediana	3509	2115	
<b>Média</b>	<b>3615,33 ±1514</b>	<b>2020 ± 1299</b>	<b>0,0384</b>



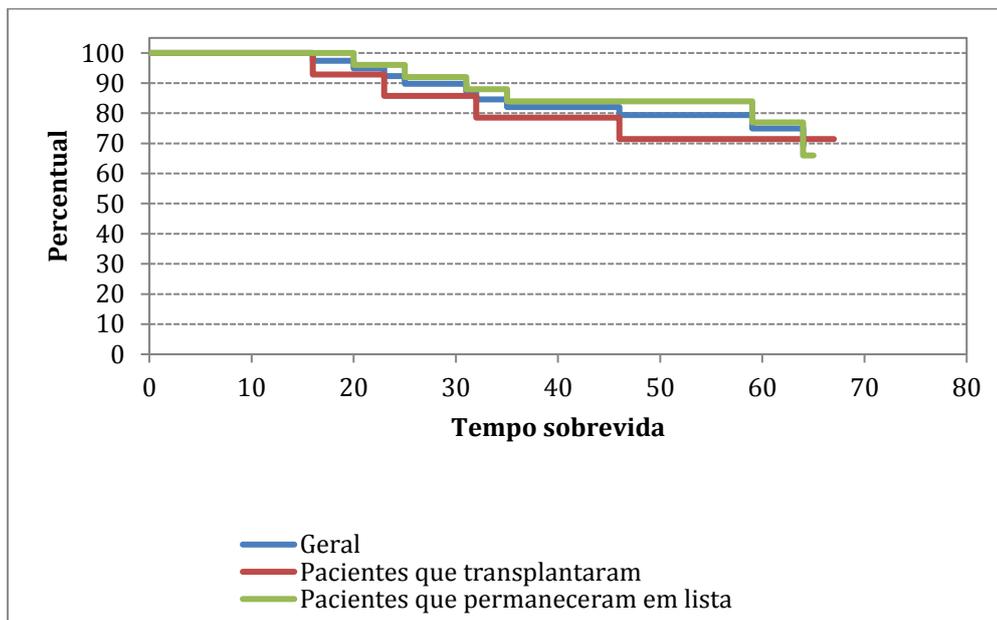
**Figura 15:** Evolução dos iDSA antes e após a dessensibilização



**Figura 16:** Média  $\pm$  1 Desvio padrão para pré e pós DS – iDSA

#### 4.2.2 Sobrevida dos pacientes e causas de óbito

Em 60 meses, a sobrevida dos pacientes não foi diferente entre aqueles que transplantaram e os que permaneceram em lista: 71.43% vs. 77%,  $p= 0,320$ . As curvas de sobrevida dos pacientes do estudo encontram-se demonstradas na figura 17.

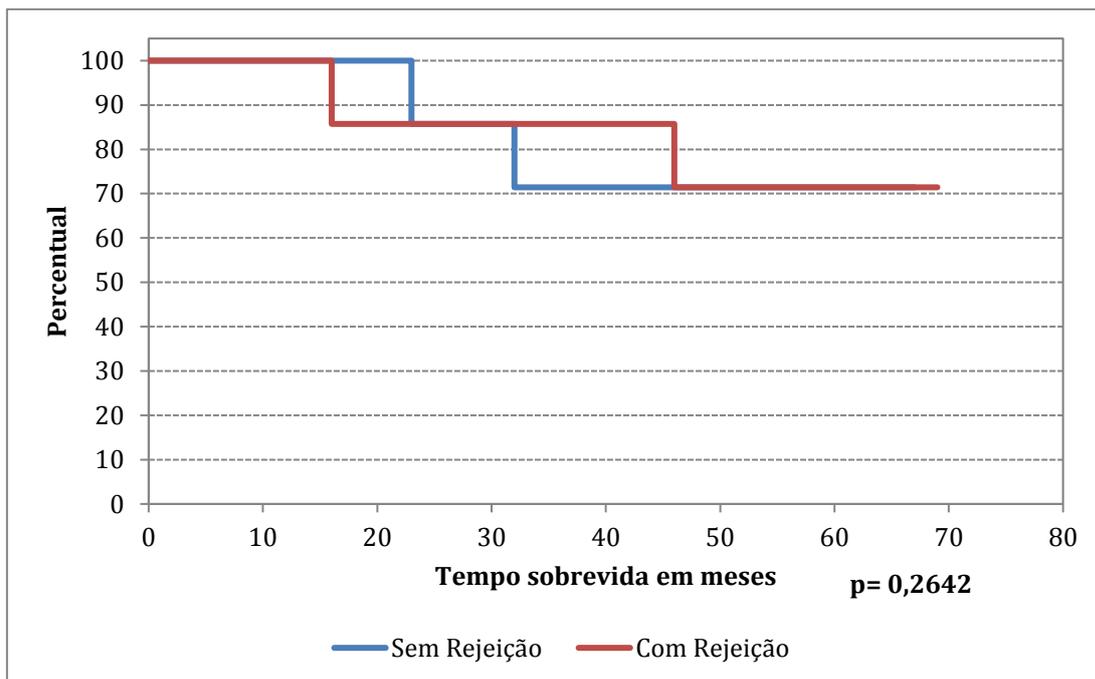


**Figura 17:** Sobrevida geral dos pacientes do estudo durante o período de acompanhamento

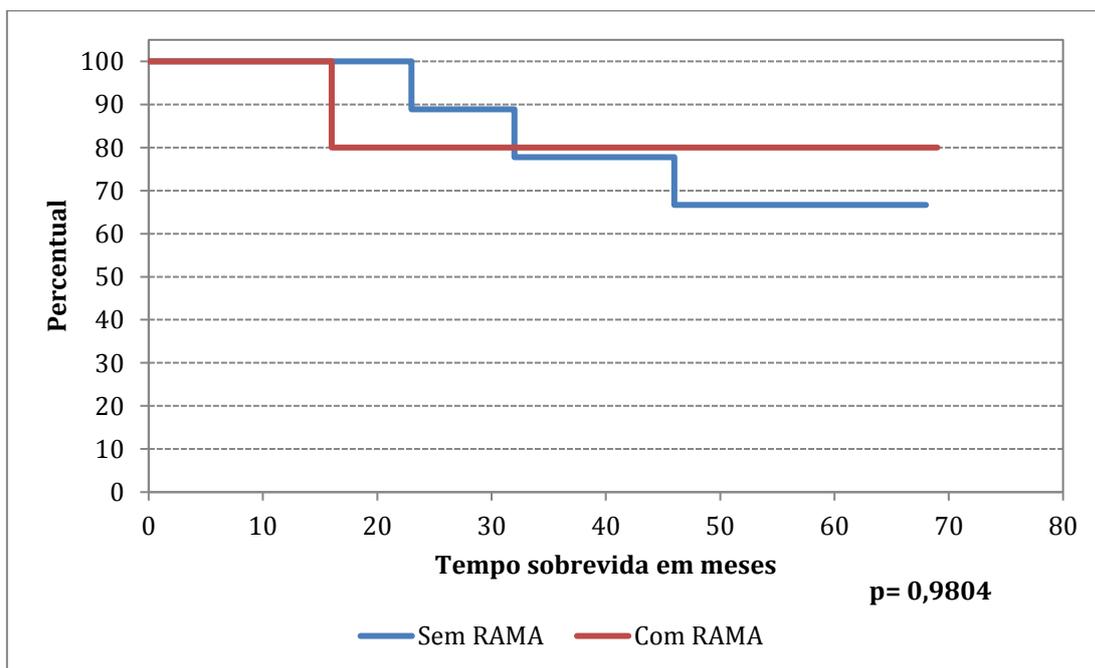
A sobrevida dos pacientes que transplantaram foi de 93%, 85,71% e 78,57% no 1°, 2° e 3° ano consecutivamente. A sobrevida global dos pacientes do estudo (n= 39) foi de 100% nos primeiros 12 meses após o início do protocolo de dessensibilização em ambos os grupos.

Analisando-se as sobrevidas dos pacientes que transplantaram, não foi observada significância estatística nas diferenças entre as sobrevidas dos pacientes que apresentaram episódios de rejeição celular, mediada por anticorpos ou mista e os que não apresentaram episódios de rejeição no seguimento.

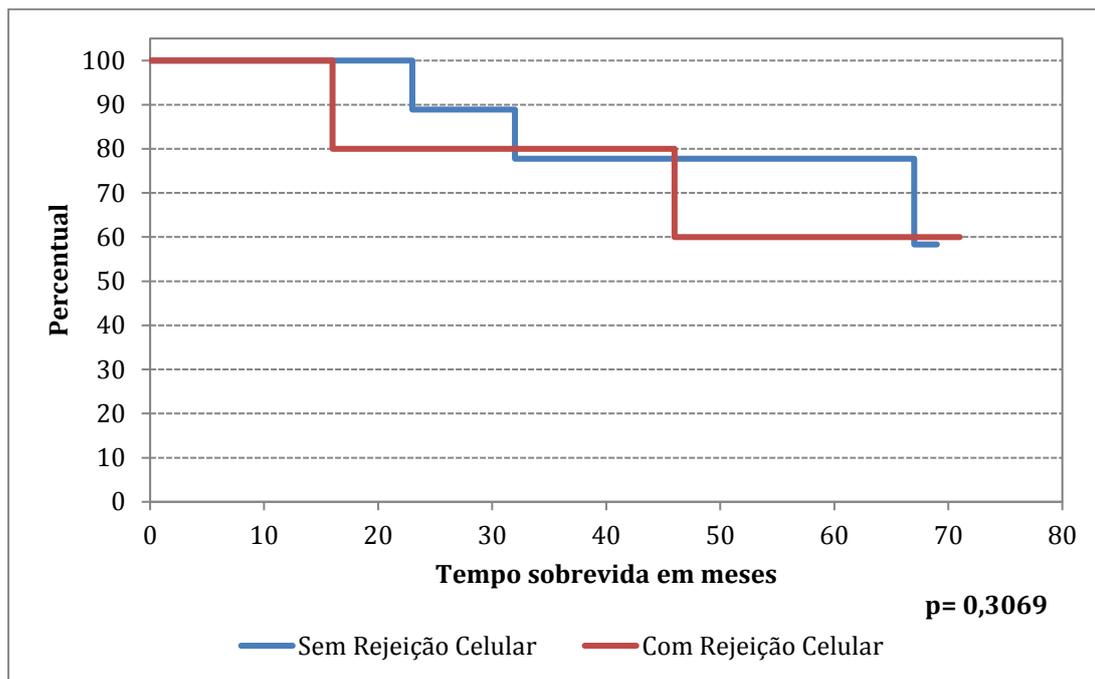
As figuras 18, 19 e 20 demonstram a sobrevida dos pacientes que transplantaram, comparando-se os que apresentaram episódio de rejeição (geral, RAMA e celular) com aqueles que não evoluíram com episódios de rejeição.



**Figura 18:** Sobrevida dos pacientes que transplantaram: pacientes com rejeição vs. sem rejeição

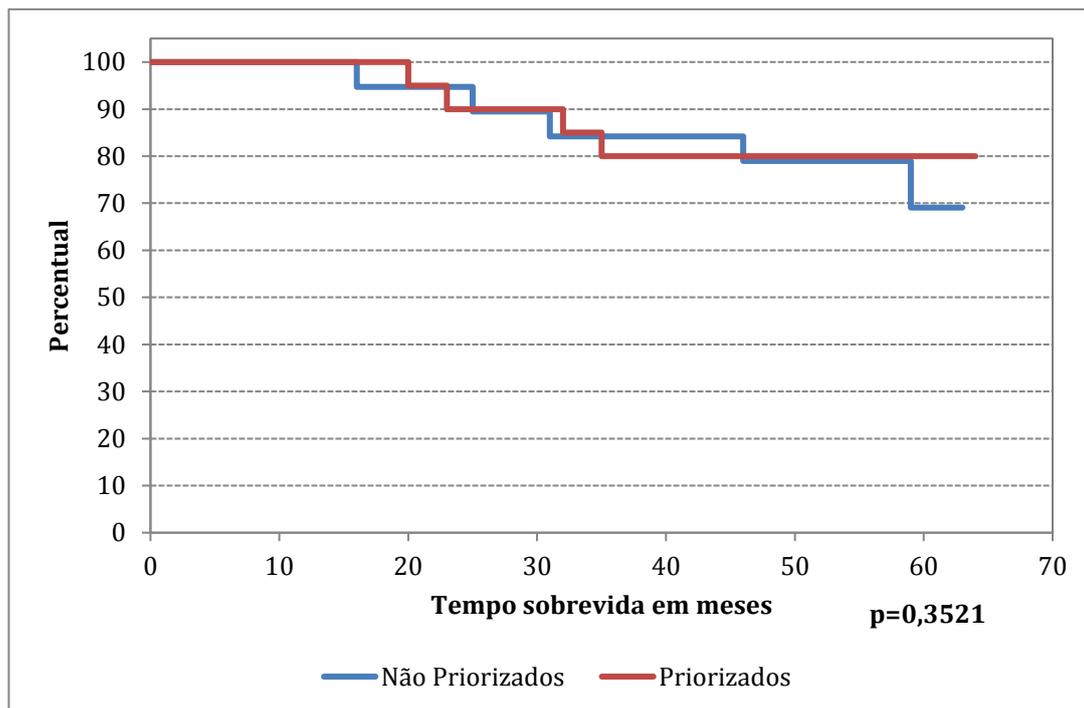


**Figura 19:** Sobrevida dos pacientes que transplantaram: pacientes com RAMA vs. sem RAMA



**Figura 20:** Sobrevida dos pacientes que transplantaram: com rejeição celular vs. sem rejeição celular

Comparando-se a sobrevida dos pacientes que se encontravam priorizados em lista, por falta de acesso para diálise, com a daqueles não priorizados, observou-se semelhança entre os dois grupos, como demonstrado na figura 21.



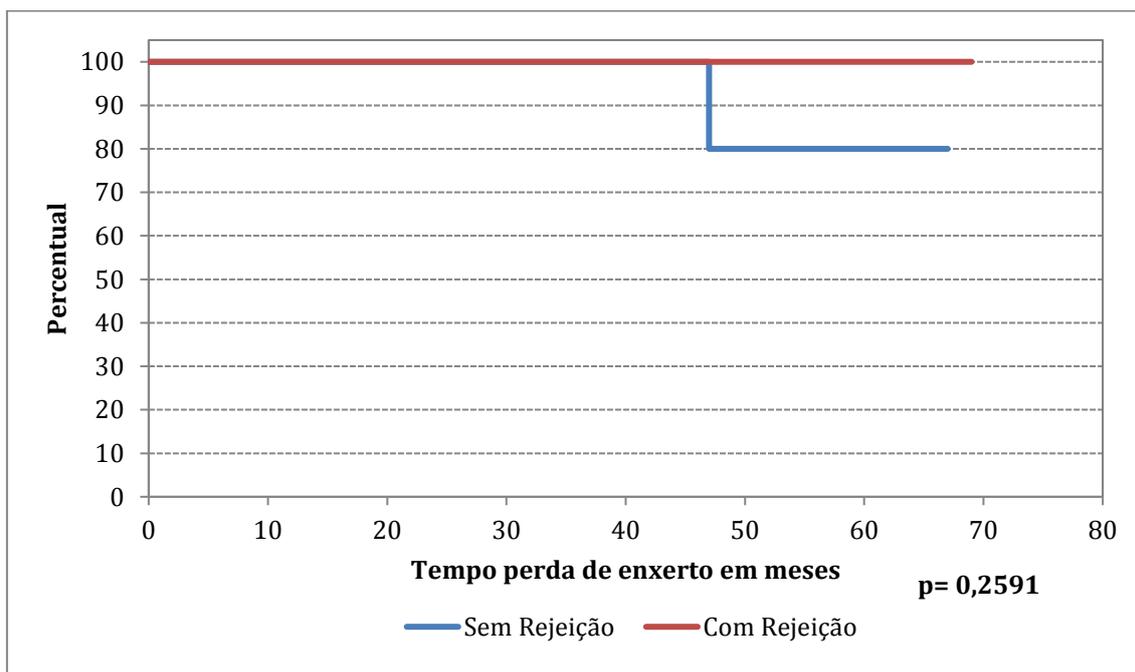
**Figura 21:** Sobrevida dos pacientes que transplantaram: priorizados vs. não priorizados

As causas de óbito dos pacientes que transplantaram estão demonstradas na figura 22. Infecção foi a causa mais frequente (71,42%) dos óbitos. As principais infecções que ocasionaram os óbitos foram as infecções relacionadas a cateteres em três pacientes (42,85%), nos PO 2, 130 e 402. Peritonite foi a causa do óbito em um paciente no PO 84 e broncopneumonia em outro paciente no PO 159. Complicação cirúrgica no transplante seguida por choque hemorrágico foi a causa do óbito de um paciente. O outro paciente falecido por choque hemorrágico encontrava-se em diálise no momento do óbito, após a perda do enxerto renal.

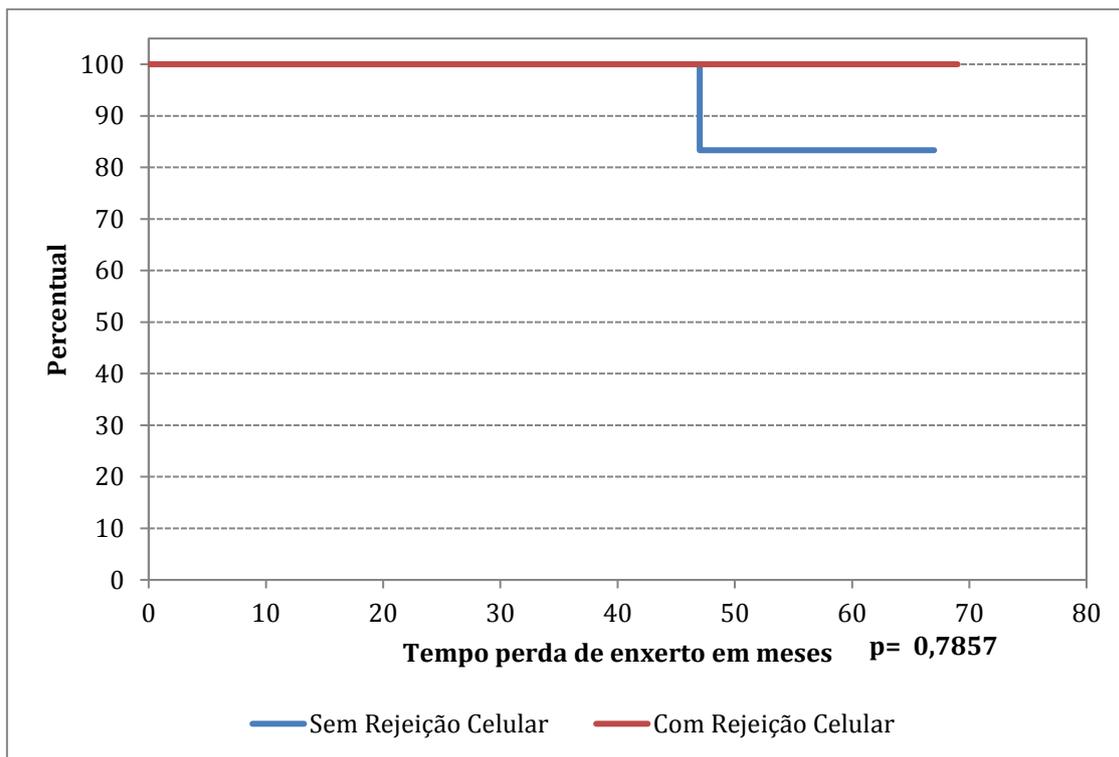
Nos pacientes transplantados (n=11), o óbito por infecção de cateter (3 casos) ocorreu em 2 pacientes (66.6%) priorizados por falta de acesso e em 1 paciente (33.3%) não priorizado. Nos pacientes não transplantados, os 2 pacientes que faleceram por infecção de cateter encontravam-se priorizados em lista por falta de acesso para diálise.

#### 4.2.3 Sobrevida do enxerto e causas de perda

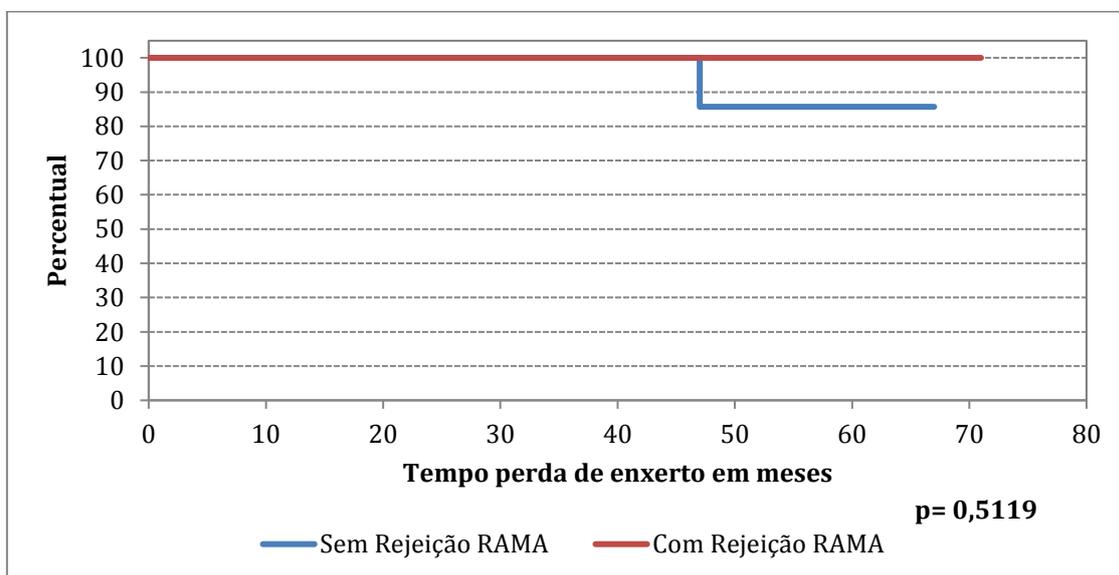
A sobrevida do enxerto censurada para óbito foi de 100% em 2 anos e 76,36% em 3 anos, sendo a nefropatia por BK (60%) a principal causa de perda de enxerto. A taxa de RAMA foi de 35,71% (tratados com aférese, Rituximabe e IVIG) com apenas 1 perda do enxerto devido à RCMA após 51 meses. A evolução dos enxertos renais dos pacientes que transplantaram foi avaliada, comparando-se os pacientes que apresentaram algum episódio de rejeição com os que não rejeitaram os enxertos, demonstrada nas figuras 23, 24 e 25, onde se apresentam as curvas de sobrevida de enxerto censurada para óbito.



**Figura 22:** Sobrevida do enxerto censurada para óbito: com rejeição vs. sem rejeição.



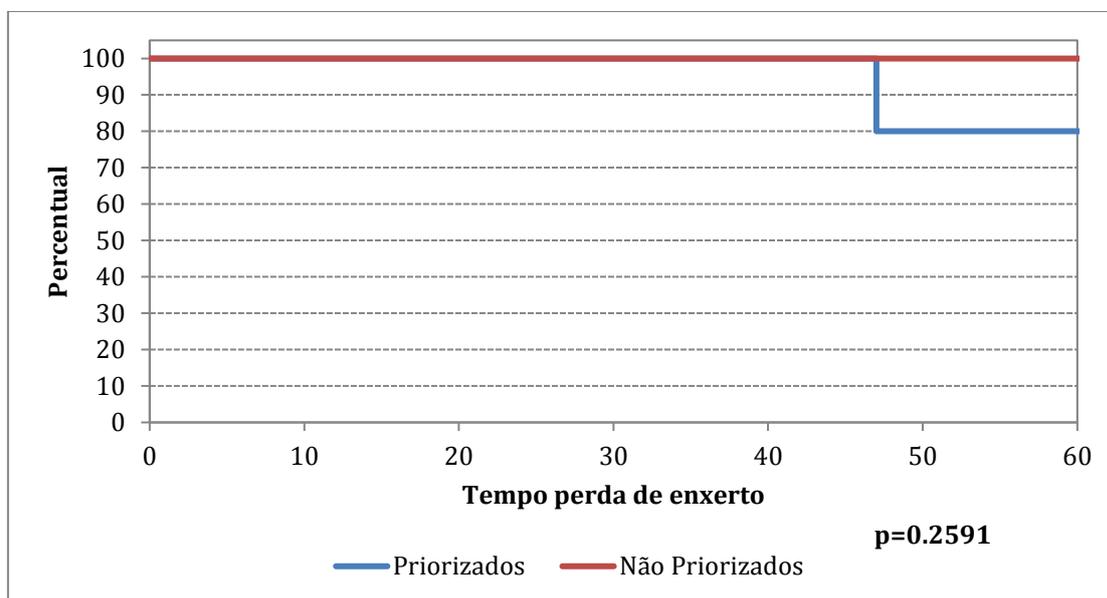
**Figura 23:** Sobrevida censurada para óbito dos enxertos sem rejeição vs. com rejeição celular



**Figura 24:** Sobrevida censurada para óbito dos enxertos, comparando-se pacientes sem RAMA vs. com RAMA

A sobrevida dos enxertos dos pacientes priorizados, comparada à dos

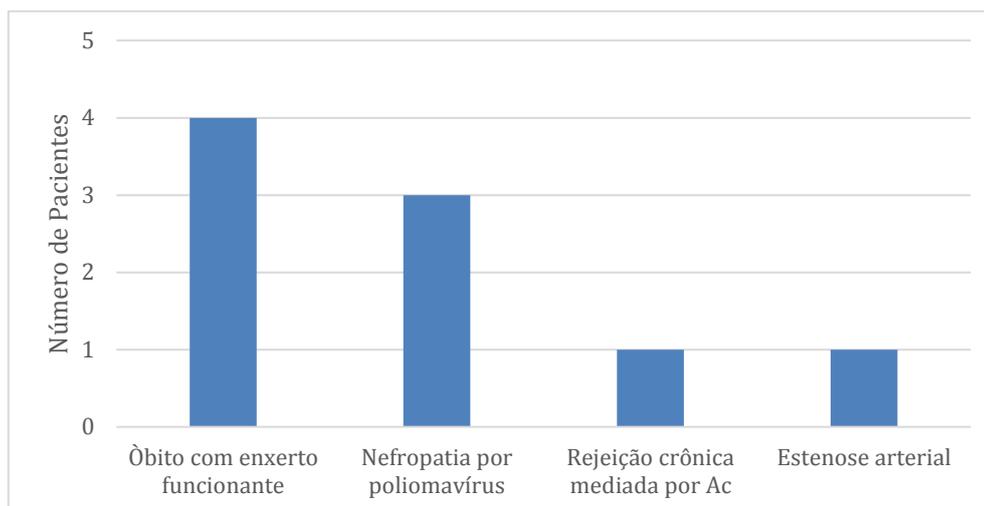
pacientes não priorizados, encontra-se demonstrada na figura 26.



**Figura 25:** Sobrevida dos enxertos censurada para óbito, comparando-se pacientes priorizados vs. não priorizados

Dentre os pacientes que transplantaram, quatro (28,57%) faleceram com rim funcionante. Dos pacientes restantes, cinco (35,71%) perderam o enxerto renal em média  $25,6 \pm 18,68$  meses após o transplante. Desses pacientes, três (30%) perderam o enxerto por nefropatia por poliomavírus, um paciente (10%) por RCMA e um paciente (10%) por estenose de artéria renal.

Dos três pacientes que perderam o enxerto por nefropatia por poliomavírus, um havia recebido tratamento para rejeição mediada por anticorpos com IVIg e Rituximabe, um recebeu tratamento para rejeição celular com corticoides e o outro paciente não apresentou episódio de rejeição. A perda do enxerto renal nesses casos ocorreu num tempo médio de  $464 \pm 505$  dias. As causas das perdas dos enxertos renais estão demonstradas na figura 27.



**Figura 26:** Causas de perda do enxerto renal

Em relação à evolução da creatinina média (mg/dl) da função renal estimada (MDRD, ml/min/1,73m<sup>2</sup>) e da relação proteína/creatinina urinária (relação uP/C em mg/g) durante o período de seguimento de 36 meses, não houve diferença entre os pacientes que rejeitaram e os que não rejeitaram. Os dados encontram-se demonstrados na tabela 14.

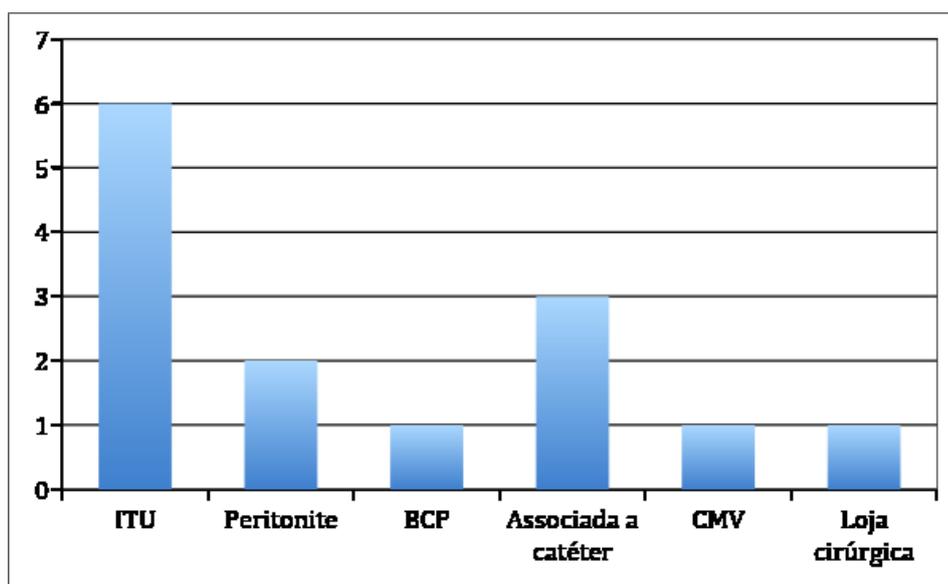
**Tabela 14:** Avaliação da função do enxerto renal dos pacientes que transplantaram e evoluíram com e sem rejeição

	Momento	Com rejeição (n=7)	Sem rejeição (n=7)	p value
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	Mês 1	2,4 ± 0,9	2,45 ± 1,39	p=0,668
	Mês 3	2,4 ± 1	2,9 ± 1,85	
	Mês 6	1,63 ± 0,78	2,9 ± 1,49	
	Mês 12	1,66 ± 1	2,95 ± 1,71	
	Mês 36	2,98 ± 1,45	3,69 ± 1,81	
<b>MDRD (ml/min/1,73m<sup>2</sup>)</b>	Mês 1	32,71 ± 18,47	37,59 ± 21	p=0,552
	Mês 3	36,27 ± 23,15	32,18 ± 13,54	
	Mês 6	53,34 ± 24,46	36,82 ± 24,14	
	Mês 12	53,8 ± 26,6	36,1 ± 22,61	
	Mês 36	26,81 ± 10,41	27,63 ± 15,22	
<b>Relação uP/C</b>	Mês 1	1,91 ± 1,77	2,62 ± 1,12	p=0,923
	Mês 3	1,23 ± 1,26	2,07 ± 1,39	

Mês 6	5,16 ± 1,62	2,64 ± 2,31
Mês 12	4,44 ± 1,89	2,61 ± 1,65
Mês 36	-	2 ± 2

#### 4.2.4 Complicações infecciosas pós-transplante

Em relação à ocorrência de eventos infecciosos precoces (até 90 dias após o transplante), 100% dos pacientes apresentaram alguma infecção, em média  $76,21 \pm 109,21$  dias após o transplante. A infecção precoce mais frequente foi a infecção do trato urinário (ITU) que ocorreu em seis pacientes (42,85%). A distribuição dos eventos infecciosos está demonstrada na figura 28.



**Figura 27:** Infecções precoces após o transplante renal

Dentre as complicações infecciosas tardias potencialmente associadas ao transplante e à imunossupressão, destacam-se três casos de nefropatia por poliomavírus, que ocorreram em média  $756 \pm 309$  dias após o transplante e um episódio de meningoencefalite herpética, que ocorreu 355 após o transplante.

Dentre os cinco pacientes que transplantaram e faleceram em decorrência de choque séptico, três (60%) não tiveram episódios de rejeição, dois (40%) haviam recebido tratamento para rejeição, mediada por anticorpos em um caso e mista no outro.

#### 4.2.5 Rejeição: tipos e impacto na evolução do transplante

Todos os pacientes que apresentaram alterações da função do enxerto foram submetidos a uma biópsia renal. No período de seguimento, sete pacientes (50%) apresentaram episódios de rejeição aguda, em média  $55 \pm 31,13$  dias após o transplante. A rejeição mediada por células ocorreu em dois pacientes (14,28%), outros dois pacientes evoluíram com episódios de RAMA e três pacientes (21,42%) apresentaram rejeição mista. A maioria dos episódios de rejeição ocorreu no primeiro ano de seguimento. Apenas um paciente evoluiu com novo episódio de rejeição após o primeiro ano de seguimento, no PO 487, tendo perdido o enxerto renal por RCMA, 50 meses após o transplante.

A distribuição dos episódios de rejeição encontra-se demonstrada na tabela 15.

**Tabela 15:** Distribuição dos episódios de rejeição

<b>Tipo de rejeição</b>	<b>N pacientes</b>	<b>Tempo médio pós-TX (dias)</b>
Rejeição celular	2 (14,28%)	$56,5 \pm 23,5$
RAMA	2 (14,28%)	$86,5 \pm 18,5$
Rejeição Mista	3 (21,42%)	$33 \pm 22,7$
Total	7 (50%)	$55 \pm 31,13$

A taxa global de ocorrência de rejeição mediada por Ac (RAMA e rejeição mista) foi de 35,71%. Dentre os pacientes que evoluíram com RAMA ou rejeição mista, 80% apresentava DSA no momento do transplante. Dos 14 pacientes que transplantaram, 8 (57%) apresentavam DSA. Destes, 4 (50%) evoluíram com episódio de RAMA durante o seguimento.

Foram realizadas 34 biópsias renais nos 14 pacientes que transplantaram, sendo 13 protocolares e 21 por persistência de disfunção do enxerto ou alteração da função renal (elevação de creatinina e/ou proteinúria), ao longo do seguimento. Entre os 13 pacientes (92,85%) submetidos a biópsias protocolares dos enxertos, entre o sexto e o décimo dia após o transplante, nove (69,23%) apresentaram diagnóstico de necrose tubular aguda (NTA), três (21,42%) apresentaram alterações indicativas de rejeição e um (7,69%) apresentou microangiopatia trombótica, aparentemente proveniente do doador.

As 21 biópsias realizadas por piora da função renal e/ou proteinúria aconteceram em média  $70,90 \pm 33,64$  dias após o transplante. O achado mais comum nas biópsias não protocolares foi a NTA, encontrada em cinco biópsias (23,80%), seguida pela rejeição mediada por anticorpos em quatro amostras (19,05%), rejeição celular em três amostras (14,28%), rejeição mista em três amostras (14,28%), e achados limítrofes para rejeição em uma amostra (4,75%). Outros achados, como arteriosclerose, glomeruloesclerose focal e segmentar (GESF), nefroesclerose benigna e nefropatia por poliomavírus, aconteceram em uma amostra cada. Uma amostra apresentava quantidade insuficiente de material para análise. Dentre os cinco pacientes (sete biópsias) que tiveram diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos (rejeição mediada por anticorpos e mista), três (60%) apresentavam marcação para C4d positivo difusamente na amostra.

As características dos pacientes que apresentaram episódios de rejeição (celular, mediada por anticorpos e mista) estão demonstradas na tabela 16.

**Tabela 16:** Características dos pacientes que transplantaram em relação à rejeição

Paciente	Tipo rejeição	PO rejeição	DSA no TX	DSA± MFI	Histologia	C4d
2	Celular	33	A31	2115	BANFF IIA	Neg
3	Mista	25	A2, DR4	3345	BANFF IIA arteriolite tubulite	Neg
4	RAMA	68	-	-	glomerulite, pericapilarite NTA	Neg
7	RAMA	105	B51, DR7	5251	glomerulite	Pos
9*	Mista	10	A31, DR4	5827	BANFF IB glomerulite	Pos
10*	Celular	80	-	-	BANFF IB NTA	Neg
12	Mista	64	A33, B35, DR16	10648	glomerulite	Pos
9*	RCMA	487	-	-	glomerulite	Pos

\* pacientes que evoluíram com perda do enxerto. ± Soma dos MFIs

Observação: não foi possível afastar a possibilidade de DSA anti-Cw e DQ nos casos 4 e 9 por falta de tipificação completa do doador.

Em relação à terapia de indução no momento do transplante, observou-se que dos 6 pacientes (42,85%) que receberam IVIg, apenas um paciente apresentou episódio de rejeição mista no primeiro mês após o transplante. Dentre os oito pacientes que não receberam IVIg na indução, quatro (50%) apresentavam DSA no momento do transplante. Nenhum desses pacientes apresentou episódio de rejeição mediada por anticorpos no primeiro mês após o transplante.

A taxa de rejeição mediada por anticorpos ao longo do tempo de seguimento nos pacientes com DSA no momento do transplante foi 55,5%, enquanto nenhum paciente que não apresentava DSA no momento do transplante evoluiu com

rejeição mediada por anticorpos,  $p=0,0454$ .

Os pacientes com diagnóstico de rejeição receberam tratamento, conforme os protocolos institucionais. O tratamento recebido e os resultados sobre o enxerto renal estão demonstrados na tabela 17.

**Tabela 17:** Tratamento e resposta dos episódios de rejeição (celular, RAMA, RCMA e mista)

Paciente	Sexo	Indução	Tipo rejeição	PO rejeição	Tratamento	Recuperação da função do enxerto
2*	F	ATG+IVIG	Celular	33	ATG	Parcial
3*	M	ATG+IVIG	Mista	25	ATG, IVIg, PF, Rituximabe	Parcial
4	F	ATG	RAMA	68	ATG, PF, Rituximabe	Parcial
7*	M	ATG	RAMA	105	IVIg, Rituximabe	Parcial
9*	F	ATG+IVIG	Mista	10	IVIg, PF	Parcial
10	F	ATG	Celular	80	Metilprednisolona, ATG	Parcial
12*	F	ATG	Mista	64	ATG, IVIg, PF, Rituximabe	Parcial
9 <sup>o</sup>	F	ATG+IVIG	RCMA	487	IVIg, PF	Não

\* :pacientes que possuíam DSA. <sup>o</sup>pacientes que perderam o enxerto por rejeição. I

VIg: imunoglobulina ATG: Timoglobulina PF: Plasmaferese RAMA: Rejeição aguda mediada por anticorpos RCMA: Rejeição crônica mediada por anticorpos.

Observou-se que somente os pacientes que apresentavam dois ou três DSA, no momento do transplante renal, apresentaram episódio de RAMA (100% x 0%),  $p=0,0286$ . Não houve impacto da rejeição na recuperação da função e perda do enxerto renal. Os resultados descritos estão demonstrados abaixo na tabela 18.

**Tabela 18:** Ocorrência de rejeição por número de DSA no momento do transplante

Número de DSA	1 (n=4)	2 (n=3)	3 (n=1)	p-value
Mediana do MFI-DSA	2868	2242	2104	0,4563
Somatória do MFI-DSA	1524 a 3862	3535 a 5827	10648	-
<b>Rejeição mediada por anticorpos</b>	<b>0 (0,0%)</b>	<b>3 (100,0%)</b>	<b>1 (100,0%)</b>	<b>0,0286</b>
Rejeição celular	1 (25,0%)	2 (66,7%)	1 (100,0%)	0,4857

### 4.3 Análise comparativa de sobrevida dos pacientes quanto à priorização e à transplantação.

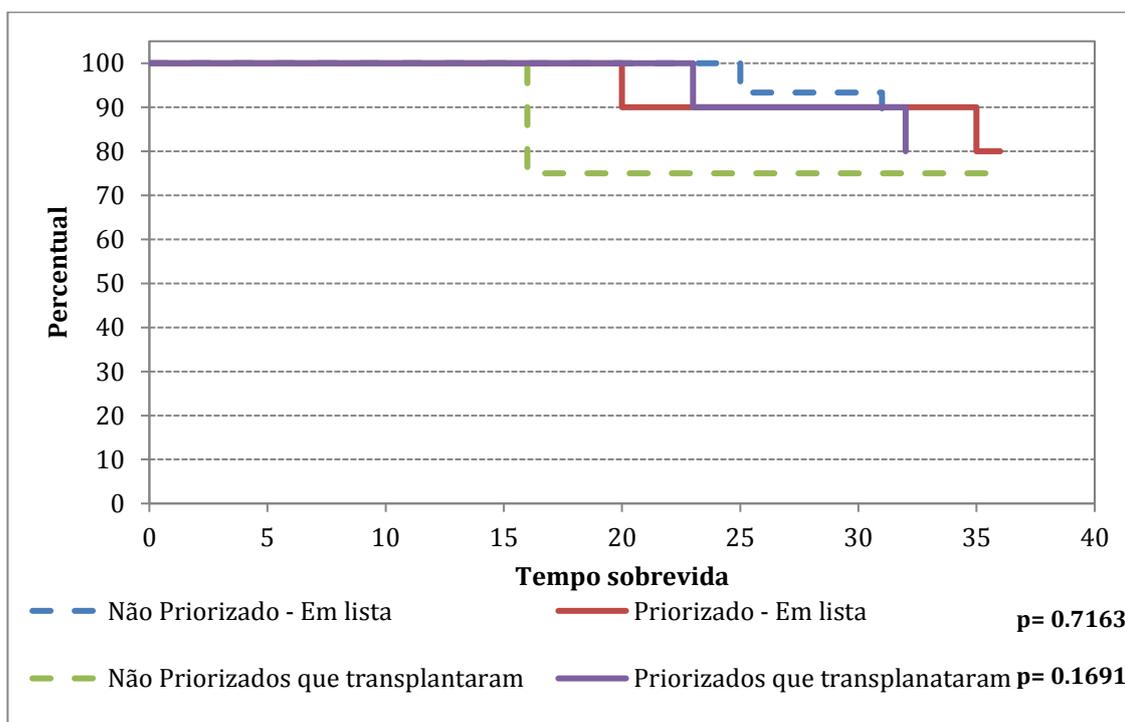
Dentre os 45 pacientes do estudo, 20 (44,4%) foram priorizados em lista por falta de acesso para diálise. A taxa de transplantação dos pacientes priorizados foi de 50% durante o período de seguimento, enquanto os pacientes não priorizados tiveram taxa de transplantação de 21% no mesmo período,  $p=0,0625$ . É importante ressaltar que todos os pacientes foram priorizados após avaliação pelo STR-HC-FMUSP e auditoria externa da SES-SP. A maioria dos pacientes (13 pacientes, 65%) foi priorizada em média 13+/-10 meses antes do início da terapia com IVIG.

Analisou-se se os pacientes priorizados, que transplantaram em maior número, haviam recebido mais doses de IVIG em menor período de tempo, e observou-se que os priorizados receberam em média 15+/-12 doses de IVIG em tempo médio de 27+/-16 meses enquanto os não priorizados receberam 12+/-8 doses em média durante 19+/- 15 meses ( $p=0,36$ ).

Foram analisadas as curvas de sobrevida, até o tempo médio de seguimento pós-transplante (18,18  $\pm$  16,67 meses), subdividindo-se os pacientes entre priorizados e não priorizados, que transplantaram ou permaneceram em lista. A

figura 29 demonstra as curvas de sobrevida dos 4 grupos de pacientes (priorizados que transplantaram, priorizados que permaneceram em lista, não priorizados que transplantaram e não priorizados que permaneceram em lista).

Para comparar as curvas entre priorizados e não priorizados, utilizou-se o teste Log-Rank separadamente para os pacientes que transplantaram e não transplantaram. Os *p-value* obtidos (pacientes que permaneceram em lista *p-value*=0.7163, pacientes que transplantaram *p-value*=0.1691) demonstram que não houve diferença significativa entre os grupos.



**Figura 28:** Curvas de sobrevida, comparando-se pacientes priorizados e não priorizados, que transplantaram e que permaneceram em lista

A maior parte dos pacientes faleceu devido a episódios infecciosos (71,42% dos óbitos dos pacientes que transplantaram e 33,3% dentre os que permaneceram em lista).

Os episódios de infecção foram relacionados ao acesso para diálise em todos os pacientes que faleceram por infecção, entre aqueles que permaneceram em lista, e em 60% dos casos de óbito por infecção, entre os pacientes que transplantaram.

As causas dos óbitos estão demonstradas na figura 30.

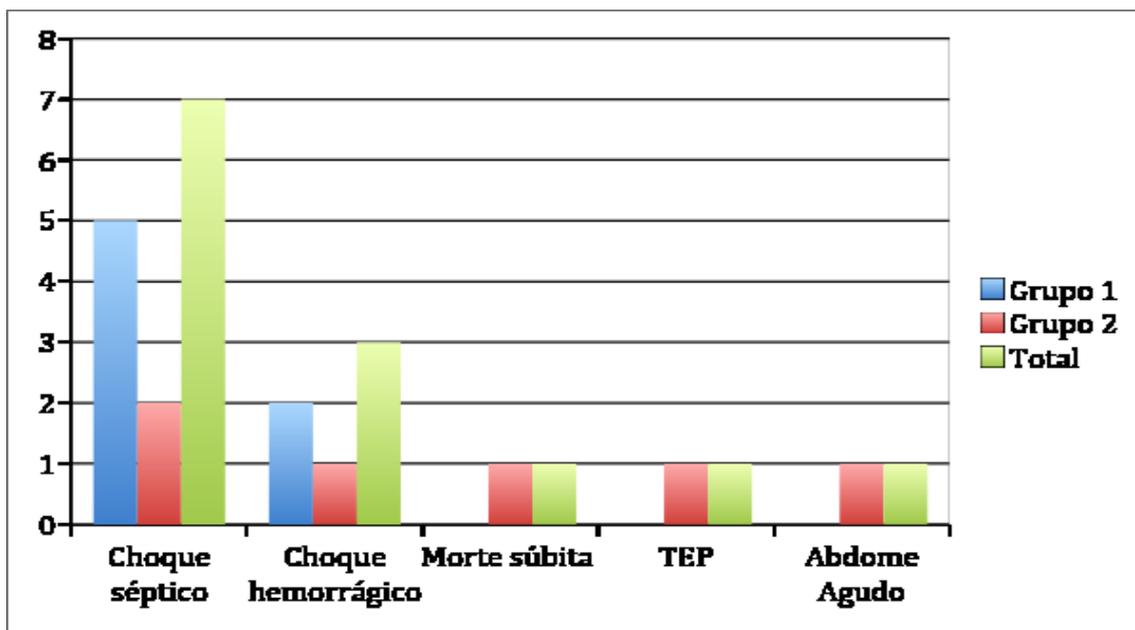


Figura 29: Causas dos óbitos dos pacientes do estudo

## 5. DISCUSSÃO

Estudos com o objetivo de avaliar o papel das terapias de dessensibilização para pacientes candidatos ao transplante renal apenas com doadores falecidos são pouco frequentes na literatura, principalmente utilizando protocolos baseados apenas em IVIg. Pacientes sensibilizados permanecem na lista por um longo tempo, aguardando um doador falecido e, no caso de pacientes altamente sensibilizados, o tempo de espera frequentemente impossibilita a transplantação devido ao alto índice de mortalidade em lista desses pacientes (2,7). Publicações anteriores demonstraram um papel importante da IVIg no tratamento desses pacientes (51, 55).

Os protocolos de dessensibilização avançaram nos últimos anos, utilizando drogas como Rituximabe (58-60), Bortezomibe (65-67), Tocilizumabe (68), inibidores da C1 esterase (71,72) e Endopeptidase IgG (69), dentre outras, com resultados promissores. No entanto, os países em desenvolvimento, muitas vezes, não têm recursos para estabelecer rapidamente protocolos contendo novos medicamentos, apesar dos bons resultados demonstrados. O acesso a IVIg tem sido mais fácil do que de outros medicamentos utilizados em protocolos de dessensibilização no Brasil. Apesar de o elevado custo dos protocolos de dessensibilização, o transplante renal em pacientes sensibilizados por meio da utilização desses protocolos tem-se mostrado custo efetivo, demonstrando menores custos que a manutenção desses pacientes indefinidamente em terapia dialítica (78,79).

O Brasil possui um dos maiores programas públicos de transplante de órgãos e tecidos do mundo, administrado pelo Sistema Nacional de Transplantes.

O financiamento público é responsável por mais de 90% dos transplantes realizados no país (3). No entanto, poucos centros no país assumem a realização de transplantes de alto risco imunológico, devido às maiores taxas de rejeição e custos associados a esses transplantes. Além disso, muitos centros de transplante não possuem um arsenal terapêutico adequado para o tratamento dessas complicações. As estratégias adotadas por países europeus e pelos EUA, objetivando aumentar o *pool* de potenciais doadores para pacientes sensibilizados, demonstraram aumento expressivo nas taxas de transplantação dessa população de pacientes com excelentes resultados, ressaltando ainda mais a necessidade de se discutir a questão em nosso país. No Brasil, desde a publicação da Portaria nº 2.600 em 2009 (30), nenhuma reforma no sistema de alocação de órgãos foi realizada. Alternativas, como a realização de transplantes com doação pareada, adotada conjuntamente a atualizações no sistema de alocação em diversos países com excelentes resultados (21), não são permitidas legalmente no Brasil. Transplantes com doadores ABO incompatíveis são realizados por alguns poucos serviços no país, não sendo uma alternativa para a imensa maioria dos pacientes.

É grande a importância deste estudo, ao demonstrar a redução significativa no tempo de espera em lista dos pacientes sensibilizados que não possuem um potencial doador vivo, utilizando apenas IVIg, mesmo com diversos complicadores inerentes à realidade do sistema de saúde. Os achados são semelhantes aos demonstrados no estudo IGO2 patrocinado pelo NIH, que demonstrou uma redução significativa do tempo de espera em lista para pacientes tratados com IVIG, no qual o tempo médio estimado para o transplante foi de 4,8 anos para o braço de IVIG contra 10,3 anos para o braço de placebo (53). A redução do tempo de espera em lista demonstrada pelos dados é extremamente impactante no cuidado desses

pacientes sensibilizados, que apresentam não apenas menor acesso ao transplante pela complexidade imunológica, mas também grande número de comorbidades e condições ameaçadoras à vida. Alguns deles apresentam graves problemas de acesso vascular que impactam na sobrevivência do paciente, não apenas durante a diálise, mas também após o transplante.

É importante ressaltar que, como esperado, os pacientes priorizados em lista por falência de acesso para diálise apresentaram transplantabilidade superior aos não priorizados. Demonstrou-se que um paciente dessensibilizado e priorizado possui uma chance de transplantar 6,64 vezes maior do que aqueles não priorizados. Tal resultado, provavelmente, justifica-se pelo maior número de doadores com os quais esses pacientes foram testados, aumentando suas chances de encontrar um doador contra o qual não possuam anticorpos ou que os possuam em títulos que possibilitem uma prova cruzada negativa e a realização do transplante.

O impacto do IVIg na redução de cPRA não está claro na literatura. O primeiro ensaio clínico desenhado para avaliar tal efeito - NIH-IGO2 (53) demonstrou redução de PRA, usando IVIg. Porém, o estudo foi realizado antes da tecnologia Luminex, utilizando a linfocitotoxicidade, teste com menor sensibilidade, o que pode ter interferido nos resultados. Outros estudos, entretanto, demonstraram que o cPRA não foi reduzido, utilizando-se apenas IVIg. Alachkar et al. analisaram 27 pacientes apresentando cPRA 100% que receberam IVIg 2g/Kg mensalmente por 4 meses e concluíram que nenhuma alteração ocorreu no cPRA (57). Este estudo foi capaz de demonstrar uma redução nos níveis de cPRA, utilizando apenas IVIg. Entretanto, a redução foi mais significativa entre os pacientes que permaneceram em lista, demonstrando a fragilidade do cPRA em prever os

resultados da dessensibilização com IVIg e as chances de transplante. A IVIg tem efeitos imunomoduladores, como anticorpos neutralizantes com anticorpos anti-idiotípicos, modificando a imunidade mediada por células e interferindo na ativação do complemento mediada por anticorpos (50). Isto pode estar relacionado com sua capacidade de aumentar a taxa de transplantes, apesar de não alterar significativamente o cPRA. Outras formas de avaliação dos efeitos da IVIg nos anticorpos anti-HLA podem ser mais precisas do que cPRA.

A intensidade média de fluorescência dos anticorpos anti-HLA diminuiu na maioria dos pacientes, conforme sugerido pela literatura (52, 56). Pôde-se demonstrar que o número de Ac diminuiu significativamente na categoria A, MFI até 1.500 (proporcionando o desaparecimento de alguns deles) e na categoria D, MFI entre 5.000 a 10.000. A redução dos números de tais Ac pode ter permitido a queda nos valores percentuais médios de cPRA observada na amostra, bem como a obtenção de provas cruzadas negativas e a transplantação. No entanto, os MFIs para anticorpos anti-HLA permaneceram estáveis ou até aumentaram em uma minoria de pacientes, demonstrando que o efeito não foi homogêneo.

A maioria dos pacientes transplantados com DSA apresentou uma redução significativa no iDSA em 70%. A redução do iDSA provavelmente desempenhou um papel significativo no transplante desses pacientes, reduzindo o MFI de níveis inaceitáveis para níveis incapazes de positivar as provas cruzadas.

Estudos recentes têm demonstrado a importância de se analisarem os subtipos IgG do iDSA (74), importando não só a intensidade da fluorescência, mas a proporção de IgG1 e, principalmente, IgG3, capaz de ativar o complemento, associada a maiores chances de RAMA. Na amostra, tal análise não foi realizada, o que pode explicar o transplante de pacientes que evoluíram com estabilidade ou

mesmo com aumento da iDSA.

Conforme demonstrado anteriormente por outros estudos, a ocorrência de RAMA é um problema em pacientes sensibilizados (53, 62), sendo associada à pior sobrevida do enxerto em longo prazo (56, 57). A taxa global de RAMA na amostra foi de 35,71% (80% dos pacientes apresentavam DSA no momento do transplante), semelhante a outros estudos utilizando IVIg, associado ou não a outras drogas para dessensibilização. Jordan et al. demonstraram uma taxa de rejeição de 45,8% vs. 10% no grupo placebo (53). Em outro estudo, Jordan et al. avaliaram o efeito da adição de Rituximabe a um regime de alta dose baseado em IVIg, mostrando que 50% dos pacientes tiveram episódios de rejeição aguda, com 30% dos pacientes experimentando RAMA (59). Mais recentemente, o protocolo baseado em IgG endopeptidase para DS demonstrou uma taxa de transplante de 96%, entretanto a taxa de RAMA permaneceu semelhante a outros protocolos, de 40% (69).

Os dados sobre a sobrevida de pacientes sensibilizados após o transplante são escassos no Brasil. Este estudo demonstrou uma sobrevida do paciente no primeiro ano de 93%, 85,71% após 24 meses e 78,57% após 36 meses, comparável à sobrevida de pacientes transplantados com doadores falecidos no Brasil (92% em 1 ano, 90% em 2 anos e 89% em 3 anos) (3). Os dados também são comparáveis à sobrevida apresentada pelos principais estudos nessa população. Jordan et al. demonstraram uma sobrevida do enxerto de 2 anos de 80% e nenhuma diferença na sobrevida do enxerto ou do paciente até 5 anos após o transplante, comparando 372 pacientes dessensibilizados e 538 não dessensibilizados (53). Vo et al., usando Rituximabe e IVIg, obtiveram uma taxa de sobrevida do enxerto de 94% após 12 meses. Jordan et al. estudaram a Endopeptidase IgG para dessensibilizar

pacientes e apenas um enxerto perdido em 24 transplantes realizados, porém com tempo de seguimento de apenas 6 meses (69).

Em análise anterior, o grupo avaliou a sobrevida dos pacientes sensibilizados (cPRA diferente de zero) que realizaram transplante renal em nosso serviço, avaliando 1.002 transplantes consecutivos em adultos, realizados entre 2009 e 2013 e obteve 88% de sobrevida no primeiro ano nesse grupo, sobrevida igual à dos pacientes não sensibilizados transplantados no mesmo período, 87,6% (75). Dados multicêntricos publicados sugerem uma vantagem de sobrevida para pacientes submetidos à dessensibilização, seguida de transplante com doador vivo ou falecido, em comparação com aqueles que permaneceram em lista (76,77). O grupo também comparou, em outro estudo, a mortalidade de pacientes inscritos em lista no Estado de São Paulo com aquela dos sensibilizados submetidos a transplante renal em nosso serviço em 2012, demonstrando uma mortalidade de 11% em 32 meses, 4,12% ao ano em nosso centro, semelhante à mortalidade geral de 5,61% dos pacientes em lista no estado (75). Neste estudo, de maneira semelhante, não se pôde demonstrar sobrevida superior dos pacientes transplantados em comparação com aqueles que permaneceram em lista. Isto poderia ser explicado pelas condições de saúde extremamente comprometidas dos pacientes. A maioria dos pacientes transplantados havia sido priorizada em lista devido à falha do acesso vascular e/ou à impossibilidade de realizar diálise peritoneal, encontrava-se há muito tempo em terapia renal substitutiva e possuía inúmeras comorbidades. As complicações relacionadas ao acesso para diálise foram a causa de 70% dos óbitos dos pacientes transplantados (quatro pacientes faleceram em decorrência de sepse relacionada ao cateter de hemodiálise e um por peritonite). Complicações vasculares durante e após cirurgia foram a causa dos

outros dois óbitos, demonstrando que as condições vasculares desses pacientes, provavelmente já se encontravam muito comprometidas.

A sobrevida do enxerto censurada por óbito após 24 meses foi de 100% e 76,36% após 36 meses, sendo a principal causa de perda do enxerto a nefropatia BK (60%) após uma média de 26 meses após o TX. Quando comparada com a sobrevida global do enxerto de transplantes falecidos no Brasil (1 ano = 85%, 2 anos = 81% e 3 anos = 78%) (3), os dados não mostram diferença, o mesmo demonstrado com a sobrevida dos pacientes.

Apesar de todas as dificuldades enfrentadas na dessensibilização desses pacientes, obtiveram-se resultados comparáveis aos dos principais serviços de transplante que atualmente adotam protocolos de dessensibilização.

Na amostra, a ocorrência de RAMA não teve impacto na sobrevida do enxerto e apenas um paciente perdeu o enxerto por causa imunológica (RCMA), tendo sido a infecção por poliomavírus a causa mais frequente de perda do enxerto. Reconhecem-se as limitações deste estudo, uma análise retrospectiva de uma pequena amostra de pacientes. O acréscimo de um grupo controle de pacientes não tratados com IVIg poderia ter ajudado, evidenciando a taxa de transplante de pacientes sensibilizados não tratados com IVIg, como a sobrevida desses pacientes em lista. Outra limitação estava relacionada às dificuldades de fornecimento de IVIg que impossibilitavam a administração mensal do medicamento, além da variedade de formulações de IVIg fornecidas pelo governo.

## 6. CONCLUSÃO

Em resumo, pôde-se demonstrar que a dessensibilização, usando apenas IVIg, foi eficaz e segura na redução de cPRA, reduzindo o tempo de espera para o transplante renal em pacientes altamente sensibilizados que não têm possibilidade de um transplante de doador vivo, especialmente pacientes em prioridade por falta de acesso para diálise. Considerou-se que o longo tempo em diálise, com consequentes comorbidades e problemas de acesso vascular, deve ser evitado para garantir os benefícios do transplante também em pacientes altamente sensibilizados. Políticas públicas de alocação e, quando necessários, protocolos de dessensibilização devem ser oferecidos mais cedo a esses pacientes, permitindo maiores chances de transplantação e melhores resultados.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Saran R, Robinson B, Abbott KC, et al. US Renal Data System 2017 Annual Data Report: epidemiology of kidney disease in the United States. *Am J Kidney Dis*. 2018;71(3) (suppl 1): S1-S672.
2. Port FK, Wolfe RA, Mauger EA, Berling DP, Jiang k. Comparison of survival probabilities for dialysis patients vs cadaveric renal transplant recipients. *J Am Med Assoc*. 1993; 270:1339-43.
3. Registro Brasileiro de Transplantes 2019. [acesso em 12 mar. 2020]. Disponível em: [www.abto.org.br](http://www.abto.org.br).
4. Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. [acesso em 18 mar. 2020]. Disponível em: [www.saude.sp.gov.br](http://www.saude.sp.gov.br).
5. Heidt S, Witvliet MD, Haasnoot GW, Claas FH. The 25th anniversary of the eurotransplant acceptable mismatch program for highly sensitized patients. *Transpl Immunol*. 2015; 33:51-57.
6. United Network for Organ Sharing home page. [acesso em 12 mar. 2018]. Disponível em: <http://www.unos.org>.
7. Censo Brasileiro de Diálise 2019. [acesso em 12 mar. 2020]. Disponível em: [www.sbn.org.br](http://www.sbn.org.br).
8. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in Kidney Transplantation. *N Eng J Med* 1969; 280:735-39.
9. Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, et al. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 1966; 7465:662-65.

10. Sayegh MH, Watschinger B, Carpenter CB. Mechanisms of T cell recognition of alloantigen. The role of peptides. *Transplantation*. 1994; 56:1295-0.
11. Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med*. 1998; 338:1813-21.
12. Coelho V, Spadafora-Ferreira M, Marrero I, Fonseca JA, Portugal K, Kalil J. Evidence of indirect allorecognition in long term human renal transplantation. *Clin Immunol*. 1999; 90:220-29.
13. Afzali B, Lechler RI, Hernandez-Fuentes MP. Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens*. 2007; 69:545-56.
14. Rocha PN, Plumb TJ, Crowsley SD, Coffman TM. Effector mechanism in transplant rejection. *Immunol Rev*. 2003; 196:51-54.
15. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA A2. *Nature*. 1987; 329:506-12.
16. Helloran PF, Madrenas J. Regulation of MHC transcription. *Transplantation*. 1990; 50:725-38.
17. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, et al. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I Histocompatibility Antigens. *Nature*. 1987; 329:512-18.
18. Cornell, L. D., Smith, R. N. e Colvin, R. B. Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *Annu Rev Pathol*. 2008; 3:189-220.
19. Dierselhuis M, Goulmy E. The relevance of minor histocompatibility antigens in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2009; 14:419-25.
20. Morath C, Zeier M, Döhler B, Opelz G, Süsal C. ABO-Incompatible Kidney Transplantation. *Front Immunol*. 2017; 8:234.

21. Montgomery RA. Renal transplantation across HLA and ABO antibody barriers: integrating paired donation into desensitization protocols. *Am J Transplant.* 2010; 10:449–57.
22. Mizutani K, Terasaki PI, Shih RNJ, Pei R, Ozawa M, Lee J. Frequency of MIC Antibody in Rejected Renal Transplant Patients without HLA Antibody. *Hum Immunol.* 2006; 67:223-29.
23. Zwirner NW, Marcos CY, Mirbaha F, Zou Y, Stastny P. Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. *Hum Immunol.* 200; 61:917-24.
24. Glotz D, Lucchiari N, Pegaz-Fiornet B, Suberbielle-Boissel C. Endothelial cells as targets of allograft rejection. *Transplantation.* 2006; 82(suppl):S19-21.
25. Dragun D, Catar R, Philippe A. Non-HLA antibodies against endothelial targets bridging allo- and autoimmunity. *Kid Intern.* 2016; 90:280-88.
26. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant.* 2004; 4:378-83.
27. Gajewski TF, Schell SR, Nau G, Fitch FW. Regulation of T-cell activation: differences among T-cell subsets. *Immunol Rev.* 1989; 111:79-110.
28. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the Kidney Allograft. *N Engl J Med.* 2010; 363:1451-62.
29. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant.* 2003; 3:665-73.
30. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18:1046-56.
31. Haas M, Sis B, Racusen LC, et al; Banff meeting report writing committee.

Banff 2013 meeting report: inclusion of C4d negative antibody-mediated rejection and antibody associated arterial lesions. *Am J Transplant.* 2014; 14:272-83.

32. Redfield RR, Ellis TM, Zhong W, et al. Current outcomes of chronic active antibody mediated rejection—a large single center retrospective review using the updated Banff 2013 criteria. *Hum Immunol.* 2016; 77: 346-52.

33. Orandi BJ, Luo X, Massie AB, Garonzik-Wang JM, Lonze BE, Ahmed R, Segev DL. Survival Benefit with Kidney Transplants from HLA-Incompatible Live Donors. *N Engl J Med* 2016; 374(10): 940–950.

34. Jordan SC, Vo AA. Desensitization offers hope to highly HLA-sensitized patients for a longer life expectancy after incompatible kidney transplant. *Am J Kidney Dis.* 2012; 59:758-60.

35. Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais. [acesso em 18 mar. 2018]. Disponível em: <http://www.saude.mg.gov.br>.

36. Akgul SU, Ciftci HS, Temurhan S, Caliskan Y, Bayraktar A, Tefik T, et al. Association Between HLA Antibodies and Different Sensitization Events in Renal Transplant Candidates. *Transplant Proc.* 2017;49:425-29.

37. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, et al. Preexisting donor specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2010; 21:1398-06.

38. Lee PC, Zhu L, Terasaki PI, Everly MJ. HLA-specific antibodies developed in the first year post transplant are predictive of chronic rejection and renal graft loss. *Transplantation.* 2009; 88:568-74.

39. Brasil. Lei n. 9.434, de 04 de fevereiro de 1997. Dispõe sobre a Remoção de Órgãos, Tecidos e Partes do Corpo Humano para fins de Transplante e Tratamento e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 1997. Seção 1, p. 641.

[acesso em 18 mar. 2018]. Disponível em:

<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/centraldetransplantes/Lei9434.pdf>..

40. Ministério da Saúde. Portaria n. 2.600, de 21 de outubro de 2009. Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes. Diário Oficial da União, Brasília, 2009. Seção 1, sup. p 288. [acesso em 18 mar. 2018]. Disponível em:

[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt2600\\_21\\_10\\_2009.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt2600_21_10_2009.html).

41. Heidt S, Witvliet MD, Haasnoot GW, Claas FH. The 25th anniversary of the eurotransplant acceptable mismatch program for highly sensitized patients. *Transpl Immunol*. 2015; 33:51-57.

42. UNOS allocation scheme. [acesso em 18 mar. 2018]. Disponível em:

[https://optn.transplant.hrsa.gov/media/1200/optn\\_policies.pdf#nameddest=Policy](https://optn.transplant.hrsa.gov/media/1200/optn_policies.pdf#nameddest=Policy)

43. UNOS KAS. [acesso em 18 mar. 2018]. Disponível em:

[https://optn.transplant.hrsa.gov/media/1178/kas\\_report\\_06-2015.pdf](https://optn.transplant.hrsa.gov/media/1178/kas_report_06-2015.pdf)..

44. Stewart DE, Kucheryavaya AY, N.A. Turgeon, Formica RN, Aeder MI. Changes in deceased donor kidney transplantation one year after KAS implementation. *Am. J. Transplant*. 2016; 16:1834.

45. Wang CJ, et al. Old versus new: Progress in reaching the goals of the new kidney allocation system. *Hum. Immunol*. 2017; 78:9–15.

46. Duquesnoy RJ. The antibody response to an HLA mismatch: a model for nonself-self discrimination in relation to HLA epitope immunogenicity. *Internat J Immunogen*. 2011; 39:1-9.

47. Sousa LCDM, Sales Filho HLA, Von Ghlen CQC, Da Silva AS, Dos Santos Neto PA, Castro JAF, Monte SJH. EpHLA: an innovative and user-friendly software automating the HLA Matchmaker algorithm for antibody analysis. *Transplant Immunology*. 2011; 25:210-16.

48. Rapaport FT. The case for a living emotionally related international kidney donor exchange registry. *Transplant Proc.* 1986; 18(3) Suppl. 2):5-9.
49. Sethi S, Choi J, Toyoda M, Vo AA, Peng A, Jordan SC. Desensitization: Overcoming the Immunologic Barriers to Transplantation. *J Immunol Resear.* 2017; 17:11 pages.
50. Kazatchkine MD, Kaveri DVM. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N Engl J Med.* 2001; 345:747-55.
51. Glotz D, Antoine C, Julia P, Suberbielle-Boissel C, Bouldjeltia S, Fraoui R, et al. Desensitization and subsequent kidney transplantation of patients using intravenous immunoglobulins (IVIg). *Am J Transplant.* 2002; 2(8):758-60.
52. Jordan SC, Vo AA, Bunnapradist S, Toyoda M, Peng A, Puliyaanda D, Kamil E, Tyan D. Intravenous immune globulin treatment inhibits crossmatch positivity and allows for successful transplantation of incompatible organs in living-donor and cadaver recipients. *Transplantation* 2003; 76:631-36.
53. Jordan SC, Tyan D, Stablein D, et al. Evaluation of intravenous immunoglobulin as an agent to lower allosensitization and improve transplantation in highly sensitized adult patients with end-stage renal disease: Report of the NIH IGO2 Trial. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15: 3256-62.
54. Jordan SC, Vo AA, Peng A, Toyoda M, Tyan D. Intravenous Gamma Globulin (IVIg): A Novel Approach to Improve transplant rates and outcomes in Highly HLA-Sensitized Patients. *Am J Transplant.* 2006; 6(3):459-66.
55. Jordan Sc, Vo A, Bunnapradist S, Toyoda M, Peng A, Puliyaanda D, Kamil E, Tyan D. Intravenous immune globulin treatment inhibits crossmatch positivity and

allows for successful transplantation of incompatible organs in living-donor and cadaver recipients. *Transplantation* 2003; 76: 631-36.

56. Montgomery RA, Lonze BE, King KE, et al. Desensitization in HLA-incompatible kidney recipients and survival. *N Engl J Med*. 2011; 365: 378.

57. Alachkar N, Lonze BE, Zachary AA, Holechek MJ, Schillinger K, Montgomery RA, et al. Infusion of high-dose intravenous immunoglobulin fails to lower the strength of human leukocyte antigen antibodies in highly sensitized patients. *Transplantation*. 2012;94(2):165-71.

58. Vo AA, Choi, Cisneros J, et al. Benefits of Rituximabe combined with intravenous immunoglobulin for desensitization in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2014; 98: 312-19.

59. Vo AA, Lukovsky M, Toyoda M, et al. Rituximabe and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation. *New Engl J Med* 2008; 359: 242-51.

60. Vo AA, Peng A, Toyoda M, et al. Use of intravenous immune globulin and Rituximabe for desensitization of highly HLA sensitized patients awaiting kidney transplantation. *Transplantation* 2010; 89: 1095-02.

61. Zachary AA, Lucas DP, Montgomery RA, Leffell MS. Rituximabe prevents an anamnestic response in patients with cryptic sensitization to HLA. *Transplantation* 2013; 95: 701-04.

62. Kohei N, Hirai T, Omoto K, Ishida H, Tanabe K. Chronic antibody-mediated rejection is reduced by targeting B-cell immunity during an introductory period. *Am J Transplant* 2012; 12(2): 469-76.

63. Barbosa D, Kahwaji J, Puliyaanda D, et al. Polyomavirus BK viremia in kidney transplant recipients after desensitization with IVIG and Rituximabe. *Transplantation*

2014; 97: 755-61.

64. Kahwaji J, Sinha A, Toyoda M, et al. Infectious complications in kidney transplant recipients desensitized with Rituximabe and intravenous immunoglobulin.

*Clin J Am Soc Neph.* 2011; 12(6): 2894-00.

65. De Sousa-Amorim E, Revuelta I, Diekmann F, et al. Bortezomibe for refractory acute antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients: a single-

centre case series. *Nephrology* 2016; 21(8): 700-04.

66. Woodle ES, Shields AR, Ejaz NS, et al. Prospective iterative trial of proteasome inhibitor-based desensitization. *Am J Transp* 2015; 15(1):101-18.

67. Jeong JC, Jambaldorj E, Kwon HY, et al. Desensitization using Bortezomibe and high-dose immunoglobulin increases rate of deceased donor kidney transplantation. *Medicine* 2016; 95(5), Article ID e2635.

68. Vo AA, Choi J, Kim I, et al. A phase I/II trial of the interleukin-6 receptor-specific humanized monoclonal (Tocilizumab) + intravenous immunoglobulin in difficult to desensitize patients. *Transplantation* 2015; 99(11): 2356-63.

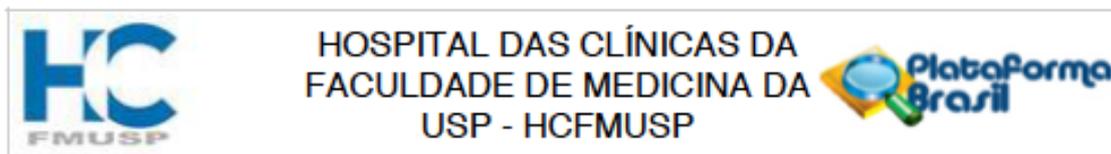
69. Jordan SC, Lorant T, Kjellman C, Winstedt L, Bengtsson M, Zhang X, et al. IgG Endopeptidase in Highly Sensitized Patients Undergoing Transplantation. *N Engl J Med* 2017; 377: 442-53.

70. Cornell LD, Schinstock CA, Gandhi MJ, Kremers WK, Stegall MD. Positive crossmatch kidney transplant recipients treated with Eculizumabe: outcomes beyond 1 year. *Am J Transplant.* 2015; 15(5): 1298-02.

71. Montgomery RA, Orandi BJ, Racusen L, et al. Plasma derived C1 esterase inhibitor for acute antibody-mediated rejection following kidney transplantation: results of a randomized double-blind placebo-controlled pilot study. *Am J Transplant.* 2016; 16(12): 3468-78.

72. Berger M, Lefaucheur C, Jordan SC. Update on C1 Esterase Inhibitor in Human Solid Organ Transplantation. *Transplantation*. 2019;103(9): 1763-1775.
73. Houp JA, Schillinger KP, Eckstein AJ, Vega RM, Desai NM, Lonze BE. Casting a smaller net into a bigger donor pool: A single center's experience with the new kidney allocation system. *Hum Immunol*. 2017; 78:49–53.
74. Lefaucheur C, Viglietti D, Bentelejewski C, Duong van Huyen JP, Vernerey D, Aubert O, Glotz D, et al. IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2016; 27(1):293-304.
75. Aguirre AR, Souza PS, Agena F, et al. Vale a pena transplantar o paciente sensibilizado? Uma análise retrospectiva unicêntrica de 1002 transplantes consecutivos. In: *Anais do XIV Congresso Brasileiro de Transplantes*. 2015.
76. Stewart DE, Klassen DK: Kidney transplants from HLA-incompatible live donors and survival. *N Engl J Med*. 2016; 375:287-288.
77. Schold J, Srinivas TR, Sehgal AR, Meier-Kriesche HU. Half of kidney transplant candidates who are older than 60 years now placed on the waiting list will die before receiving a deceased-donor transplant. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4(7):1239-45.
78. Jordan SC, Cunningham-Rundles C, McEwan R: Utility of intravenous gamma globulin in kidney transplantation: Efficacy, safety, and cost implications. *Am J Transplant*. 2003; 3: 653–664.
79. Al-Jedai A, Alsultan M, Almeshari K, Alshaibani K, Elgamal H, Alkortas D, et al. Cost analysis of kidney transplantation in highly sensitized recipients compared to intermittent maintenance hemodialysis. *Ann Transplant*. 2012;17(4):82-91.

## ANEXO I

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação do efeito da dessensibilização com Imunoglobulina polivalente sobre o perfil de anticorpos anti-HLA e a incidência de transplantação de pacientes hipersensibilizados candidatos a transplante renal com doador falecido.

**Pesquisador:** maria cristina ribeiro de castro

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 55329116.6.0000.0068

**Instituição Proponente:** HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.629.278

**Apresentação do Projeto:**

Projeto submetido e aprovado pela CAPPesq com a inclusão nesta solicitação da carta enviada ao Departamento de CM. Trata-se de projeto retrospectivo de Avaliação do efeito da dessensibilização com Imunoglobulina polivalente sobre o perfil de anticorpos anti-HLA e a incidência de transplantação de pacientes hipersensibilizados candidatos a transplante renal com doador falecido.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:** Objetivo primário: avaliar o impacto do uso de altas doses de Imunoglobulina polivalente (IVIG) no número e nos títulos de anticorpos anti-HLA e na prova cruzada de pacientes sensibilizados, candidatos a transplante renal com doador vivo contra quem apresentavam prova cruzada positiva.

**Objetivo Secundário:** Objetivo secundário: avaliar os resultados de sobrevida do paciente, sobrevida do enxerto e função renal dos pacientes transplantados com doador vivo após dessensibilização com altas doses de IVIg.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** Não existe risco para a população estudada por ser um estudo retrospectivo baseado na análise de prontuários.

**Benefícios:** Ampliar a possibilidade de transplante dos paciente com doador vivo mas que possuem prova cruzada positiva.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Estudo unicentrico utilizando 45 pacientes do HCFMUSP, retrospectivo de avaliação do efeito da dessensibilização com Imunoglobulina polivalente sobre o perfil de anticorpos anti-HLA e a incidência de transplantação de pacientes hipersensibilizados candidatos a transplante renal com doador falecido. Serão utilizados dados de prontuários HC FMUSP de 2003 a 2013. Os desfechos objetivam além de demonstrar o possivel impacto da administração de Imunoglobulina em dose alta sobre o número, titulo dos anticorpos anti- HLA e provas cruzadas, avaliar o impacto deste tratamento sobre a taxa de transplantação dos pacientes hipersensibilizados com doador vivo contra quem apresentem prova cruzada positiva. O estudo propõe-se ainda a avaliar os riscos da administração de altas doses de IVIG no periodo dialitico. O estudo tem orçamento dos próprios pesquisadores. Por ser retrospectivo propõe dispensa do TCLE.

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

Foram apresentados os seguintes documentos: Anuência do Laboratório de Imunologia do In Cor, Folha de rosto assinada, Justificativa de ausência de TCLE, Cadastro on line, Carta de esclarecimento a CAPPesq de correção de preenchimento de formulário na plataforma, Carta de encaminhamento a chefe do Departamento de CM Projeto de Mestrado de Jenaine Paixão sob orientação de DRA MARIA CRISTINA RIBEIRO DE CASTRO.

**Recomendações:**

Aprovado.

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

Aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da

<b>Endereço:</b> Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar			
<b>Bairro:</b> Cerqueira Cesar		<b>CEP:</b> 05.403-010	
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> SAO PAULO		
<b>Telefone:</b> (11)2661-7585	<b>Fax:</b> (11)2661-7585	<b>E-mail:</b> cappesq.adm@hc.fm.usp.br	

**ANEXO II****Classificação de Banff 2009****Rejeição aguda/ativa mediada por anticorpos:**

1. Evidência morfológica de lesão tecidual aguda, como:

- Tipo 1 - Necrose tubular aguda; ou
- Tipo 2 - Neutrófilos e/ou células mononucleares em capilares peritubulares e/ou glomérulos, e/ou trombose capilar; ou ainda,
- Tipo 3 - Arterite intimal /necrose fibrinoide / arterite intramural ou transmural

2. Evidência imunopatológica de ação de anticorpos, como:

- Deposição de C4d; e/ou,
- Deposição de imunoglobulinas nos capilares peritubulares (raro); ou ainda,
- Deposição de imunoglobulinas e complemento nas áreas de necrose arterial fibrinoide.

3. Evidência sorológica de anticorpos circulantes, como:

- Presença de anticorpos dirigidos contra antígenos HLA do doador; ou,
- Presença de anticorpos contra outros antígenos endoteliais do doador (anticorpos não-HLA).

**Rejeição crônica/ativa mediada por anticorpos:**

## 1. Evidência morfológica de lesão tecidual, como:

- Duplicação (“duplo contorno”) da membrana basal glomerular; e/ou,
- Multilaminação da membrana basal glomerular; e/ou,
- Fibrose intersticial/atrofia tubular com ou sem perda de capilares peritubulares;
- Fibrose intimal em artérias sem duplicação da camada elástica;
  
- Evidência imunopatológica de ação de anticorpos, como:
- Deposição difusa de C4d em capilares peritubulares;

## 3. Evidência sorológica de anticorpos circulantes, como:

- Presença de anticorpos dirigidos contra antígenos HLA do doador.

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

## ANEXO III

### Teste de Citotoxicidade Dependente de Complemento (CDC)

Os linfócitos do doador foram separados por centrifugação, utilizando-se gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque,  $d=1,077\text{g/L}$ . Após a centrifugação, foi coletada a “nuvem” de células mononucleares. A trombina foi utilizada para eliminar as plaquetas e granulócitos existentes na suspensão celular, de modo a restar apenas linfócitos totais.

Pela técnica de aderência à lã de náilon, os linfócitos totais foram separados em linfócitos T e linfócitos B. A seguir, a concentração celular é ajustada para  $2,5$  a  $3,0 \times 10^6$  células/mL antes de dispensá-las em placas. Foi incubado  $1\mu\text{L}$  da suspensão celular (linfócitos T ou linfócitos B do doador) com  $1\mu\text{L}$  de soro do receptor por poço, em placa de Terasaki (*One Lambda, Canoga Park, CA, EUA*), durante 30 minutos para a placa com linfócitos T e durante 60 minutos para a placa com linfócitos B, em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados  $5\mu\text{L}$  por poço de complemento de coelho (*One Lambda, Canoga Park, CA, EUA*) para ambas as placas e a suspensão celular foi submetida à incubação durante 90 minutos a temperatura ambiente. A reação foi evidenciada pela adição de  $10\mu\text{L}$  de Stain-Fix (*One Lambda, Canoga Park, CA, EUA*) e, depois de transcorridos 20 minutos, o resultado foi avaliado em microscópio de contraste de fase. O teste foi considerado positivo quando houve mais do que 10% de lise celular no soro-teste em comparação com o controle negativo.

Para caracterizar o isotipo do anticorpo, foi utilizado o agente redutor ditioneitol (DTT) que destrói as pontes dissulfeto da molécula de IgM, inativando-a,

sem interferir na reatividade dos anticorpos do isotipolgG. O DTT foi utilizado na proporção de 1:10 e incubado com o soro-teste durante 30 minutos a 37 °C, sob agitação a cada 5 minutos.

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

### **Teste de Citometria de Fluxo**

Essa técnica era realizada no pré-transplante sempre que existissem células viáveis do doador falecido para análise. Em uma placa de 96 poços de fundo em U, foram dispensados 100 µL de suspensão celular (linfócitos totais do doador) contendo  $0,5 \times 10^6$  células por poço. Após centrifugação da placa a 1.800 rpm durante 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado e a suspensão celular foi ressuspensa em agitador de placa. A seguir, a suspensão celular foi lavada com 150 µL por poço com tampão FACS (salina, soro fetal bovino a 2%, AZIDA 0,1%) seguida de nova centrifugação a 1.800 rpm durante 5 minutos a 4°C. Depois, foram adicionados 25 µL por poço do soro correspondente (soro- controle negativo, soro-controle positivo e soro-teste) e, posteriormente, a suspensão celular foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. O soro-controle negativo foi composto por soro coletado de homem sadio, sem antecedentes de transfusão de hemocomponentes e do tipo sanguíneo AB; o soro-controle positivo é o soro de pacientes hiperimunizados com anticorpos anti-HLA.

Após repetir o processo de lavagem por mais 3 vezes, a suspensão celular foi incubada com 25 µL anticorpo anti-IgG humano conjugado com FITC (Sigma

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

A análise do teste foi realizada em FACS-Calibur® (*Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA*). Foram adquiridas 10.000 células para cada soro analisado. O resultado foi expresso em mediana de intensidade de fluorescência. A prova-cruzada foi positiva quando a mediana de intensidade de fluorescência foi maior que 40 canais para linfócitos T e que 50 canais para linfócitos B acima do controle negativo.

### **Teste de microesferas marcadas (Luminex®)**

Os testes LABScreen® (*One Lambda, Canoga Park, CA, EUA*) baseiam-se na utilização de microesferas marcadas com antígenos HLA purificados de classe I e de classe II. As microesferas são codificadas por cores, podendo ser avaliadas em um único tubo. O teste Mixed® detecta simultaneamente a presença de anticorpos anti-HLA classe I e/ou classe II. O teste de Flow-PRA® detecta a porcentagem e a especificidade dos anticorpos anti-HLA detectados em cada amostra. O teste Single Antigen® confirma a especificidade do anticorpo encontrado

no teste de *Flow-PRA*®.

Em uma placa de PCR com 96 poços, foram incubados 2,5 µL de microesferas com 10 µL de soro-teste em cada poço, durante 30 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz e sob homogeneização constante. Para cada conjunto de testes foi utilizado um soro- controle negativo. Todos os dados foram normalizados para cada esfera de acordo com os resultados do controle negativo.

Após a incubação, foram adicionados 150 µL de tampão de lavagem previamente diluído. A placa foi selada e submetida à homogeneização seguida de centrifugação a 1.300 rpm durante 5 minutos. Depois, o tampão de lavagem foi removido com movimento súbito e o procedimento de lavagem foi repetido mais duas vezes.

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

A leitura do teste foi realizada em LABScanTM100 (*Luminex Corporation, Austin, Texas, EUA*) e foi avaliada por intensidade média de fluorescência (MFI = “*Mean Fluorescence Intensity*”), unidade que expressa a intensidade do anticorpo,

medida pela citometria de fluxo. Foi estabelecido 1000 de MFI para a técnica Single Antigen® como corte, qualquer anticorpo com valor de MFI acima do ponto de corte foi considerado positivo e abaixo foi considerado negativo.

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

### **Tipificação HLA**

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

O sangue foi inicialmente centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm. O buffy-coat ("papa de leucócitos") foi recuperado e transferido para dois 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 68C por 5 minutos. Dois volumes de clorofórmio foram acrescentados e os tubos agitados vigorosamente. Após centrifugação por 2 minutos a 10.000 rpm, a camada superior (aquosa) onde

estava o DNA foi recuperada e foram adicionados dois volumes de CTAB 0,5% (brometo de hexadeciltrimetilamônio). Essa 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 13000 rpm e o pellet foi ressuspensionado em etanol 70%, para retirar o excesso de sal. O sobrenadante foi, então, desprezado, enquanto o DNA obtido foi dissolvido em H<sub>2</sub>O.

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  $\lambda$  260/280nm variou de 1,7 a 1,9 indicando boa qualidade do DNA. Todas as amostras ficaram estocadas em freezer a menos de 80° C para o início das tipificações.

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

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

humana, que está presente em todas as amostras de DNA prova e que é usada para confirmar a integridade da reação.

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

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

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