

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-HLA DOADOR ESPECÍFICO EM  
PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE RENAL**

**Beatriz Chamun Gil**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Job Jobim

Dissertação de Mestrado

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-HLA DOADOR ESPECÍFICO EM  
PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE RENAL**

**Beatriz Chamun Gil**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Job Jobim

Dissertação de Mestrado

2013

### CIP - Catalogação na Publicação

Gil, Beatriz Chamun  
Pesquisa de anticorpos anti-HLA doador específico  
em pacientes submetidos a transplante renal /  
Beatriz Chamun Gil. -- 2013.  
89 f.

Orientador : Luiz Fernando Job Jobim.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas,  
Porto Alegre, BR-RS, 2013.

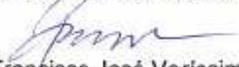
1. Imunologia. 2. Transplante Renal. 3. HLA. 4.  
anticorpos. 5. DSA. I. Jobim, Luiz Fernando Job,  
orient. II. Título.

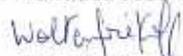
ATA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 245

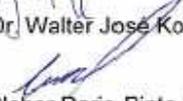
Aos quatorze dias do mês de agosto do ano de dois mil e treze, às 09h, no Auditório Mário Rigatto, Faculdade de Medicina, ocorreu a apresentação pública da Dissertação de Mestrado intitulada "Pesquisa de anticorpos anti-HLA doador específico em pacientes submetidos a transplante renal", da aluna **Beatriz Chamun Gil**, sob orientação do **Prof. Dr. Luiz Fernando Job Jobim**. A Banca foi presidida pelo orientador, Prof. Luiz Fernando Job Jobim. Compôs a banca os Professores Dra. Patricia Hartstein Salim (HCPA), Dr. Francisco José Veríssimo Veronese (UFRGS), Dr. Walter José Koff (deste Programa) e Dr. Cleber Dario Pinto Kruehl (deste Programa). O candidato dispôs de 40 minutos para expor o tema. Em seguimento, o Senhor Presidente passou a palavra aos membros da Banca para arguição, cabendo ao candidato 10 minutos para responder a cada examinador. Finalizando o Senhor Presidente anunciou os conceitos emitidos pelos Senhores Membros da Banca: Profa. Dra. Patricia Hartstein Salim, conceito **A**; Prof. Dr. Francisco José Veríssimo Veronese, conceito **A**; Prof. Dr. Walter José Koff, conceito **A**; Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Kruehl, conceito **A**. Do que para constar, eu, Estela Maris Araripe, Secretária, lavrei a presente ata que segue assinada pelos Professores Examinadores e pelo Professor Orientador.

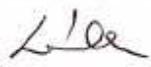
*Com Louvor.*

  
Profa. Dra. Patricia Hartstein Salim

  
Prof. Dr. Francisco José Veríssimo Veronese

  
Prof. Dr. Walter José Koff

  
Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Kruehl

  
Prof. Dr. Luiz Fernando Job Jobim

## **Agradecimentos**

Ao Professor Dr. Luiz Fernando Jobim, pela orientação, pela oportunidade e ensinamentos.

Ao Professor Dr. Roberto Ceratti Manfro, pelas contribuições e oportunidade de trabalhar com seus pacientes.

À Adriane Stefani Silva Külzer, pela nossa parceria e amizade, auxílio na parte prática e análise dos dados, revisões, sugestões e incentivo.

À Realdete Toresan, pelo exemplo e amizade, revisões, sugestões, incentivo e ensinamentos que me fizeram crescer.

À enfermeira Alessandra Rosa Vicari, pelo auxílio nas coletas e na obtenção dos dados referente aos pacientes.

À enfermeira Maria Conceição Proença, pelo auxílio nas coletas.

Ao Luis Santini pelo auxílio nas dúvidas e pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

À Gisele Menezes Ewald, pela amizade, incentivo, revisões e sugestões.

À Joice Merzoni, pelo apoio e amizade, tipagens HLA, sugestões e incentivo.

À Iara Fagundes, pelo auxílio estatístico, sugestões, incentivo e carinho.

À Fernanda Marquezotti, pelo carinho e companheirismo ao longo dessa etapa, pelas conversas e trabalhos nas disciplinas.

À Natalia Koff, por ter feito parte dessa etapa em muitos momentos, pelas revisões e pelo carinho.

À Marta Rodrigues e Rosani Calvi Beuren, pelo auxílio da obtenção de amostras e pelo apoio.

À Fernanda Gamio pela revisão do inglês, carinho e incentivo.

Às Colegas do Serviço de Imunologia pelo apoio e incentivo.

Aos pacientes que aceitaram participar desse projeto. Muito obrigada!

Ao FIPE-HCPA pelo auxílio financeiro.

Ao GPPG e, em especial, à Vania Naomi Hirakata pela análise estatística deste trabalho.

À Estela (PPG Ciências Cirúrgicas) pela disponibilidade em ajudar sempre.

Ao meu marido Cláudio por ser um grande exemplo de pesquisador, pela ajuda com artigos, figuras e formatações, mas principalmente pelo companheirismo e amor.

Aos meus pais, Júlio e Soraia, e aos meus irmãos, Júlio e Izadora, por serem a minha base, meus incentivadores, amigos e por todo amor.

Aos meus avós, Cirne e Aryza, pelos valores ensinados, pelo amor e por sempre me incentivarem e investirem nos meus estudos e na minha profissão.

A todos meus amigos e familiares por serem tão importantes na minha vida e sempre me apoiarem e ajudarem em todos os momentos.

Dedico este trabalho  
aos meus pais, Júlio e Soraia,  
aos meus avós, Cirne e Aryza,  
e ao meu marido Cláudio.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A: base nitrogenada adenina

ABH: Associação Brasileira de Histocompatibilidade

ABO: sistema de grupos sanguíneos

AGH: antiglobulina humana

APCs: células apresentadoras de antígenos

C: base nitrogenada citosina

C4d: subproduto do componente C4 do complemento

CD19: marcador de superfície do linfócito B

CD20: marcador de superfície do linfócito B

CD3: marcador de superfície do linfócito T

CDC: citotoxicidade dependente de complemento

CN: controle negativo

CON (1,2,3): microesferas controle negativo

CP: controle positivo

DNA: ácido desoxirribonucleico

DSA: anticorpos específicos contra o doador (*Donor Specific Antibody*)

DdNTP: dideoxynucleotídeo

DTH: hipersensibilidade do tipo retardada

DTT : dithiothreitol

ELISA: ensaio imunoenzimático (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

FCXM: prova cruzada por citometria de fluxo (*Flow Cytometry crossmatch*)

FITC: fluorocromo Fluoresceína

G: base nitrogenada guanina

HAS: hipertensão arterial sistêmica

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HLA: antígeno leucocitário humano (*Human Leucocyte Antigen*)

IgG: imunoglobulina de classe G

IgM: imunoglobulina de classe M

IRC: insuficiência renal crônica

LCR: reagente controle do lisado (*Lysate Control Reagent*)

LSA1: *Labscreen Single Antigen* classe I

LSA2: *Labscreen Single Antigen* classe II

MFI: média de intensidade de fluorescência (*Median Fluorescence Intensity*)

MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)

MIC-A: molécula de cadeia A relacionada ao MHC de Classe I (*Major Histocompatibility class-I-related chain A*)

MLR: reação leucocitária mista

NK: célula “*natural killer*”

NKG2D: receptor de ativação das células NK e T CD8+

PCR: reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PE: fluorocromo Ficoeritrina

PercP: fluorocromo Cloreto de Peridina Clorofila

PRA: reatividade contra painel ou prova cruzada contra painel (*Panel-Reactive Antibodies*)

RMA: rejeição mediada por anticorpos

RBT: Registro Brasileiro de Transplantes

SA: antígeno único (*Single Antigen*)

SAPE: Ficoeritrina conjugada com Streptavidina

SBN: Sociedade Brasileira de Nefrologia

SSO: oligonucleotídeo sequência específica (*Sequence-Specific Oligonucleotide*)

SSP: primer sequência específica (*Sequence-Specific Primer*)

T: base nitrogenada timina

T CD4+: linfócito T CD4 positivo

T CD8+: linfócito T CD8 positivo

TNF: fator de necrose tumoral

UV: luz ultravioleta

xmDSA: prova cruzada feita no Luminex – Kit *Donor Specific Antibody*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1 ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS (HLA).....	18
2.1.1 HLA CLASSE I.....	18
2.1.2 HLA CLASSE II.....	19
2.2. MIC-A.....	21
2.3 IMUNOLOGIA DE TRANSPLANTES.....	21
2.3.1 RECONHECIMENTO DE ANTÍGENOS.....	22
2.3.2 ANTICORPOS NO PRÉ-TRANSPLANTE.....	24
2.3.3 A REJEIÇÃO AOS ENXERTOS.....	25
2.4 TESTES DE HISTOCOMPATIBILIDADE.....	28
2.4.1 TIPAGEM HLA.....	28
2.4.2 PROVA CRUZADA POR CITOTOXICIDADE DEPENDENTE DE COMPLEMENTO (CDC).....	32
2.4.3 PROVA CRUZADA POR CITOMETRIA DE FLUXO (FCXM).....	34
2.4.4 AVALIAÇÃO DE REATIVIDADE CONTRA PAINEL (PRA).....	36
2.5 ANTICORPOS NO PÓS-TRANSPLANTE.....	40
2.5.1 SINGLE ANTIGEN (SA).....	42
2.5.2 DONOR SPECIFIC ANTIGEN (xmDSA).....	45
<b>3 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>48</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>52</b>
4.1 OBJETIVO GERAL.....	52
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
<b>5 ARTIGO ORIGINAL (INGLÊS).....</b>	<b>53</b>
<b>6 ARTIGO ORIGINAL (PORTUGUÊS).....</b>	<b>68</b>
<b>7 ANEXOS.....</b>	<b>84</b>
ANEXO I – PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS.....	85
ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	86
ANEXO III – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	89

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui 20.021 pacientes em lista de espera para transplante de rim, sendo que 5,22% encontram-se no Rio Grande do Sul.<sup>1</sup>

A realização de transplantes renais tem aumentado a cada ano por ser um tratamento bem estabelecido, principalmente devido à evolução da histocompatibilidade, aos avanços da preservação de órgãos, ao uso de drogas imunossupressoras mais efetivas e ao melhor monitoramento do paciente.<sup>2,3</sup>

O Registro Brasileiro de Transplantes (RBT) de 2012 mostrou que o Brasil foi o 2º país no mundo em número de transplantes renais com a realização de 5.385 transplantes (1.488 com doador vivo e 3.897 com doador falecido). Deste total, 10,18% foram realizados no Rio Grande do Sul (97 com doador vivo e 451 com doador falecido), sendo 23,91% no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (25 com doador vivo e 106 com doador falecido).<sup>1</sup>

Mesmo com todo esforço dirigido para a realização de transplantes, muitas questões permanecem problemáticas, entre elas o insuficiente número de doadores, os efeitos indesejados da imunossupressão (infecções e tumores) e a resposta imune do receptor contra o órgão doado (rejeição).<sup>3</sup>

A rejeição aos aloenxertos (transplante entre dois indivíduos geneticamente diferentes da mesma espécie) continua sendo uma grande limitação para o sucesso do procedimento, apesar do desenvolvimento científico de novas terapias e a melhora das técnicas de histocompatibilidade.

A rejeição ao transplante renal é usualmente classificada como hiperaguda, aguda e crônica. A rejeição ocasionada por linfócitos T era considerada como principal causa de rejeições, entretanto, devido ao acúmulo de evidências de rejeição humoral, a rejeição mediada por anticorpos (RMA) foi também adicionada à classificação das rejeições (Banff 97). Os critérios para diagnóstico são alterações histológicas características, depósito de C4d no tecido renal e presença de DSA circulante.<sup>3,4</sup>

A sensibilização a antígenos HLA pode ocorrer através de transfusões sanguíneas, gestações ou transplantes prévios. Por este motivo, a condição imunológica dos candidatos ao transplante renal deve ser avaliada periodicamente, com a finalidade de monitorar a produção e a titulação desses anticorpos.<sup>5</sup>

A presença de anticorpos pré-formados dirigidos contra antígenos HLA já é conhecida desde a década de 60. A produção desses anticorpos pode ocorrer mesmo em períodos tardios do pós-transplante, desencadeando anticorpos específicos contra o doador (DSA - *Donor Specific Antibody*).<sup>6-8</sup>

Estudos recentes sugerem que a presença de DSA tem alta relevância clínica, pois anticorpos anti-HLA encontrados em pacientes após o transplante têm se mostrado fortemente associados com a rejeição mediada por anticorpos, rejeição aguda acelerada e com a perda do enxerto.<sup>9-12</sup> Quando estes anticorpos aparecem na circulação após o transplante, o prejuízo causado por eles frequentemente aumenta com o tempo. Por essas razões, é importante o seu monitoramento.

Houve um grande avanço científico na detecção de anticorpos anti-HLA desde que Patel e Terasaki relataram em 1969 a relevância da prova cruzada prévia para o resultado do transplante.<sup>8,13,14</sup> A adição da anti-globulina humana (AGH) melhorou a sensibilidade da prova cruzada padrão por citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Posteriormente, a prova cruzada por citometria de fluxo (FCXM) acrescentou sensibilidade na pesquisa de anticorpos anti-doador. Recentemente, ensaios de fase sólida foram introduzidos na triagem de anticorpos anti-HLA, tais como o ELISA e a metodologia Luminex que utiliza microesferas sintéticas recobertas por moléculas HLA<sup>15</sup> (*Labscreen*<sup>®</sup> – One Lambda<sup>®</sup>, Canoga Park, CA) ou com anticorpos anti-HLA<sup>16</sup> (DSA – Tepnel Lifecodes, Stamford, CT).<sup>7,13,17-19</sup>

Com essas novas metodologias, muitos dos problemas dos ensaios baseado em células foram resolvidos como a necessidade de viabilidade celular e resultados que não identificam a especificidade dos anticorpos. Além disso, esses novos ensaios têm uma sensibilidade superior, requer menor volume de soro e pode ser parcialmente ou totalmente automatizado.<sup>9,20,21</sup>

Os ensaios baseados na metodologia Luminex são atualmente os mais populares na detecção de anticorpos anti-HLA devido a sua alta sensibilidade e especificidade.<sup>6,9,13,18,20,22</sup>

Existem diferentes tipos de testes que utilizam essa metodologia. Na triagem e na avaliação de reatividade contra painel (PRA) as microesferas são revestidas com diferentes moléculas HLA enquanto no Antígeno Único (SA - *Single Antigen*) as microesferas são revestidas com apenas uma molécula HLA o que permite uma definição precisa da especificidade dos anticorpos anti-HLA e do título em que eles são encontrados no soro de um receptor, possibilitando inclusive uma prova cruzada virtual, prevendo reações contra as especificidades HLA do doador.<sup>9,22</sup> Já a prova cruzada feita no Luminex (xmDSA) permite uma prova cruzada real, utilizando a molécula HLA do próprio doador (ligada à microesferas recobertas com anticorpos anti-HLA de classe I e II) que se ligará aos anticorpos presentes no soro do receptor.<sup>22</sup>

Essas novas técnicas para detecção de DSA fornecem importantes informações, havendo, entretanto, a necessidade de mais estudos para estabelecer a melhor conduta e valorização clínica de seus resultados.<sup>6,7,10,13,20</sup>

Sendo assim, esta pesquisa tem por objetivo a detecção de DSA no pós-transplante, utilizando as metodologias SA e xmDSA.<sup>22</sup>

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS (HLA)

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC - *Major Histocompatibility Complex*) foi identificado como a região do cromossomo cujos produtos são responsáveis pela rejeição imediata de transplantes entre linhagens de camundongos (George Snell, 1940).<sup>2</sup>

Essas experiências demonstraram que os tecidos transplantados entre animais singênicos eram bem-sucedidos, enquanto enxertos entre animais de linhagens diferentes eram rejeitados. Sendo assim, conclui-se que o reconhecimento de um enxerto como próprio ou estranho é realizado por glicoproteínas de membrana codificadas por genes de histocompatibilidade.<sup>2</sup>

Em 1954, Jean Dausset publicou suas observações sobre a capacidade do soro de indivíduos submetidos à transfusão sanguínea de aglutinar leucócitos de outros indivíduos, descobrindo assim, o primeiro antígeno HLA (A2). Em 1963, Jon van Rood publicou a descoberta de outro loco do sistema HLA (HLA-B). Essas publicações demonstraram que pacientes que apresentavam rejeição ao rim transplantado ou reação a transfusões, geralmente tinham anticorpos circulantes reativos contra antígenos presentes nos leucócitos do sangue transfundido ou de células do órgão transplantado. Sendo assim, presumiu-se que esses antígenos fossem o produto de genes polimórficos capazes de distinguir o que era estranho do que era próprio ao organismo.<sup>2</sup>

Os genes do MHC humano estão localizadas no cromossomo 6 (Figura 1) e são chamados de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA - *Human Leucocyte Antigens*) devido à descoberta inicial da expressão dos antígenos em leucócitos.

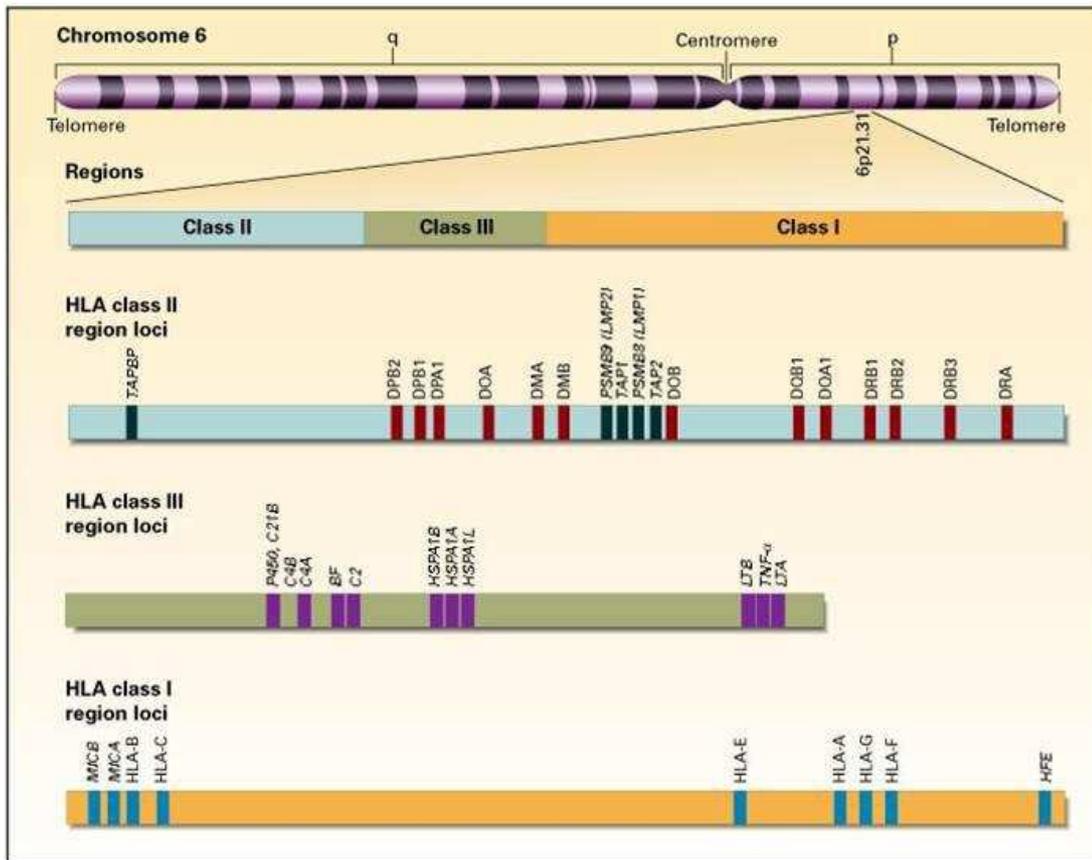


Figura 1. Mapa do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). Fonte: Adaptada de SILLOS (2003).

Os três primeiros locos definidos por métodos sorológicos foram chamados HLA-A, HLA-B e HLA-C. O uso de anticorpos para estudar as diferenças nos antígenos entre doadores e receptores foi complementado pela reação leucocitária mista (MLR), um teste para o reconhecimento de células alogênicas pelas células T. Descobriu-se que os linfócitos T de um indivíduo proliferavam em resposta aos leucócitos de outro indivíduo e esse ensaio foi usado para mapear os genes que desencadeavam reação alogênica das células T, o HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP.<sup>2</sup>

As moléculas HLA são expressas na membrana das células nucleadas e têm a função de apresentar peptídeos antigênicos para reconhecimento pelos linfócitos T durante a resposta imunológica. Existem dois tipos principais de moléculas HLA que apresentam tipos diferentes

de antígenos: as de classe I, codificadas pelos locos HLA-A, B e C, e as de classe II, codificadas pelos locos HLA-DR, DQ e DP (Figura 2).<sup>2</sup>

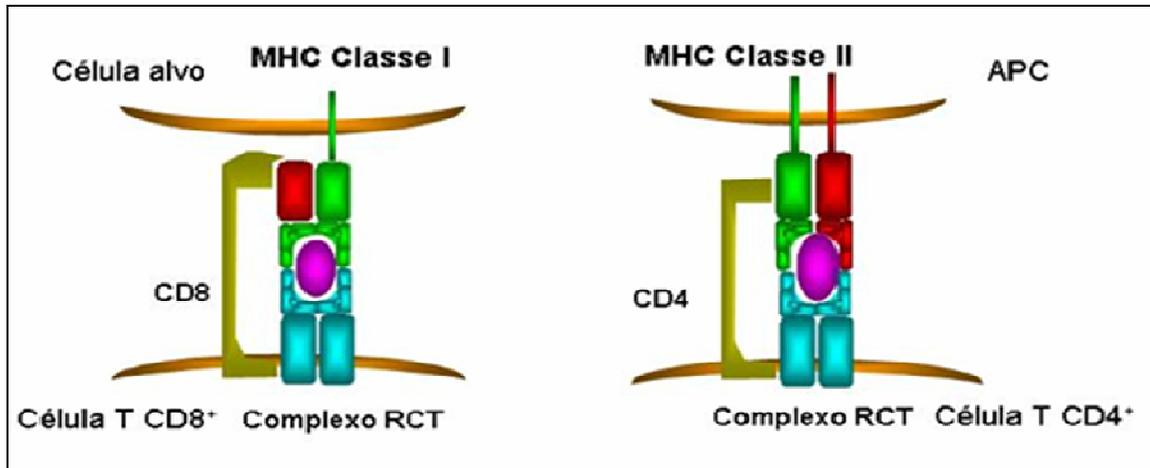


Figura 2. Moléculas HLA de Classe I e II.

Os genes HLA são expressos de forma codominante, ou seja, cada indivíduo expressa os dois alelos que são herdados dos pais. A herança é haplotípica, isto é, cada indivíduo herda e transmite conjunto de alelos em bloco por cromossomo (Figura 3).<sup>2</sup>

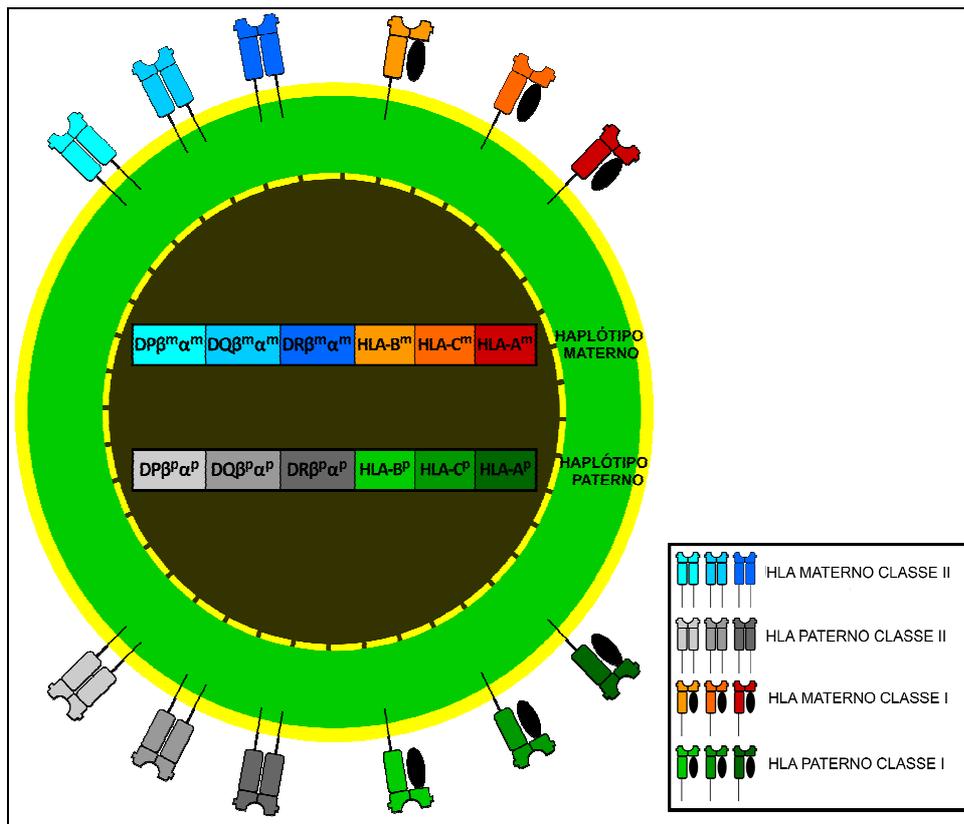


Figura 3. Herança haplotípica do HLA e sua expressão na superfície celular. Fonte: Intechopen (2009).

O sistema HLA apresenta diversos aspectos de importância científica. Devido ao polimorfismo, as frequências alélicas são características em diferentes populações ou grupos étnicos, o que o torna alvo de interesse em estudos antropológicos. O seu papel na histocompatibilidade é de grande valor nos estudos de doadores e receptores para transplante, no desenvolvimento de métodos sorológicos e moleculares para a identificação dos genes e antígenos HLA, nas novas terapias de imunossupressão, na organização de bancos de doadores e receptores para transplante de medula óssea, entre outros. Além disso, esse sistema é de grande importância na associação entre alguns genes HLA e determinadas doenças.

### 2.1.1 HLA CLASSE I

As moléculas HLA de classe I são codificadas pelos genes localizados nos locos HLA-A, B e C e consistem em duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente: uma cadeia  $\alpha$  codificada pelo cromossomo 6 e uma cadeia  $\beta$ 2-microglobulina codificada pelo cromossomo 15 (Figura 4). Os domínios da cadeia  $\alpha$  ( $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 2) das moléculas de classe I formam a fenda de ligação de peptídeos antigênicos. O tamanho da fenda é suficiente para ligar peptídeos contendo de 8 a 11 aminoácidos, impedindo a ligação de peptídeos maiores. Para isso, algumas proteínas precisam ser processadas para gerar fragmentos menores. O domínio  $\alpha$ 3 possui a mesma sequência de aminoácidos em todas as moléculas de classe I e serve como sítio de ligação para a molécula CD8 do linfócito T. Igualmente ao domínio  $\alpha$ 3, a cadeia  $\beta$ 2-microglobulina é estruturalmente constante em todas as moléculas da classe I.<sup>2</sup>

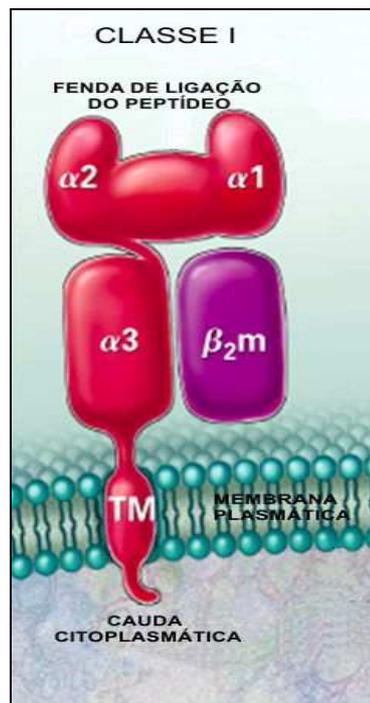


Figura 4. Molécula HLA de classe I. Fonte: Cerruto (1997)

As moléculas de classe I apresentam peptídeos aos linfócitos T citotóxicos CD8+. São expressas em quase todas as células nucleadas já que sua função é eliminar células infectadas por microorganismos intracelulares, como os vírus, as micobactérias e alguns fungos.<sup>2</sup>

Na maioria das células, a exposição ao interferon aumenta o nível de expressão das moléculas de classe I, assim, proporcionando uma maior resposta imunológica aos microorganismos pelos linfócitos T.<sup>2</sup>

### **2.1.2 HLA CLASSE II**

As moléculas HLA de classe II são codificadas pelos genes localizados nos locos HLA-DR, DQ e DP e são compostas de duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente:  $\alpha$  e  $\beta$ , ambas codificadas pelo cromossomo 6 (Figura 5). Os domínios de cada cadeia  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  interagem para formar a fenda de ligação de antígenos. O tamanho da fenda é suficiente para ligar peptídeos com 30 aminoácidos ou mais.<sup>2</sup>

Nas moléculas HLA de classe II a maior parte do polimorfismo está na cadeia  $\beta$ . Os domínios  $\alpha 2$  e  $\beta 2$  não são polimórficos e o domínio  $\beta 2$  é o local de ligação para a molécula CD4 do linfócito T.<sup>2</sup>

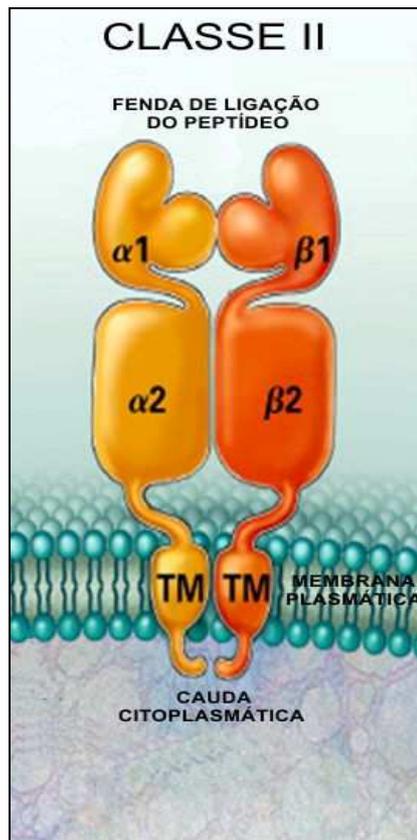


Figura 5. Molécula HLA de classe II. Fonte: Cerruto(1997)

As moléculas de classe II apresentam peptídeos aos linfócitos T auxiliares CD4+. São encontradas somente nas células dendríticas, nos linfócitos B, nos macrófagos e em alguns raros tipos celulares.<sup>2</sup>

Sua função é o reconhecimento de antígenos apresentados por um número mais limitado de tipos celulares, assim, as células dendríticas apresentam antígenos aos linfócitos T CD4+ que ativam os macrófagos para eliminar os microorganismos extracelulares que foram fagocitados e estimulam os linfócitos B para que produzam anticorpos.<sup>2</sup>

A expressão das moléculas de classe II é regulada por várias citocinas nas diversas células, sendo o interferon  $\gamma$  a principal delas.<sup>2</sup>

## 2.2 MIC-A

Os genes MIC (*MHC class I chain-related*) constituem um grupo de genes não clássicos do MHC de classe I que foi descoberto em 1994. Há sete genes (A-G), dos quais apenas MIC-A e MIC-B são funcionais, sendo os demais pseudogenes.<sup>23-25</sup>

As moléculas MIC-A, cuja expressão é induzida em condições de estresse celular, são glicoproteínas expressas na superfície de células epiteliais, células dendríticas e fibroblastos, não ocorrendo expressão em células sanguíneas, como linfócitos T e B.

As funções dessas moléculas não estão totalmente esclarecidas, mas indicam estar relacionadas à imunidade inata por atuar como ligante a receptores NKG2D, que são ativadores de células *natural killer* (NK), células T CD8+ e  $\gamma\delta$ . Além do papel descrito em tumores, dados recentes destacam a importância de NKG2D e seus ligantes em transplante de órgãos, por isso sugere-se o envolvimento desta molécula em rejeições de enxertos.<sup>3,26</sup>

Estudos recentes demonstram essa associação utilizando moléculas MIC-A associadas à microesferas no Luminex para detecção de anticorpos anti-MIC-A anti-doador, mostrando o aumento do risco de rejeição e a menor sobrevida do enxerto.<sup>14</sup>

A presença de anticorpos anti-MIC-A pode ser um importante marcador para o diagnóstico de rejeição, sugerindo um papel importante em seu monitoramento.<sup>14</sup>

## 2.3 IMUNOLOGIA DE TRANSPLANTES

Existem alguns tipos de transplantes que foram denominados de acordo com o tipo de doador: o transplante autólogo é o transplante realizado de um indivíduo para si mesmo; o transplante singênico é o transplante realizado entre dois indivíduos geneticamente idênticos e o mais comum é o transplante alogênico que é realizado entre indivíduos geneticamente diferente da mesma espécie.<sup>2</sup>

No transplante alogênico, as moléculas reconhecidas como estranhas são chamadas aloantígenos e os anticorpos que reagem com eles são chamados alorreativos. Os aloantígenos

desencadeiam as respostas imunes celular e humoral, promovendo a rejeição. Essa resposta imune contra o órgão transplantado pode ser mediada por células T ou por meio da resposta desencadeada por anticorpos específicos contra o HLA do doador.<sup>6</sup>

Sendo assim, a imunologia de transplantes é importante por dois motivos. Primeiro porque a rejeição é uma das maiores barreiras ao transplante. Segundo, porque, após um contato prévio com um determinado aloantígeno (transfusões, gestações ou transplantes prévios), a resposta imune contra as mesmas moléculas alogênicas torna-se extremamente forte após a implantação de um órgão.

### **2.3.1 RECONHECIMENTO DE ANTÍGENOS**

As moléculas HLA permitem o organismo detectar antígenos diferenciando o que é próprio do não próprio.

Quando um órgão é transplantado, as moléculas HLA alogênicas são apresentadas para o reconhecimento pelas células T do receptor por duas vias: direta ou indireta (Figura 6).

A maior parte dos órgãos transplantados contém células apresentadoras de antígenos (APCs) residentes. O transplante desses órgãos para um receptor alogênico fornece APCs que expressam moléculas HLA do doador e que são reconhecidas pelas células T circulantes do receptor, o que caracteriza a apresentação direta de aloantígenos.<sup>2</sup>

Já na apresentação indireta, as APCs do receptor migram para o órgão transplantado, processam moléculas HLA alogênicas e apresentam seus fragmentos peptídicos para os linfócitos T, assim como ocorre com outros antígenos estranhos.

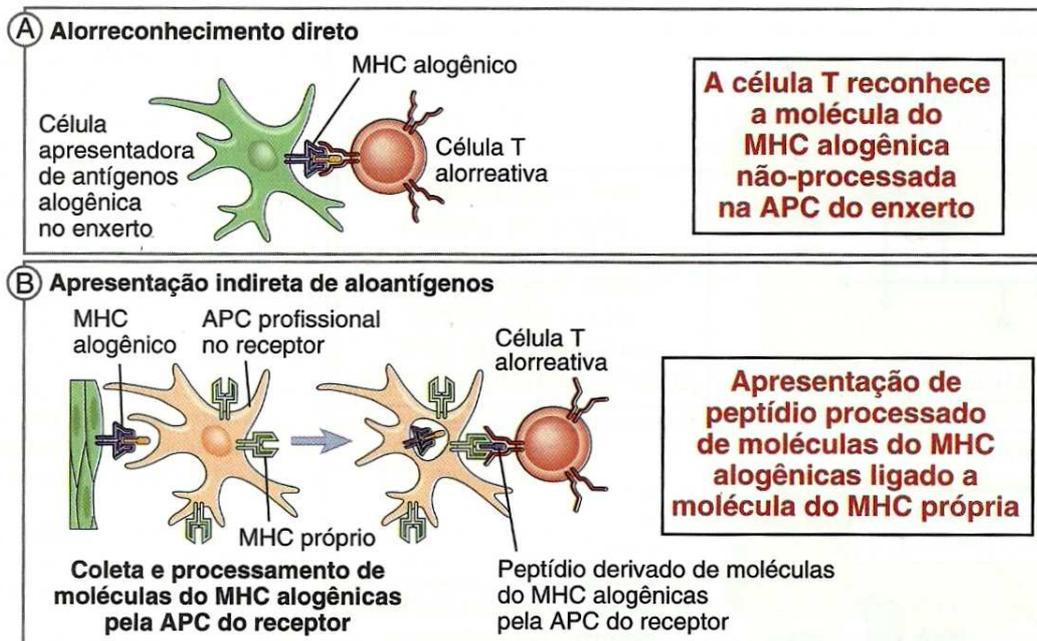


Figura 6. Reconhecimento direto e indireto de aloantígenos. Fonte: Abbas (2005).

Células T alorreativas no receptor podem ser ativadas por ambas as vias, migrando para o enxerto e causando a sua rejeição.

Células T CD4+ auxiliares alorreativas diferenciam-se em células efetoras produtoras de citocinas que lesam o enxerto.

Células T CD8+ alorreativas ativadas pela via direta diferenciam-se em citotóxicas e destroem células nucleadas no enxerto que expressam as moléculas alôgenicas HLA de classe I.

As células T CD8+ citotóxicas que são geradas pela via indireta são restritas ao HLA próprio, portanto não podem destruir diretamente as células estranhas no enxerto. Dessa forma, quando células T alorreativas são estimuladas pela via indireta, o principal mecanismo de rejeição é, provavelmente, uma reação mediada por células T CD4+ efetoras que infiltram o enxerto e reconhecem aloantígenos do doador sendo exibidos por APCs do receptor que também infiltraram o enxerto.<sup>2,27</sup>

Após esse reconhecimento, os linfócitos T CD4+ auxiliares liberam sinais que estimulam os linfócitos B a produzirem os anticorpos. Uma vez ativados, os linfócitos B se diferenciam em células secretoras de anticorpos, algumas das quais continuam a produzir anticorpos por longos

períodos, enquanto outras se tornam células de memória que responderão rapidamente em um segundo contato com o antígeno, caracterizando a resposta imune humoral.

### **2.3.2 ANTICORPOS NO PRÉ-TRANSPLANTE**

Diferentemente do que acontece com o sistema sanguíneo ABO, não existem anticorpos anti-HLA ocorrendo espontaneamente. Estes anticorpos são produzidos como resultado de imunização durante transfusões, gestações e/ou transplantes prévios.

Na literatura, há muitas evidências de que anticorpos anti-HLA pré-formados tem um efeito deletério no resultado do transplante renal<sup>14</sup>, predispõem à rejeição hiperaguda sendo uma significativa barreira para o transplante renal.<sup>9</sup>

Os pacientes em lista de espera para transplante são testados e monitorados para presença e especificidade de anticorpos anti-HLA. A detecção e análise desses anticorpos no pré-transplante são essenciais para a identificação de um doador compatível, evitando o transplante com doadores cujos antígenos HLA estejam presentes entre aqueles que o paciente é sensibilizado. Além disso, a identificação das especificidades dos anticorpos é usada para identificar pacientes com alto risco de rejeição ao órgão.<sup>14</sup>

Através da utilização de métodos quantitativos, diversos estudos demonstraram que o aumento do título de anticorpos desenvolvidos após o transplante ocorre progressivamente a partir do momento em que eles aparecem no sangue periférico do paciente.<sup>27</sup> Aproximadamente 25% dos pacientes submetidos a transplante renal desenvolvem anticorpos anti-HLA.<sup>27,28</sup>

Anticorpos anti-HLA pré-formados podem comprometer um segundo transplante, em casos de retransplante. Estes anticorpos podem ser formados por três maneiras: gestações prévias, transfusões de sangue e/ou transplante prévio.

A gestação prévia pode ter ocorrido há muitos anos, e os anticorpos anti-HLA podem não estar detectáveis, porém células de memória e baixos títulos de anticorpos ainda estão presentes. Através da metodologia Luminex existe a oportunidade de detectar esses baixos

níveis de anticorpos, evitando um transplante com pouca chance de sucesso. Um transplante prévio quase sempre sensibiliza o paciente, principalmente com moléculas HLA de classe II.

Ambos os anticorpos de classe I ou II estão associados com a rejeição precoce do enxerto. Existem diversas evidências de que anticorpos anti- HLA de classe II são mais fortemente associados com a rejeição crônica e com a glomerulopatia do transplante.<sup>9,18</sup>

Com a utilização das metodologias atuais, é possível a detecção de forma muito sensível desses anticorpos, permitindo a realização de retransplantes com sucesso.<sup>18</sup>

### **2.3.3 A REJEIÇÃO AOS TRANSPLANTES**

A rejeição aos enxertos é classificada em hiperaguda, aguda ou crônica de acordo com as características histopatológicas e ao tempo decorrido após o transplante (Figura 7).<sup>2,3</sup>

A rejeição hiperaguda é iniciada imediatamente após a anastomose entre os vasos sanguíneos do receptor e do enxerto, e é mediada por anticorpos anti-HLA pré-formados existentes na circulação do receptor que se ligam aos antígenos HLA do doador presentes no endotélio e ativam o sistema do complemento. Anticorpos e complemento induzem alterações no endotélio do enxerto e promovem a trombose intravascular. A ativação do complemento leva à lesão celular endotelial que estimula a adesão e a agregação plaquetária. Esses processos contribuem para a trombose e oclusão vascular. O órgão enxertado sofrerá lesão isquêmica irreversível.<sup>2-4</sup>

O C4d é um produto da degradação do componente C4 da via clássica do complemento que se liga à superfície das células endoteliais e à membrana basal tubular, tornando-se uma molécula estável e um marcador específico da resposta humoral pela observação do depósito nos capilares peritubulares dos enxertos através de técnicas de imuno-histoquímica ou imunofluorescência. Esse depósito caracteriza a rejeição aguda.<sup>4</sup>

A rejeição aguda é um processo de lesão vascular e parenquimatosa mediada por células T e anticorpos, que geralmente se inicia após a primeira semana de transplante. As células T efetoras e os anticorpos que medeiam à rejeição aguda se desenvolvem durante poucos dias ou

semanas em resposta ao enxerto. Os linfócitos T respondem aos aloantígenos presentes na vasculatura endotelial e células parenquimatosas. As células T ativadas causam a lise direta das células do enxerto. A endotelite endovascular é um achado precoce e frequente em episódios de rejeição aguda.<sup>2</sup>

A rejeição crônica ocorre durante um período prolongado após o transplante e caracteriza-se por fibrose e anormalidades vasculares, com perda da função do enxerto. A fibrose da rejeição crônica pode resultar de reações imunes e da produção de citocinas que estimulam os fibroblastos, ou pode representar a reparação de danos após a necrose celular parenquimatosa da rejeição aguda. Talvez a principal causa de rejeição crônica seja a aterosclerose acelerada com oclusão arterial, resultado da proliferação de células musculares lisas.<sup>2</sup> Além disso, vários estudos correlacionam, também, a presença de anticorpos anti-HLA na circulação com a rejeição crônica e perda do enxerto.<sup>3</sup>

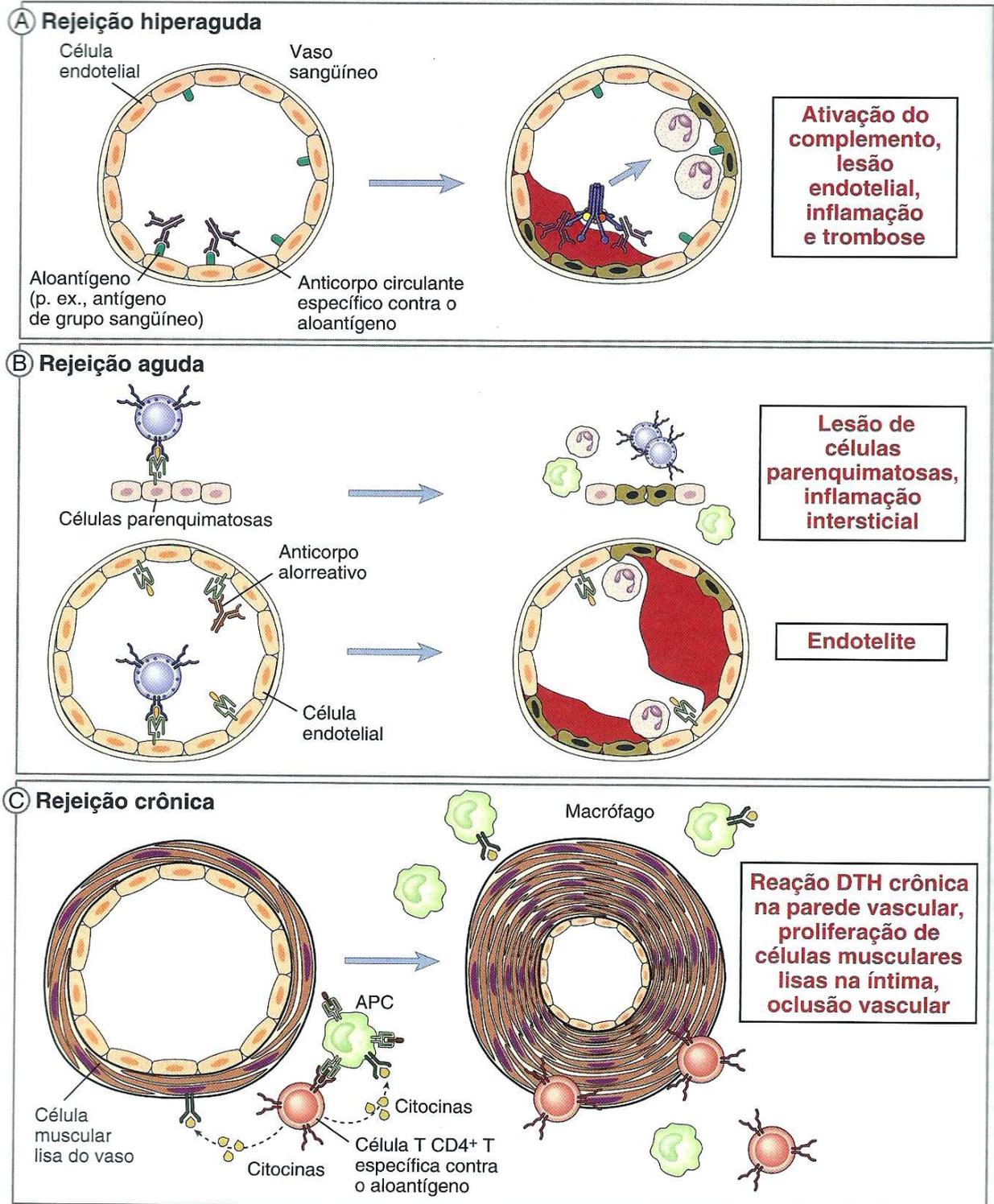


Figura 7. Mecanismos da rejeição de enxertos. Fonte: Abbas (2005).

A estratégia atualmente usada para evitar ou retardar a rejeição é a imunossupressão direcionada contra a resposta de células T através do uso de drogas citotóxicas, de agentes imunossupressores específicos ou de anticorpos monoclonais.<sup>2</sup>

## **2.4 TESTES DE HISTOCOMPATIBILIDADE**

Diversos testes laboratoriais são realizados para reduzir o risco de rejeição imunológica aos transplantes. Estes incluem a tipagem sanguínea ABO, a determinação de alelos HLA nos doadores e receptores (tipagem HLA), a detecção de anticorpos pré-formados nos receptores e as provas cruzadas entre receptor e doador.<sup>2,7</sup>

A última década testemunhou avanços científicos significativos na histocompatibilidade e na imunogenética. Especialmente com o desenvolvimento de métodos mais sensíveis e automatizados que permitem definir precisamente a presença de anticorpos anti-HLA específicos. Essa quantificação e caracterização dos anticorpos anti-HLA combinados com os resultados de prova cruzada, permitem uma melhor avaliação do risco imunológico do transplante com potenciais doadores.<sup>29</sup>

### **2.4.1 TIPAGEM HLA**

O grau de incompatibilidades HLA entre doador e receptor é proporcional ao número de antígenos HLA presentes no doador e ausentes no receptor.<sup>9</sup> Portanto, quanto maior a semelhança entre o HLA do doador e do receptor, melhor sucedido será o transplante. Para a realização dessa compatibilidade é necessária a tipagem HLA de cada indivíduo, principalmente dos locos HLA-A, B e DR.

A tipagem HLA foi realizada, por muitos anos, pelos testes sorológicos baseados em coleções padronizadas de soros de múltiplos indivíduos previamente sensibilizados para diferentes antígenos HLA (múltiparas, transfusões sanguíneas, transplantes prévios) ou por anticorpos monoclonais anti-HLA. Cada um desses soros/anticorpos é misturado com os

linfócitos de um paciente em diferentes poços de uma placa Terasaki. O complemento de coelho é adicionado aos poços, e após um período de incubação, é adicionado um corante que penetra somente nas células mortas (lisadas). Os poços são examinados com um microscópio invertido com contraste de fase buscando-se a presença de células mortas coradas pelo corante eosina. Com base em quais poços houve lise celular, o haplótipo HLA do indivíduo pode ser determinado.<sup>2</sup>

Nos últimos anos, passou-se a usar a reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), substituindo os métodos sorológicos que apresentavam limitações e permitindo identificar os genes HLA (alelos).

Na tipagem HLA por SSP (*Sequence Specific Primers*) utiliza-se uma sequência específica de *primers* (iniciadores da replicação de DNA) (Bunce, 1995).<sup>30</sup> Primeiramente é realizada uma reação de PCR em termociclador, selecionando um programa adequado para a amplificação do DNA alvo. Assim, sempre que o *primer* específico encontrar seu gene complementar (alelos HLA) serão realizadas milhares de cópias desses fragmentos. Após essa reação, é realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1% com uma voltagem de 200 v durante 20 minutos. Então, o gel é visualizado em um transiluminador UV. Observam-se quais alelos foram amplificados por coloração com brometo de etídeo (bandas de DNA específicas). A interpretação dos resultados baseia-se na presença ou ausência de fragmento específico de DNA amplificado, definindo a tipagem HLA do paciente (Figura 8).<sup>30</sup>

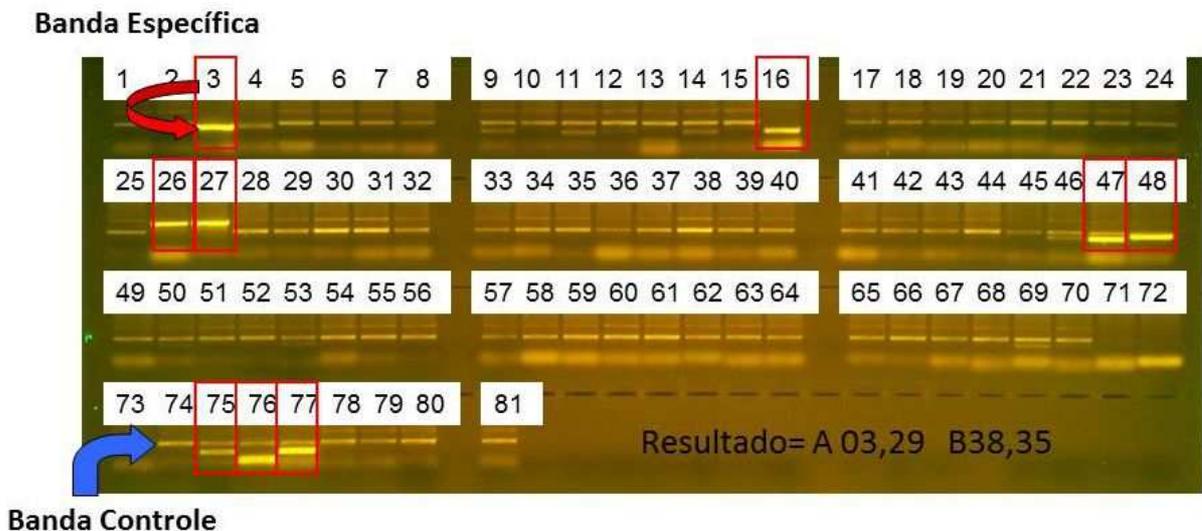


Figura 8. Tipagem HLA de Classe I por SSP. Fonte: Serviço de Imunologia (HCPA).

No SSP, todos os poços possuem *primers* de controle interno da reação derivados do terceiro íntron do loco HLA-DR $\beta$ 1 (região comum do HLA) além dos *primers* específicos. Portanto, durante a visualização do gel pode-se observar a banda controle interno presente em todos os poços amplificados, assegurando as condições ideais de amplificação.

A tipagem HLA por SSO (*Sequence Specific Oligonucleotide*) é realizada através da metodologia Luminex utilizando sondas de oligonucleotídeos de sequência específica ligadas a microesferas codificadas fluorescentemente para identificação de alelos HLA em amostras de DNA.<sup>15,31</sup>

Primeiramente, o DNA alvo é amplificado por PCR utilizando *primer* loco específico. O produto da PCR é desnaturado (a dupla fita de DNA é separada) e neutralizado para manter-se como uma fita simples. É, então, realizada uma hibridização do DNA alvo com sondas complementares conjugadas com as microesferas. A seguir é adicionada uma substância fluorescente (SAPE – Ficoeritrina conjugada com Streptavidina) que se ligará por afinidade com o amplicon que se ligou a sonda. Após é realizada a aquisição dos dados no Luminex (Figura 9), onde cada microesfera é detectada por um laser (vermelho) e a fluorescência do SAPE é detectada por outro laser (verde).<sup>15,31</sup>

Os dados brutos são inseridos no *Software HLA Fusion* (One Lambda<sup>®</sup>), analisados e a tipagem HLA do paciente é determinada.

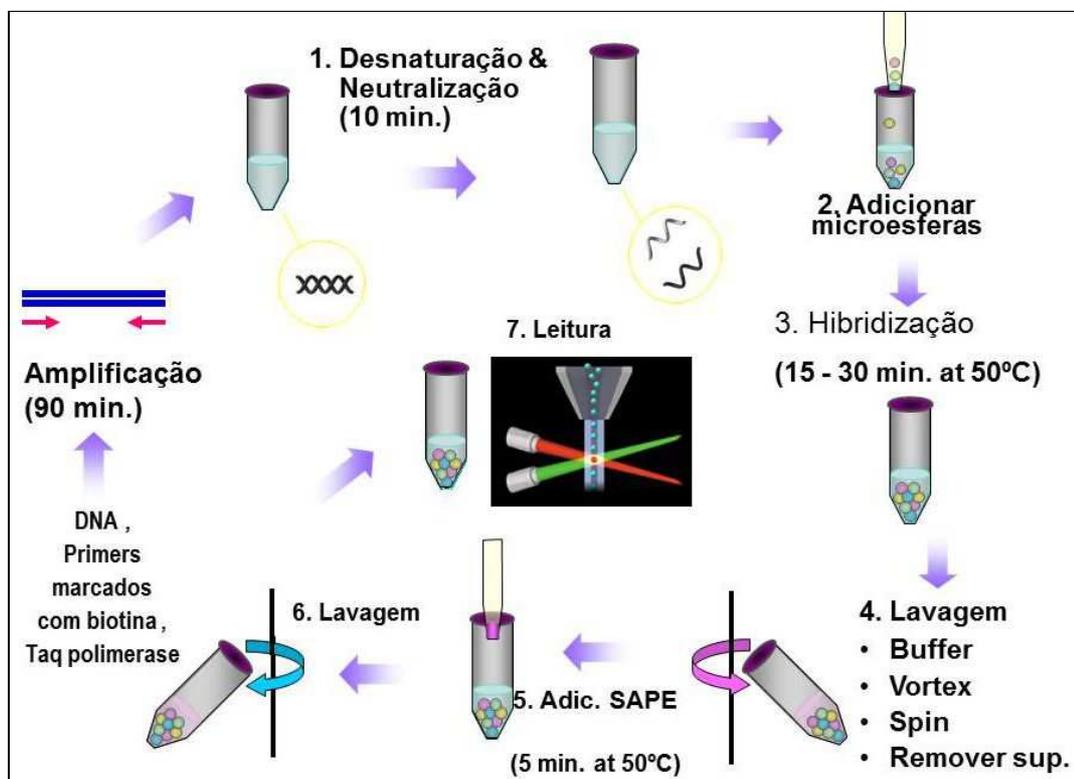


Figura 9. Esquema da técnica de tipagem HLA por SSO. Fonte: Biometrix (2006)

A tipagem HLA em alta resolução é realizada em várias etapas. Inicialmente, a amostra é amplificada utilizando-se *primers* específicos para uma região do HLA. O produto amplificado é purificado para, então, realizar a reação de sequenciamento. Nesta etapa são utilizados dideoxinucleotídeos (ddNTP) marcados com fluorocromos, além dos componentes usuais da reação de PCR. Os fragmentos gerados pela reação de sequenciamento passam por uma eletroforese capilar em sequenciador automático que, através de um laser, detecta cada uma das bases nitrogenadas (A, T, C, G) presentes na sequência de DNA. Através de um software de análise *uType*<sup>®</sup> (Life Technologies), a sequência encontrada é comparada com uma biblioteca de sequências conhecidas para, então, ser definido o alelo HLA (Figura 10).

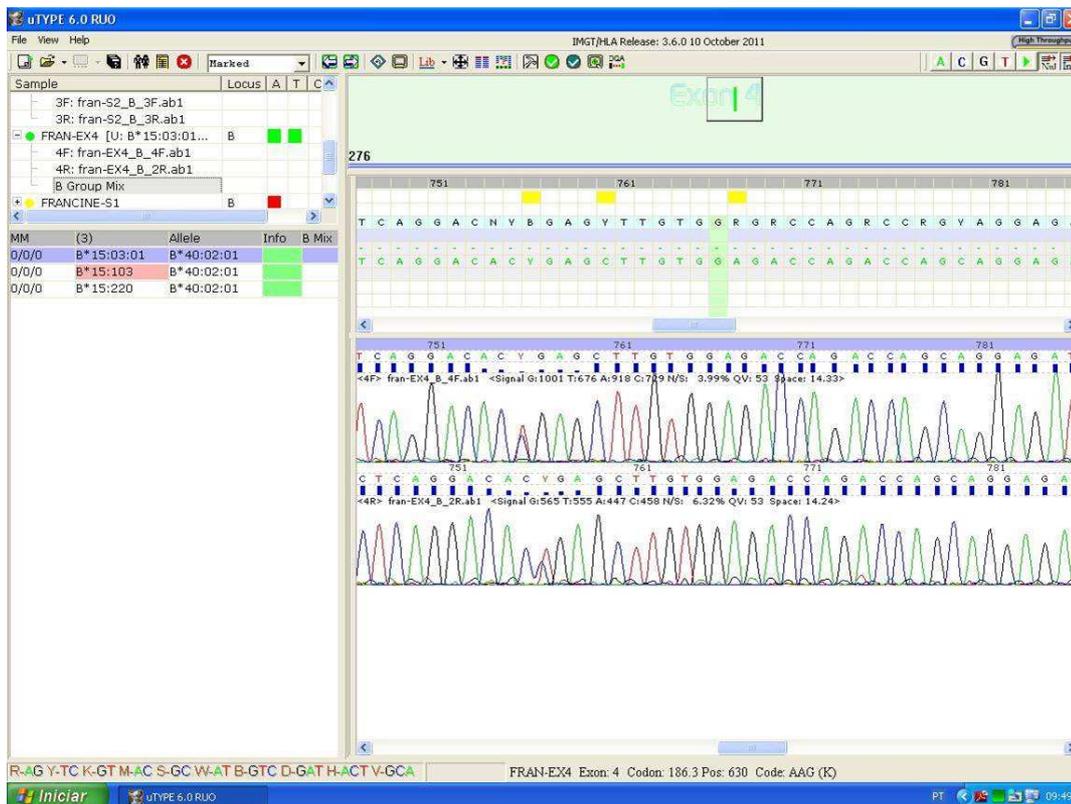


Figura 10. Software de análise da tipagem HLA por sequenciamento. Fonte: Serviço de Imunologia (HCPA)

## 2.4.2 PROVA CRUZADA POR CITOTOXICIDADE DEPENDENTE DE COMPLEMENTO (CDC)

A prova cruzada é realizada antes do transplante para detectar anticorpos pré-formados no receptor contra os antígenos HLA do doador, com o objetivo de eliminar o risco de rejeição hiperaguda.<sup>9,32</sup>

A metodologia padrão para prova cruzada é a Citotoxicidade Dependente de Complemento (CDC) sendo considerada uma exigência para os transplantes desde 1960.<sup>3,5,14,19</sup> A técnica consiste na reação entre os linfócitos do doador (antígenos) e o soro do receptor (anticorpos). Após essa incubação, é adicionado complemento de coelho e um corante (Brometo de Etídeo + Laranja de Acridina) que permite diferenciar as células mortas (coradas) e as células vivas.<sup>2,3,14</sup>

Se houver presença de anticorpos no soro do receptor, há reação com os antígenos HLA nas células do doador, ocorrendo a fixação do complemento com consequente lise celular, sendo assim, o corante irá penetrar nas células lisadas tornando-as laranjas enquanto as não lisadas permanecem da cor verde. A leitura é realizada em microscópio invertido de fluorescência com contraste de fase e é baseada na porcentagem de células mortas em comparação a um controle negativo (soro de homem sadio, grupo sanguíneo AB, sem sensibilizações prévias). A interpretação dos resultados da leitura é realizada em escore de 1-8, sendo escore 1=prova cruzada negativa (<10% de células mortas), escore 2=prova cruzada positiva (de 11% a 20% de células lisadas), escore 4=prova cruzada positiva (de 21% a 50% de células lisadas), escore 6=prova cruzada positiva (de 51% a 80% de células lisadas), escore 8=prova cruzada positiva (de 81% a 100% de células lisadas) (Figura 11).<sup>14</sup>

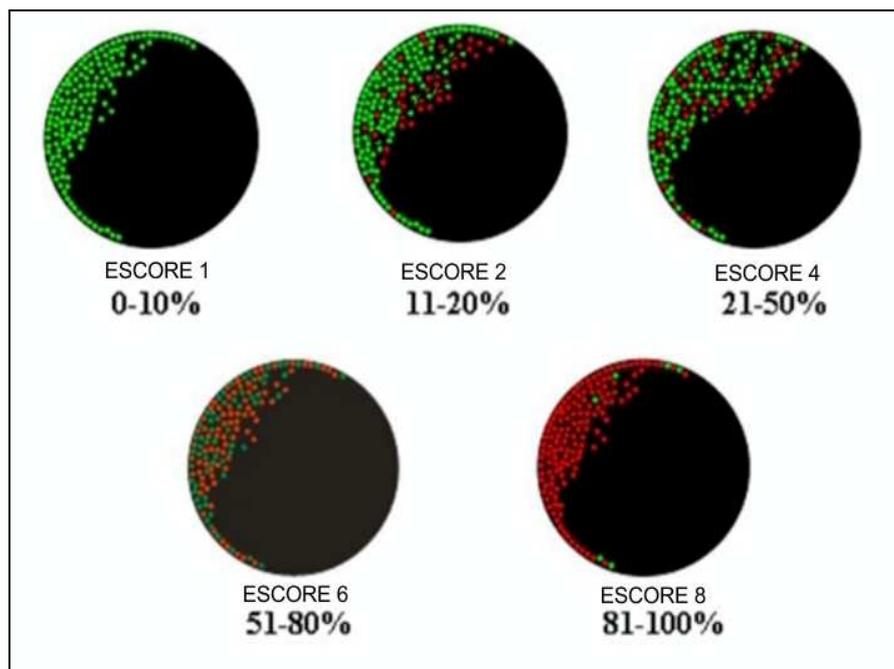


Figura 11. Leitura da prova cruzada por CDC. Fonte: Serviço de Imunologia (HCPA).

O teste é realizado com linfócitos T e B separadamente, portanto detecta tanto anticorpos contra antígenos de classe I que são expressos nos linfócitos T quanto aos de classe II que são expressos nos linfócitos B. Além disso, utiliza-se um reagente redutor chamado

Dithiothreitol (DTT) que inativa os anticorpos IgM, possibilitando identificar a reatividade devido aos anticorpos IgG somente. Dessa maneira, pode-se diferenciar se o anticorpo é de classe IgG ou IgM. A maioria dos anticorpos anti-HLA é IgG, enquanto que anticorpos IgM são frequentemente auto anticorpos. Sendo assim, uma prova cruzada negativa na presença de DTT, significa que a prova cruzada positiva sem DTT pode ser devido à presença de auto anticorpos cujo papel clínico ainda não está totalmente esclarecido.<sup>5</sup>

Ao longo dos anos, mudanças foram introduzidas para aumentar a sensibilidade do CDC, como a adição da antiglobulina humana (AGH), que é um segundo anticorpo que se fixa aos anticorpos do paciente aderidos aos linfócitos do doador, potencializando a reação de citotoxicidade.<sup>18</sup>

Uma prova cruzada por CDC positiva para linfócitos T é uma contraindicação para o transplante renal, entretanto, a significância de uma prova cruzada positiva para linfócitos B continua controversa.<sup>7,9</sup>

Embora o CDC reflita a situação in vivo e seja o padrão ouro por muitos anos, este teste certamente não é perfeito e tem diversas desvantagens. Como o alvo no CDC é o linfócito, não apenas as moléculas HLA serão detectadas, mas também outras moléculas irrelevantes. Os anticorpos contra linfócitos próprios do paciente (auto anticorpos), imunocomplexos, e alótipos de imunoglobulinas interferem neste ensaio. Além disso, um teste baseado na ativação de complemento, implica que anticorpos IgG que não são fixadores de complemento como IgG2 e IgG4 não são detectados. Essa é a razão do uso de outros ensaios mais sensíveis, como por exemplo, a citometria de fluxo (FCXM), que provou ser mais sensível, embora ainda tenha a desvantagem de utilizar células que possuem muitas moléculas não-HLA na superfície e requerer uma boa viabilidade celular.<sup>3,18,33</sup>

### **2.4.3 PROVA CRUZADA POR CITOMETRIA DE FLUXO (FCXM)**

Desde que foi descrita pela primeira vez em 1983, o uso da FCXM tem aumentado por causa de sua grande sensibilidade em relação ao ensaio padrão por CDC.<sup>33</sup> Através dessa técnica pode-se detectar anticorpos em baixos títulos.

Na FCXM, os linfócitos do doador são incubados com o soro do receptor. Um anticorpo secundário marcado com fluorocromo (PE-Ficoeritrina ou FITC-Fluoresceína) é adicionado na reação. Caso o paciente tiver anticorpos contra as células do doador, o anticorpo secundário irá ligar-se a eles. Então, as células T e B são diferenciadas através da adição de anticorpos monoclonais anti-CD3 (células T) e anti-CD20/CD19 (células B) marcados com outro fluorocromo (PE-Ficoeritrina, FITC-Fluoresceína ou PercP-Cloreto de Peridina Clorofila).<sup>3,34</sup>

A aquisição e análise dos dados são realizadas em Citômetro de Fluxo que funciona através da individualização das células em suspensão que passam por um feixe de laser. A excitação dos elétrons do fluorocromo é captada pelo aparelho que determina a intensidade da fluorescência. A intensidade de fluorescência do soro testado é comparada com a intensidade de fluorescência de um soro controle negativo (sem anticorpos) incubado com a mesma população de células (mesmo doador). Uma FCXM positiva é definida pela diferença de 40 canais entre a média de fluorescência do controle negativo e da amostra testada (soro do receptor) (Figura 12).<sup>3,34</sup>

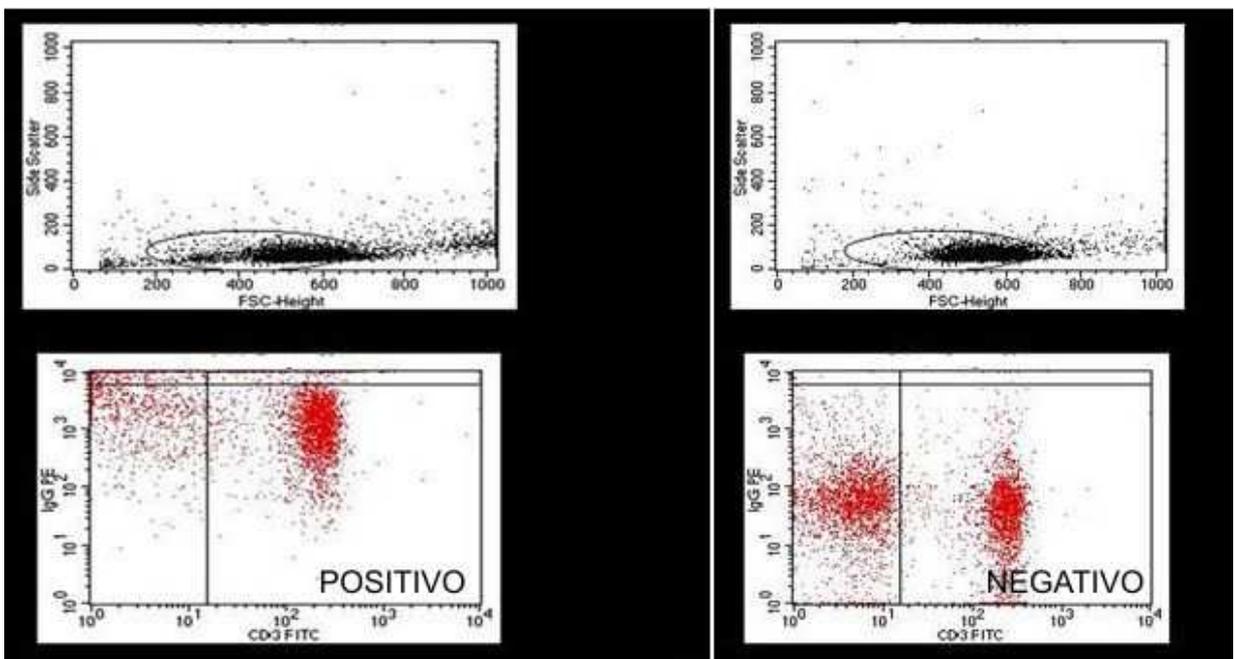


Figura 12. Gráficos de resultado de prova cruzada por citometria de fluxo (positivo e negativo). Fonte: Facs-calibur-Serviço de Hematologia - HCPA.

A FCXM é atualmente a prova cruzada mais sensível. Existem muitas evidências que demonstram que essa técnica, sendo mais sensível que o CDC, pode detectar anticorpos adicionais clinicamente relevantes. Entretanto, muitos pacientes com CDC negativo e FCXM positiva têm um pós-transplante sem evidências de rejeição.<sup>7,8,18</sup>

Além disso, a relevância clínica de uma FCXM positiva para linfócitos B é ainda questionada.<sup>33</sup>

#### **2.4.4 AVALIAÇÃO DE REATIVIDADE CONTRA PAINEL (PRA)**

Os pacientes que estão em lista de espera para transplante renal são triados rotineiramente em busca da presença de anticorpos reativos pré-formados contra antígenos HLA. Esses anticorpos podem ter sido produzidos como resultado de transfusões, gestações e transplantes prévios. A avaliação de reatividade contra painel (PRA – *Panel Reactive Antibodies*) é o teste utilizado para essa triagem.

Dois tipos de ensaios, diferenciados pelo alvo, são usados para detecção e identificação dos anticorpos anti-HLA: a citotoxicidade que utiliza células e os imunoenaios de fase sólida que usam moléculas HLA solúveis como o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e a metodologia *Labscreen*<sup>®</sup> (One Lambda<sup>®</sup>). Muitos dos problemas dos ensaios baseados em células, a viabilidade celular e a falta da especificidade anti-HLA, foram resolvidos pelas metodologias de fase sólida. Além disso, os ensaios de fase sólida têm uma maior sensibilidade, requerem um menor volume de soro, e podem ser parcialmente ou totalmente automatizados (Figura 13).<sup>7,14,19,31</sup>

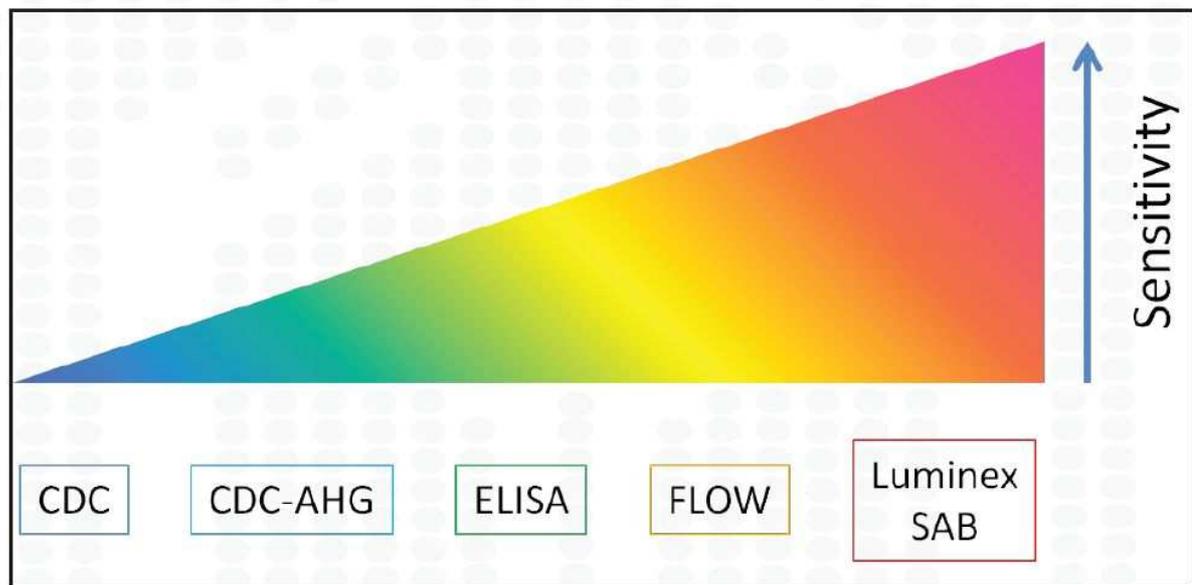


Figura 13. Sensibilidade dos métodos de detecção de anticorpos. FONTE: Biometrix (2012).

O PRA por Citotoxicidade utiliza a metodologia da prova cruzada por CDC. Células (antígenos) com a tipagem HLA conhecidas são selecionadas e adicionadas nos orifícios de uma placa contendo o soro do paciente. Então é adicionado complemento de coelho e, após incubação, é adicionada eosina como corante. As placas são lidas no microscópio com contraste de fase. A leitura realizada em cada orifício da placa é dada em função da porcentagem de células lisadas de acordo com os mesmos escores do CDC. Sendo a leitura de um orifício maior que 10% do que a leitura do controle negativo é considerado positivo, significando que o paciente é sensibilizado contra um ou mais antígenos da célula presente naquele orifício. Sendo assim, é realizado um cálculo aproximado para saber a porcentagem de células com as quais o soro do paciente reagiu.

O método imunoenzimático ELISA é baseado na interação antígeno-anticorpo. São utilizadas placas comerciais com diferentes especificidades de antígenos HLA adsorvidos aos orifícios. O soro do paciente é colocado em todos os orifícios. Caso exista a presença de anticorpos anti-HLA, a fixação desses anticorpos aos antígenos da placa é detectada por uma incubação com anticorpo conjugado com fosfatase alcalina que reconhece apenas IgG. A leitura

é feita em espectrofotômetro após adição de substrato de enzima apropriado para o desenvolvimento de cor (cor=presença de anticorpos, sem cor=ausência de anticorpos).<sup>15,31</sup>

Atualmente, o método mais usado para detecção de anticorpos anti-HLA é baseado em microesferas fluorescentes com a tecnologia Luminex,<sup>13,14,19</sup> devido a sua alta sensibilidade e especificidade, especialmente para detecção de anticorpos mesmo que em baixos títulos. Existem três diferentes tipos de ensaios que utilizam essa metodologia (*Mixed*, PRA e SA). Na triagem (*Labscreen® Mixed*) as microesferas multicoloridas são revestidas com um “pool” de antígenos HLA (classe I e II) de diversas linhagens celulares, o resultado é apenas qualitativo e inespecífico (Positivo ou Negativo) para HLA classe I, HLA classe II e MIC-A separadamente. No *Labscreen® PRA* cada microesfera é revestida com um fenótipo HLA de um indivíduo, sendo possível determinar a especificidade HLA, mas não precisamente devido à presença de mais de um antígeno por microesfera. No SA as microesferas são individualmente revestidas com apenas um antígeno HLA o que permite uma definição precisa da especificidade dos anticorpos anti-HLA e em qual concentração eles são encontrados no soro de um receptor.<sup>14</sup>

Nos três tipos de ensaio, o soro do paciente é inicialmente incubado com as microesferas, assim, qualquer anticorpo anti-HLA presente no soro irá se ligar aos antígenos (Figura 14).

Posteriormente, ocorre uma série de lavagens que remove os anticorpos que não se ligaram e há marcação com IgG de cabra anti-humano conjugado com R-ficoeritrina (PE). Após outra série de lavagens, as amostras são transferidas para uma placa de leitura para a aquisição dos dados. O Luminex utiliza um laser vermelho que reconhece a cor de cada microesfera e um laser verde que determina o resultado de acordo com a intensidade de fluorescência emitida pela PE presente na superfície de cada microesfera.

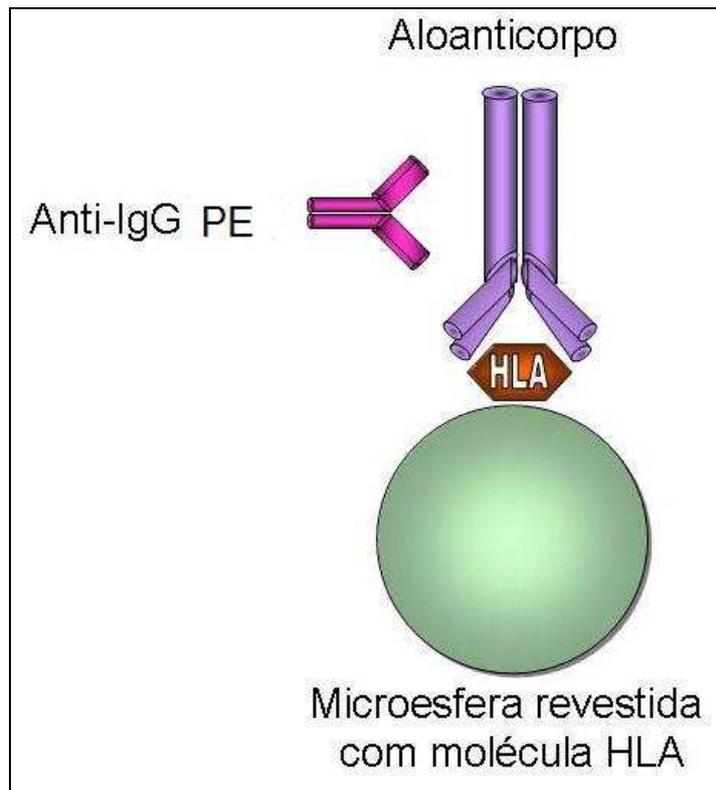


Figura 14. Microesfera revestida com única molécula HLA incubada com soro do receptor e anticorpo secundário conjugado (Anti-IgG PE).

Após a aquisição dos dados, os resultados obtidos são analisados no *software HLA Fusion* (Figura 15). Considera-se positivo para a presença de anticorpos, a média da intensidade de fluorescência (MFI) da reação maior do que 500.<sup>15,31</sup>

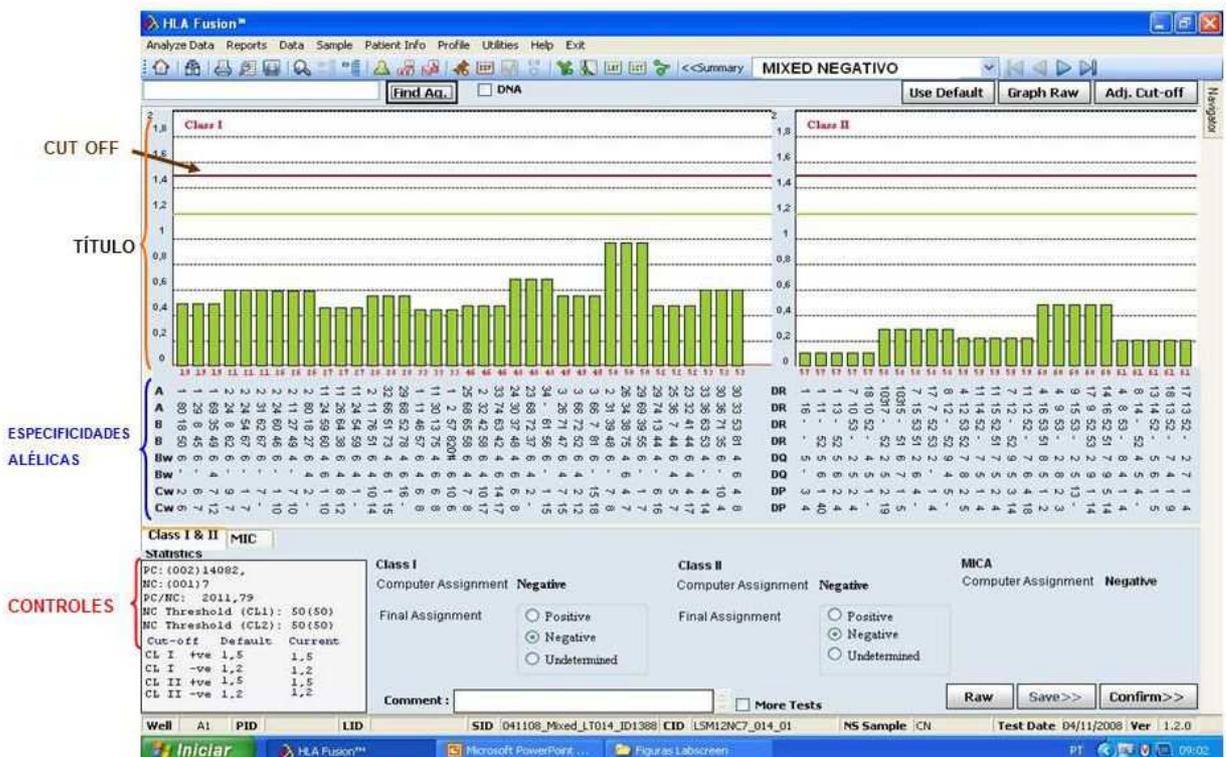


Figura 15. Análise de PRA no software HLA Fusion. Fonte: Serviço de Imunologia (HCPA).

O objetivo da avaliação de reatividade contra painel é avaliar o grau de sensibilização do paciente aos antígenos HLA, sendo expresso em porcentagem, podendo variar de 0% a 100%. Desse modo pode-se detectar pacientes com alto risco de rejeição, melhorando a interpretação clínica dos resultados.<sup>21</sup>

## 2.5 ANTICORPOS NO PÓS-TRANSPLANTE

O desenvolvimento das técnicas de fase sólida foi um grande benefício nos testes de histocompatibilidade, pré e pós-transplante, promovendo aumento de sensibilidade e especificidade.

Nos últimos anos, essas técnicas tem sido utilizadas para detecção de DSA, mesmo em baixos títulos, sendo possível identificar o título de cada especificidade.<sup>6,9</sup> Com essas

informações, é possível uma avaliação da necessidade e da efetividade dos protocolos de dessensibilização, um tratamento antecipado e rápido de pacientes com rejeição mediada por anticorpos, além de uma melhor escolha do tipo de imunossupressão e da melhor estratégia de vigilância após o transplante.<sup>6,21,35</sup>

Diversos estudos sobre a sensibilização aos antígenos do sistema HLA no pós-transplante renal indicam que o monitoramento desses anticorpos pode ser importante na identificação dos pacientes com maior risco de rejeição e perda do enxerto, principalmente, no primeiro ano pós-transplante.<sup>36,37</sup>

O desenvolvimento de DSA contra antígenos HLA do doador tem sido significativamente correlacionado com rejeição humoral aguda. Estudos realizados em 2001 demonstraram que 80% dos pacientes que desenvolveram anticorpos DSA podem desenvolver tanto rejeição aguda como crônica.<sup>9</sup>

A presença de DSA na rejeição aguda está associada à redução da sobrevida do enxerto a longo prazo. Pacientes com DSA tem uma taxa de 16% em cinco anos de sobrevida do enxerto comparado a taxa de 6% dos sem DSA. Além disso, os dados sugerem que a rápida redução de DSA durante a terapia de rejeição está associada com a melhora na sobrevida do enxerto a longo prazo.<sup>10</sup>

Muitos dados clínicos e experimentais sugerem que DSA provavelmente tem um importante papel na indução ou aceleração, também, da rejeição crônica ao enxerto. Na prática clínica, DSA é usualmente detectado no soro do paciente, mas podem se fixar no enxerto não sendo detectados na circulação, mas somente após a nefrectomia do transplante. Sendo assim, a porcentagem de rejeição crônica associada à presença de DSA pode estar subestimada.<sup>9,11</sup>

De acordo com o *Guideline* da Sociedade Britânica de Histocompatibilidade e Imunogenética de 2010<sup>29</sup>, o laboratório deve ter uma estratégia para a detecção e caracterização de anticorpos clinicamente relevantes com a capacidade de definir a classe e a especificidade do anticorpo e a combinação de resultados de diversos testes devem ser considerados para resolver perfis complexos de anticorpos. Além disso, o monitoramento pós-transplante deve ser realizado em intervalos regulares, no momento da realização de biópsia e

em casos de suspeita de rejeição. Amostras devem ser testadas também no momento de declínio da função renal quando não há outra causa clínica.<sup>7,9,29</sup>

O acompanhamento é feito de modo que para cada DSA, é medida a fluorescência do anticorpo (MFI)<sup>6</sup> em vários períodos pós-transplante.<sup>3,38</sup>

A redução de DSA está associada com a maior sobrevida do aloenxerto a longo prazo. Portanto, a detecção precoce desses anticorpos e tratamento específico é um simples e efetivo caminho de prevenir a falência do enxerto.<sup>10,39</sup>

As tecnologias SA e xmDSA permitem a detecção de DSA de formas distintas. Entretanto, a significância clínica de níveis muito baixos de DSA detectáveis somente pela tecnologia Luminex é incerta e um grande desafio na alocação de órgãos.<sup>9</sup>

### **2.5.1 SINGLE ANTIGEN (SA)**

Os ensaios baseados na metodologia Luminex tornaram-se o método mais popular na detecção de anticorpos anti-HLA devido a sua alta sensibilidade e especificidade, especialmente para detecção de DSA, mesmo que em baixos títulos.<sup>18</sup>

A maior vantagem do SA é a acurada avaliação de soros de pacientes altamente imunizados cujos anticorpos são difíceis de caracterizar, além de permitir a detecção de anticorpos contra alelos HLA específicos.<sup>11,14</sup>

A detecção de anticorpos anti-HLA realizada com o SA utiliza microesferas revestidas com uma única molécula HLA classe I (LSA1) ou classe II (LSA2) e reagentes pré-otimizados para a detecção desses anticorpos, definindo com precisão a presença de anticorpos e sua especificidade.<sup>31</sup>

Em uma placa, o soro do paciente é inicialmente incubado com as microesferas, assim, os anticorpos que estiverem presentes no soro irão ligar-se aos antígenos específicos na superfície das microesferas.

Posteriormente, ocorre uma série de lavagens para remover os anticorpos e antígenos que não se ligaram. A seguir, é adicionada uma IgG de cabra anti-humana conjugada com

ficoeritrina (PE) como anticorpo secundário. Após outra série de lavagens, as amostras são transferidas para uma placa de leitura para a aquisição dos dados no Luminex. A combinação dos dois sinais (laser vermelho e verde) definem a especificidade dos anticorpos e o valor da intensidade média de fluorescência (MFI) de cada microesfera (título do anticorpo) (Figura 16).<sup>14</sup>

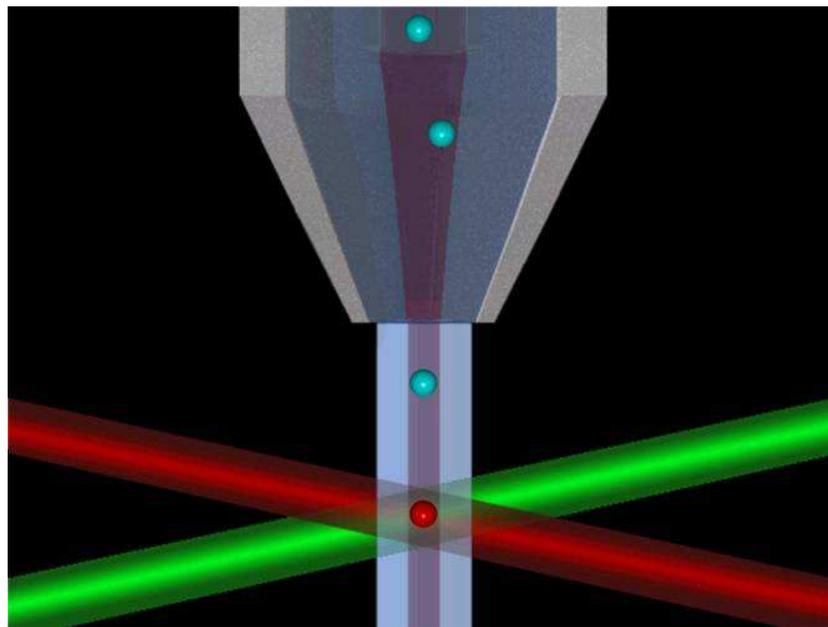


Figura 16. Leitura de microesfera pelo laser do Luminex. Fonte: Biometrix (2006)

Os dados brutos são coletados pelo Luminex e exportados para o software de análise HLA Fusion. O software processa os dados brutos e interpreta os valores resultantes das microesferas através de um ordenamento das microesferas positivas para as negativas. Os antígenos associados a cada microesfera são listados mostrando se a microesfera é positiva ou negativa. Considera-se positivo para a presença de anticorpos a média da intensidade de fluorescência (MFI) da reação maior do que 500.

O software, então, sugere quais alelos/antígenos deverão ser usados para a atribuição final da especificidade. O relatório gerado deverá ser analisado pelo profissional. O software permite o cálculo da porcentagem do PRA baseado na frequência dos vários antígenos da

população local (banco de tipagens de doadores falecidos). Essa ferramenta substitui o cálculo convencional de PRA que é a porcentagem de um painel de antígenos HLA.<sup>18</sup>

Além disso, o SA possibilita a realização de uma prova cruzada virtual prevendo possíveis reações contra as especificidades HLA existentes nas células de um doador. A verificação da existência de DSA é feita através da comparação da tipagem HLA do doador previamente tipado com as especificidades dos anticorpos do receptor.<sup>37</sup>

Pacientes com prova cruzada virtual positiva têm maior risco de terem episódios de rejeição e uma pior evolução no transplante.<sup>13,37</sup> Isso foi demonstrado por Caro-Oleas *et al.*<sup>8</sup> em estudo onde pacientes que receberam transplantes com prova cruzada virtual positiva e com CDC negativo tiveram uma pior sobrevida do enxerto em comparação aqueles pacientes que receberam transplantes com prova cruzada virtual negativa.<sup>37</sup>

A prova cruzada virtual permite a exclusão de doadores que expressam antígenos HLA contra aqueles que o paciente é imunizado. Zachary *et al.*<sup>21</sup> demonstraram que a identificação e a determinação do título do DSA, detectados por testes de fase sólida, correlacionam-se com CDC e FCXM. Essa correlação permite prever o resultado do CDC e da FCXM em 92% dos casos. Uma das maiores questões da prova cruzada virtual é a falta de padronização da interpretação. Os valores de MFI devem ser previamente definidos para servir como ponto de corte para definir se uma prova cruzada virtual é positiva ou negativa.<sup>7,14</sup>

A identificação dos anticorpos anti-HLA pelo Luminex melhorou a definição de antígenos aceitáveis e não aceitáveis, facilitando a troca de órgãos entre diferentes centros e o transplante em pacientes hipersensibilizados. Porém, muitos estudos mostram que baixos níveis de anticorpos não estão sempre associados com efeitos adversos. Portanto, a detecção de anticorpos anti-HLA irrelevantes pode levar à discriminação de pacientes imunizados no momento da alocação de órgãos. Se a alta sensibilidade desses testes for usada unicamente para detectar baixos níveis de DSA, a chance de pacientes sensibilizados serem transplantados é reduzida por causa da presença de anticorpos que podem não ter relevância clínica, resultando em uma lista de espera maior.<sup>9,14</sup>

A detecção de DSA utilizando microesferas é uma ferramenta que estratifica o risco para o transplante renal,<sup>13</sup> mas a significância clínica de níveis muito baixos de DSA detectáveis somente pela tecnologia Luminex é um desafio na alocação de órgãos.<sup>9</sup>

### **2.5.2 DONOR SPECÍFIC ANTIGEN (xmDSA)**

Embora a relevância clínica desses anticorpos detectados por técnicas baseadas em microesferas seja ainda uma questão em debate, a disponibilidade de uma nova prova cruzada prospectiva é altamente desejável.<sup>20</sup>

A prova cruzada feita no Luminex (xmDSA) permite uma prova cruzada real utilizando a molécula HLA do doador, microesferas recobertas com anticorpos anti-HLA de classe I e II e o soro do receptor (anticorpos).<sup>22</sup>

No xmDSA, as células do doador são isoladas do sangue periférico, baço, linfonodos ou outros tecidos, e usadas como fonte de HLA. As células isoladas são dissolvidas com um detergente não-iônico (tampão de lise de linfócitos) que lisa as células e permite que o HLA fique solúvel. Esta solução chamada “lisado” é congelada e pode ser mantida por anos.<sup>16</sup>

O xmDSA inclui uma mistura de microesferas conjugadas com anticorpos monoclonais específicos para uma região invariável e comum das moléculas HLA de classe I ou de classe II. Quando misturadas com um “lisado”, os anticorpos nas microesferas irão capturar o HLA solubilizado que servirá para detectar os anticorpos específicos contra esse HLA em uma amostra de soro do receptor (Figura 17).<sup>16,20,22</sup>

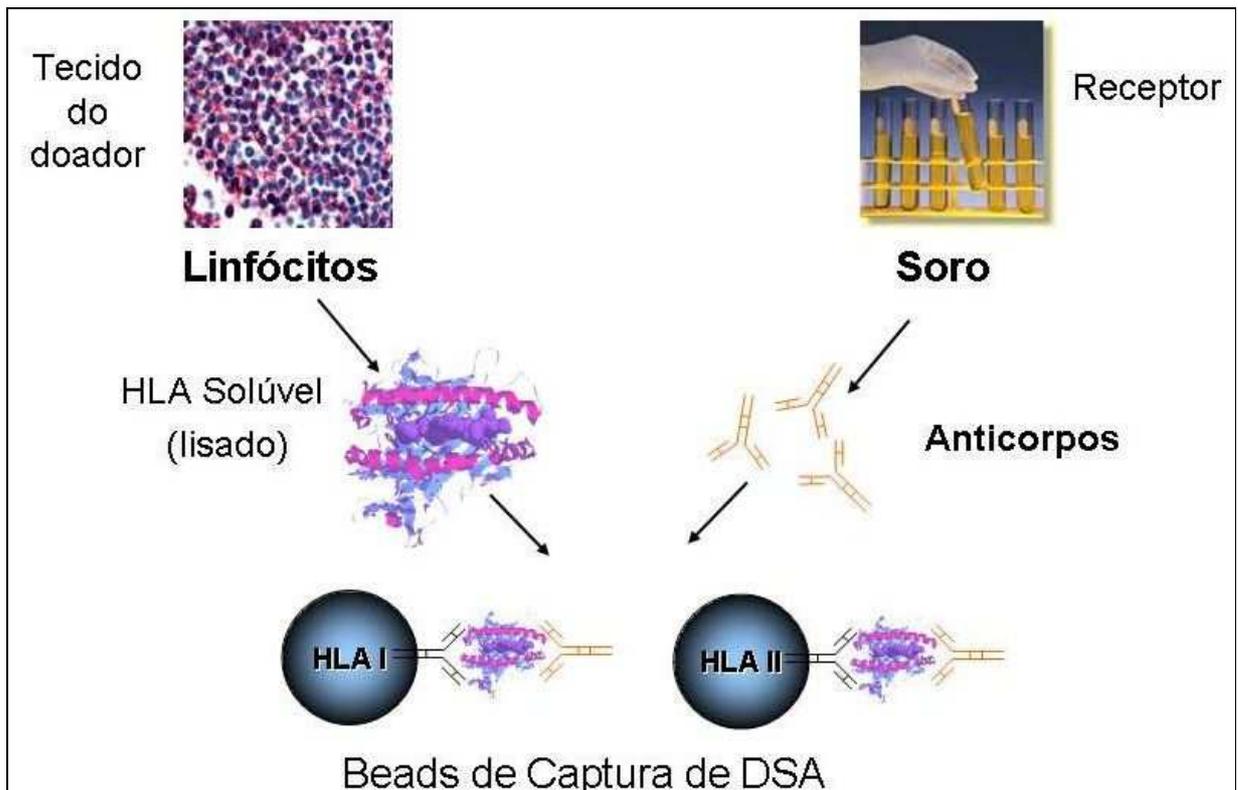


Figura 17. Esquema da técnica xmDSA. Fonte: Tepnel Lifecodes (2009).

Existe, também, uma microesfera controle positivo para avaliar a ligação do anticorpo secundário, sendo o valor mínimo de MFI maior que 10.000. Além disso, três microesferas controle negativo (CON1, CON2 e CON3) são incluídas, e seus valores de fluorescência (MFI) são utilizados como um sinal de background e para normalizar o sinal das microesferas de captura. O teste é considerado inválido se o valor do MFI do controle negativo for maior que 500. Além disso, em paralelo com o soro do receptor, as microesferas são incubadas com anticorpos monoclonais contra HLA de classe I e II biotinizados, chamado de controle do lisado (LCR) que é usado para indicar a correta ligação do HLA do doador nas microesferas, sendo o valor de MFI igual a 10.000, caso contrário o teste é inválido.<sup>16</sup>

Após a incubação do lisado com as microesferas, essa mistura é transferida para uma placa de filtro e lavada. A seguir, o soro é diluído e adicionado na placa que é novamente incubada, seguida de outra lavagem. Um conjugado anti-IgG humano marcado com ficoeritrina

(PE) é adicionado. Após nova incubação, o tampão de lavagem é adicionado aos poços e a placa é colocada no Luminex. Os dados são coletados e a análise é realizada no software *Quicktype for LifeMatch* versão 2.5 (Tepnel Lifecodes) para obter os valores de fluorescência das microesferas de captura e controles. Para definir positividade, a média dos três controles negativos são subtraídos do MFI obtido do soro teste. Um valor de MFI maior que 1000 é considerado positivo para classe I e maior que 700 para classe II.<sup>16,20,22</sup>

Muitos estudos mostram boa correlação entre o xmDSA e a detecção de anticorpos pelo SA na detecção de DSA contra antígenos HLA A, B e DR. Entretanto, o xmDSA possui baixa sensibilidade para detectar DSA anti- DQ e DP. O xmDSA tem vantagens em relação ao CDC visto que o lisado pode ser estocado por longo tempo e pode ser muito útil no monitoramento pós transplante. O xmDSA detecta apenas anticorpos IgG, prevenindo resultados falsos-positivos causados por anticorpos irrelevantes e pode detectar HLA raros por utilizar a própria molécula HLA do doador. Caso o paciente tenha uma especificidade HLA rara, esses poderão não estar incluídos no painel de microesferas do SA, mas os anticorpos poderão ser identificados pelo xmDSA.<sup>9</sup>

### 3 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO). Registro Brasileiro de Transplantes (RBG) – Janeiro/Setembro 2012. Disponível em: <<http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2012/RBT2012-3TRIM-PARCIAL.pdf>>. Acesso em 19 de janeiro de 2013.
2. ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, 580 p.
3. CAI, J.; TERASAKI, P. I. Human Leukocyte Antigen Antibodies for Monitoring Transplant Patients. **Surgery Today**, v. 35, p. 605-612, 2005.
4. CARPIO, V. N. Correlação entre a presença do complemento C4d em biópsias de enxerto renal, rejeição aguda e crônica humoral e anticorpos anti-HLA em pacientes transplantados renais. 123 f. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.
5. GARCIA, V.D.; ABBUD, M. e NEUMANN, J. **Transplante de órgãos e tecidos**. 1. ed. São Paulo: Segmento Farma, 1997. 992 p.
6. MOURA, L.R.R *et al.* Diagnóstico e tratamento da rejeição aguda mediada por anticorpo no transplante renal: papel do C4d e da pesquisa de anticorpo específico contra o doador. **Einstein**, v. 7, p. 427-435, 2009.
7. TAIT, B.D. *et al.* Consensus Guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. **Transplantation**, v.95, p.19-47, 2013.
8. CARO-OLEAS, J.L. *et al.* Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation. **Nephrol Dial Transplant**, v. 27, p. 1231-1238, 2012.
9. ENG, H.S. *et al.* Clinical significance of anti-HLA antibodies detected by Luminex: Enhancing the interpretation of CDC-BXM and important post-transplantation monitoring tools. **Human Immunology**, v. 70, p. 595-599, 2009.
10. EVERLY, M.J. *et al.* Reducing De Novo Donor-Specific Antibody Levels during Acute Rejection Diminishes Renal Allograft Loss. **American Journal of Transplantation**, v. 9, p. 1063-1071, 2009.
11. BOCRIE, O. *et al.* Distribution of donor-specific antibodies in the córtex and the medulla of renal transplants with chronic allograft nephropathy. **Transplant Immunology**, v. 17, p. 227-229, 2007.

12. LI, X. *et al.* Poor graft outcome in recipients with de novo donor-specific anti-HLA antibodies after living related kidney transplantation. **Transplant International**, v. 21, p. 1145-1152, 2008.
13. GIBNEY, E.M. *et al.* Detection of donor-specific antibodies using HLA-coated microspheres: another tool for kidney transplant risk stratification. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 21, p. 2525-2629, 2006.
14. PICASCIA, A.; INFANTE, T.; NAPOLI, C. Luminex and antibody detection in kidney transplantation. **Clinical Exp. Nephrology**, v. 16, P. 373-381, 2012.
15. ONE LAMBDA<sup>®</sup>, CANOGA PARK, CA. **LABScreen<sup>®</sup> Single Antigen**. Material de apoio suporte técnico científico. Disponível em: <<http://www.onelambda.com>>. Acesso em 20 de fevereiro de 2011.
16. TEPNEL LIFECODES, STAMFORD, CT. **Lifecodes DSA Donor Specific Antibody**. Material de apoio suporte técnico científico. Disponível em: <<http://www.gen-probe.com>>. Acesso em 20 de fevereiro de 2011.
17. EL-AWAR, N.; LEE, J.; TERASAKI, P.I. HLA Antibody Identification With Single Antigen Beads Compared To Conventional Methods. **Human Immunology**, v. 66, p. 989-997, 2005.
18. TAIT, B.D. *et al.* Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. **Nephrology**, v.14, p. 247-254, 2009.
19. TAIT, B. Solid phase assays for HLA antibody detection in clinical transplantation. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, p. 573-577, 2009.
20. BILLEN, E.V.A. *et al.* Luminex donor-specific crossmatches. **Tissue Antigens**, v. 71, p. 507-513, 2008.
21. ZACHARY, A.A. *et al.* Naturally occurring interference in Luminex assays for HLA-specific antibodies: Characteristics and resolution. **Human Immunology**, v.70, p. 496-501, 2009.
22. CARO-OLEAS, J.L. *et al.* Donor-specific antibody detection: comparison of single antigen assay and Luminex crossmatches. **Tissue Antigens**, v.76, p. 398-403, 2010.
23. BAHRAM, S. *et al.* A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. **Immunology**, v.91, p. 6259-6263, 1994.
24. BAHRAM, S. e SPIES, T. The MIC gene Family. **66<sup>th</sup> Forum in Immunology**. p. 328-332, 1996.
25. BAHRAM, S. *et al.* Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. **Immunogenetics**, v44, p.80-81, 1996

26. ZWIRNER, N. W. *et al.* MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. **Immunogenetics**, v. 47, p. 139-148, 1998.
27. MIZUTANI, K. *et al.* The Importance of Anti-HLA-Specific Antibody Strength in Monitoring Kidney Transplant Patients. **American Journal of Transplantation**, v.7, p. 1027-1031, 2007.
28. TERASAKI, P.; OZAWA, M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. **American Journal of Transplantation**, v. 4, p. 438-443, 2004.
29. HOWELL, W.M. *et al.* British Society for Histocompatibility & Immunogenetics and British Transplantation Society Guidelines for the detection and characterization of clinically relevant antibodies in allotransplantation. **International Journal of Immunogenetics**, v. 37, p. 435-437, 2010.
30. BUNCE, M. *et al.* Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). **Tissue Antigens**, v. 46, p. 355-367, 1995.
31. BIOMETRIX DIAGNÓSTICA. **LABScreen® Single Antigen**. Material de apoio suporte técnico científico. Disponível em: <<http://www.biometrix.com.br>>. Acesso em 20 de março de 2013.
32. BILLEN, E.V.A.; CHRISTIAANS, M.H.L.; BERG-LOONEN, E.M. Clinical relevance of Luminex donor-specific crossmatches; data from 165 renal transplants. **Tissue Antigens**, v.74, p. 205-212, 2009.
33. ROELEN, D.L.; DOXIADIS, I.I.N.; CLAAS, F.H.J. Detection and clinical relevance of donor specific HLA antibodies: a matter of database. **Transplant International**, v. 25, p. 604-610, 2012.
34. BRAY. R.A. Flow Cytometry Crossmatching for Solid Organ Transplantation. **Methods in cell biology**, v. 41, p.103-119, 1994.
35. HWANG, H.S. *et al.* Antibody monitoring system to support the single-antigen Luminex assay in donor-specific antibody detection. **Human Immunology**, v. 73, p. 370-375, 2012.
36. TORESAN, R. *et al.* Association Between the Presence of Anti-HLA Antibodies With Acute Rejection and Chronic Allograft Nephropathy in the First Year After Kidney Transplantation. **Transplantation Proceedings**, v.40, p. 718-719, 2008.
37. CARO-OLEAS, J.L. *et al.* Clinical relevance of anti-HLA donor-specific antibodies detected by Luminex assay in the development of rejection after renal transplantation. **Transplantation**, v. 94, p. 338-344, 2012.

38. COOPER, J.E. *et al.* Inferior kidney allograft outcomes in patients with de novo donor-specific antibodies are due to acute rejection episodes. **Transplantation**, v. 20, P.1-7, 2011.
39. HOSHINO, J. *et al.* Using donor-specific antibodies to monitor the need for immunosuppression. **Transplantation**, v.93, n. 11, p. 11-73-1178, 2012.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Identificar a presença de anticorpos anti-HLA circulantes específicos contra o doador no soro de pacientes submetidos a transplante renal no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Utilizando para isso duas metodologias distintas concomitantemente; xmDSA e SA.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

4.2.1. Comparar a sensibilidade e a especificidade das duas metodologias Luminex (SA e xmDSA) na identificação de anticorpos anti-HLA doador específico.

4.2.2. Verificar a frequência de anticorpos anti-HLA doador específico no soro do paciente após o transplante.

## 5 ARTIGO ORIGINAL (INGLÊS)

### COMPARATIVE ANALYSIS OF TWO METHODS FOR DETECTION OF ANTI-HLA DONOR SPECIFIC ANTIBODIES AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION

Beatriz Chamun Gil<sup>1,3</sup>, Adriane Stefani Silva Kulzer<sup>1</sup>, Realdete Toresan<sup>1</sup>, Alessandra da Rosa Vicari<sup>2</sup>, Iara dos Santos Fagundes<sup>1</sup>, Joice Merzoni<sup>1,3</sup>, Gisele Menezes Ewald<sup>1</sup>, Mariana de Sampaio Leite Jobim<sup>1</sup>, Roberto Ceratti Manfro<sup>2,4</sup>, Luiz Fernando Jobim<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

<sup>2</sup>Department of Nephrology – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

<sup>3</sup>Graduate Program in Medical: Surgical Sciences - UFRGS

<sup>4</sup>Graduate Program in Medical: Medical Sciences - UFRGS

#### ABSTRACT

Preformed antibodies against human leucocyte antigens (HLA) may be present in the blood of patients candidates for kidney transplantation. The production of these antibodies can occur even in later periods after transplantation, developing donor-specific antibodies (DSA). The assays based on Luminex technology are currently the most popular to detect anti-HLA antibodies, due to their high sensitivity and specificity, such as LABScreen Single Antigen (SA - © One Lambda, Canoga Park, CA) and Donor Specific Antibody (xmDSA) (DSA - Tepnel Lifecodes, Stamford, CT). Thus, this cross-sectional study was carried out aiming to detect DSA post-transplant (6<sup>th</sup> month), using SA and xmDSA methodologies. Sera from 122 patients undergoing deceased donor kidney transplantation from Hospital de Clinicas de Porto Alegre were included. SA detected the presence of DSA class I in 17 patients (13.9%) and DSA class II in 22 patients (19.6%), while xmDSA detected DSA class I in 18 patients (14.8%) and DSA class II in 18 patients

(14.8 %). DSA were detected in 15 patients (12.3%) by both methods. There was agreement between the tests for class I ( $\kappa = 0.66$ ,  $p = 0.001$ ) and class II ( $\kappa = 0.54$ ,  $p = 0.025$ ). The incidence of DSA detected by SA was 15.57%, with higher prevalence of DSA anti-HLA DR. The presence of DSA detected by these techniques provides important immunological information and can assist in monitoring post-transplant immunosuppression strategies.

**Keywords:** anti-HLA antibodies. DSA. Single Antigen. xmDSA. Kidney transplantation.

## INTRODUCTION

Sensitization to HLA antigens can occur through blood transfusions, pregnancies or prior transplants. For this reason, the immune condition of kidney transplant candidates must be evaluated periodically in order to monitor the production and titration of these antibodies.

The production of antibodies against HLA can occur previously or even in later periods after transplantation, developing specific antibodies against the donor (DSA - *Donor Specific Antibody*)(1,2).

There has been a scientific improvement in the detection of anti-HLA antibodies since Patel and Terasaki reported, in 1969, the relevance of the pre-transplant crossmatch to the outcome of the transplant (2-4). The addition of anti-human globulin (AHG) improved the sensitivity of the standard complement dependent cytotoxicity (CDC) crossmatch. Subsequently, flow cytometry crossmatch (FCXM) again improved sensitivity in the detection of anti-donor antibodies. Recently, solid phase assays have been introduced for detecting anti-HLA antibodies, such as the Luminex method using synthetic microspheres coated with HLA molecules

(LABScreen<sup>®</sup> - © One Lambda, Canoga Park, CA) or anti-HLA antibodies (DSA - Tepnel Lifecodes, Stamford, CT) (3,5-8).

The assays based on Luminex technology introduce higher sensitivity and specificity (1,3,7,9-11) for detection of antibodies against HLA. In Labscreen Mixed and Labscreen PRA microspheres are coated with different HLA molecules, while in Single Antigen (SA) each microsphere is coated with only one HLA specificity, allowing a high specificity definition of anti-HLA antibodies and the titer in which they are found in the recipient serum, and also allowing a virtual crossmatch, predicting reactions against donor HLA specificities (9,11). Already, the Luminex crossmatch (xmDSA) allows a real crossmatch using donor HLA molecules (bound to beads coated with monoclonal antibodies against HLA class I or II), which will bind to the antibodies present in the serum of the recipient (11). These new techniques for detecting DSA provide important immunological information, however, further studies are yet necessary to establish best practices and clinical significance. (1,3,5,10,12).

Thus, the aim of this study was detecting DSA post-transplant, comparing xmDSA and SA methodologies.

## **MATERIALS AND METHODS**

We conducted a cross-sectional study including 122 patients undergoing deceased donor kidney transplantation from March 2011 to February 2013 of Hospital de Clinicas de Porto Alegre. Sera were collected in the 6<sup>th</sup> month post-transplantation and tested for the presence of DSA using LABScreen Single Antigen (LABScreen<sup>®</sup> - © One Lambda, Canoga Park, CA) and Donor Specific Antibody (xmDSA) (DSA - Tepnel Lifecodes, Stamford, CT) tests. All patients were

transplanted with negative crossmatch (CDC) for T lymphocytes. The recipients were typed for HLA by PCR-SSO (Sequence Specific Oligonucleotide) kit Labtype (One Lambda). The pretransplant characteristics of the recipients are described in Table 1.

### **SINGLE ANTIGEN**

All sera were tested using the Single Antigen (SA) for detecting IgG anti-HLA antibodies class I (LSA1- A, B and C) and class II (LSA2 – DR, DQ and DP) according to the manufacturer's instructions (One Lambda). In this test each bead is coated with a single purified HLA molecule. These beads were incubated with recipient serum for 30 min. After washing to remove unbound antibodies, antihuman IgG goat conjugated to phycoerythrin (PE), as the secondary antibody, was added and incubated again for 30 min. After a second washing, the samples were transferred to a new plate for the acquisition of data on the Luminex flow analyzer. The raw data were collected by Luminex and exported to analysis in the software HLA Fusion 2.0 (One Lambda). It was considered positive for the presence of antibodies when the reaction mean fluorescence intensity (MFI) was greater than 500.

### **XMDSA**

The Luminex crossmatch (xmDSA) was performed according to the manufacturer's protocol (Donor Specific Antibody - Tepnel Lifecodes, Stamford, CT).

First, the donor cells were isolated from peripheral blood, spleen, lymph nodes or other tissues and dissolved with a nonionic detergent (lysis buffer lymphocytes), which lyses the cells and solubilizes HLA molecule. This solution, called lysate, was frozen and can be kept for years.

The test was performed on a filter plate (Millipore, Bedford, MA). The lysate was incubated for 30 min with a mixture of microspheres conjugated to monoclonal antibodies specific for a constant region of HLA molecules of class I or class II to enable binding of the solubilized donor HLA. The mixture was washed in a conjunction with a vacuum manifold. After, diluted recipient serum (1:4) was added to the plate and incubated for 30 min. After another washes series, antihuman IgG goat conjugated to phycoerythrin (PE) was added as the secondary antibody, and again incubated for 30 min. Then, a wash buffer was added and data acquisition was performed in Luminex flow analyzer. Data was analyzed using Quicktype LifeMatch 2.5 (Tepnel Lifecodes) software, to obtain the values of beads mean fluorescent intensity (MFI). To determine positivity, the average of three negative controls was subtracted from MFI obtained from test serum. A value of MFI greater than 1000 was considered positive for class I and greater than 700 for class II.

### **DONOR HLA TYPING**

Samples from deceased donors were previously typed before the selection of recipients for the loci HLA-A, B, DR $\beta$ 1 and DQ $\beta$ 1 by PCR-SSP (Sequence Specific Primers) using an in house kit developed in our laboratory (13).

### **DATA ANALYSIS**

Statistical analyses were performed by Chi-square test, Mann-Whitney and Fisher's exact test. The data were analyzed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS version 20.0).

The level of significance established was  $p < 0.05$ . To analyze agreement between SA and xmDSA, the Pabak WinPepi software was used for adjustment of kappa value (14).

## **ETHICAL ASPECTS**

This study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clinicas de Porto Alegre (Project No. 110026) and all patients signed an Informed Consent Form to participate.

## **RESULTS**

We analyzed 122 patients in the 6<sup>th</sup> month post-transplant with a mean age of 48.39 years, most of them males (54.9%) and Caucasians (84.4%). Blood group A (50%) was the most prevalent as shown in Table 1. The average time on the waiting list was 18 months. Most patients (65.6%) were sensitized against HLA antigens (PRA +) before the transplant. Some patients had previous sensitization events such as transfusions (55.74%), prior transplants (13.11%) or pregnancy in women (87.3%).

Deceased donors had an average age of 44.81 years, most coming from the state of Rio Grande do Sul in South Brazil (82%), males (57.4%) and with prevalence of blood group A (47.5%).

The SA analysis demonstrated a prevalence of anti-HLA antibodies in the 6<sup>th</sup> month post-transplantation in 90 patients (73.8%), being 32 patients (26.2%) donor specific - DSA (Figure 1). The incidence anti-HLA antibodies was 26.2%, being 15.57% DSA (Figure 2). There was a higher frequency of DSA against HLA DR antigens (Figure 3).

In the 32 patients with DSA detected by SA, 17 (13.9%) had DSA anti-HLA class I and 22 (19.6%) DSA anti-HLA class II, while xmDSA detected DSA in 27 (22.1%) patients, 18 (14.8%) DSA anti class I and 18 (14.8%) DSA anti class II. The agreement between the two methodologies were for class I ( $\kappa = 0.66$ ) and for class II ( $\kappa = 0.54$ ) (Table 2).

Considering SA the gold standard methodology, xmDSA showed sensitivity/ specificity of 41.2%/89.5% for class I and 31.8%/87.8% for class II.

Comparing the results of both techniques with pre-transplant results from CDC with B lymphocytes, FCXM to T and B lymphocytes, the xmDSA class II proved to be significant related to FCXM-B, while SA showed no significant results (Table 3).

Among predictors of DSA production, the most significant was prior transplant ( $p = 0.001$ ) (Table 4).

## **DISCUSSION**

The studied population represent a sample of patients on the waiting list for kidney transplantation in Brazil, since the features are similar to the senses of the Brazilian Society of Nephrology, in relation to gender and age.

The predictor variables of DSA production were prior transplant, transfusions and pregnancies, as described in the literature. The variable number of ABDR mismatches was not significant. Since when it was included, HLA DQ (ABDRDQ) was significant, showing the importance of a better HLA typing of the donor for the accurate assessment of DSA presence. Nowadays, the deceased donor HLA typing is performed only for HLA-A, B and DR in most histocompatibility centers in Brazil.

The prevalence of anti-HLA antibodies post-transplantation detected by SA was 73.8% including 24.6% DSA, showing similar findings to other studies (15,16). The incidence of DSA was 15.57%, being more prevalent against HLA-DR (16). Although many patients develop antibodies against HLA-C and HLA-DP antigens, these were not included in the study, due to the absence of donor typing for these loci (16). A study including a complete donor HLA typing would possibly show an increased incidence of DSA.

This study demonstrated a moderate agreement for Class II ( $\kappa > 0.4$ ) and a substantial agreement for class I ( $\kappa > 0.6$ ), comparing SA and xmDSA technical for DSA detection. The lower concordance in class II can be explained by the different approach of the two assays. While SA detects antibodies against HLA-DR, DQ and DP, xmDSA detects only HLA-DR (9,10,11,17).

Some advantages of both tests are: detection of only IgG DSA, ignoring irrelevant antibodies to transplantation; characterization of class I and II antibodies and no need of viable cells (10).

Although there is an agreement between the techniques, the sensitivity is different. In general, the SA sensitivity is greater than the xmDSA for both classes I and II. The microsphere antigens concentration can vary due to binding differences of HLA antigens to bead surface. SA has microspheres with only one HLA antigen, so there may be a higher concentration of antigens on the surface of the microsphere. In the xmDSA, various HLA molecules bind to a microsphere and the concentration depends on the efficient capture of the donor HLA molecule.

The SA high sensitivity and specificity for detecting DSA allows the performance of a virtual crossmatch, comparing the specificity of receptor antibodies with the donor HLA typing, although many studies have shown that the virtual crossmatch is limited in predicting the crossmatch outcome, because SA is not specific to the donor (16).

In this context, we suggest that when the DSA presence is positive by SA and negative by xmDSA, it can be said that receptor antibodies may not have the same antigen specificity of the donor. In contrast, when the presence of DSA is negative by SA and positive by xmDSA it is probably because the donor antigen specificity is not present in the SA panel.

When compared with CDC crossmatch and FCXM, the Luminex assays show greater sensitivity and specificity in DSA detection (9). The xmDSA class II results were significant when compared to FCXM-B and showed a higher correlation with CDC and FCXM than with SA results. This may be due to the fact that these techniques use the donor HLA molecules. SA uses not the own donor molecule, but purified HLA antigens bound to the microspheres that may distort the molecule conformation during the binding (9).

The xmDSA demonstrates evident advantages over conventional crossmatches (CDC and FCXM), since the lysate can be stored for a long time and is very useful in monitoring patients post-transplantation. In addition, xmDSA can detect rare HLA antigens since it is specific against donor antigens. This is very important when a rare donor HLA antigen is not included in the SA microspheres panel (9).

In conclusion, this study demonstrated that the Luminex solid phase assay has high sensitivity and specificity for DSA detection, and can probably be predictive factors for rejection.

The SA showed greater sensitivity while xmDSA is specific against donor HLA molecule, which suggested these two methods may be complementary.

The Luminex methodology enables quantification of antibodies (MFI), allowing patients' stratification by immunological risk groups (3).

Other studies are necessary because the clinical relevance of antibodies detected by Luminex is not clear yet (9,11).

## REFERENCES

1. MOURA, L.R.R *et al.* Diagnóstico e tratamento da rejeição aguda mediada por anticorpo no transplante kidney: papel do C4d e da pesquisa de anticorpo específico contra o doador. *Einstein*, v. 7, p. 427-435, 2009.
2. CARO-OLEAS, J.L. *et al.* Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*, v. 27, p. 1231-1238, 2012.
3. GIBNEY, E.M. *et al.* Detection of donor-specific antibodies using HLA-coated microspheres: another tool for kidney transplant risk stratification. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 21, p. 2525-2629, 2006.
4. PICASCIA, A.; INFANTE, T.; NAPOLI, C. Luminex and antibody detection in kidney transplantation. *Clinical Exp. Nephrology*, v. 16, P. 373-381, 2012.
5. TAIT, B.D. *et al.* Consensus Guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation*, v.95, p.19-47, 2013.
6. EL-AWAR, N.; LEE,J. ; TERASAKI, P.I. HLA Antibody Identification With Single Antigen Beads Compared To Conventional Methods. *Human Immunology*, v. 66, p. 989-997, 2005.
7. TAIT, B.D. *et al.* Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. *Nephrology*, v.14, p. 247-254, 2009.
8. TAIT, B. Solid phase assays for HLA antibody detection in clinical transplantation. *Current Opinion in Immunology*, v. 21, p. 573-577, 2009.

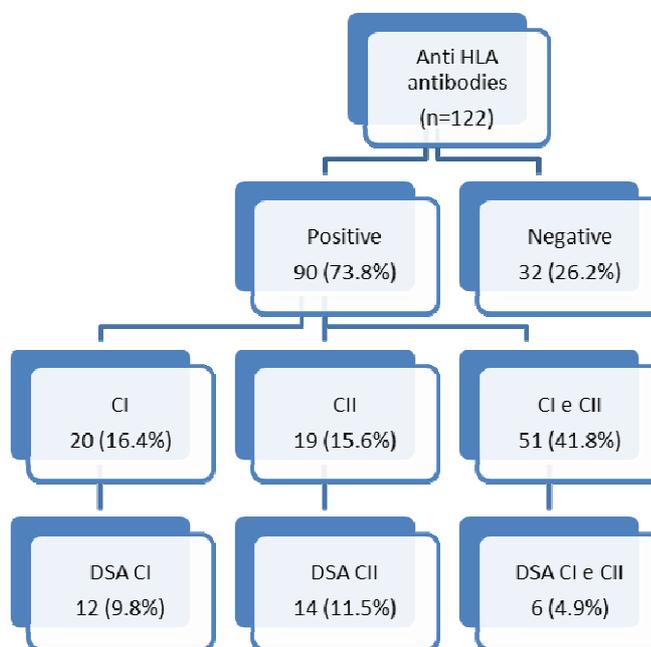
9. ENG, H.S. *et al.* Clinical significance of anti-HLA antibodies detected by Luminex: Enhancing the interpretation of CDC-BXM and important post-transplantation monitoring tools. *Human Immunology*, v. 70, p. 595-599, 2009.
10. BILLEN, E.V.A. *et al.* Luminex donor-specific crossmatches. *Tissue Antigens*, v. 71, p. 507-513, 2008.
11. CARO-OLEAS, J.L. *et al.* Donor-specific antibody detection: comparison of single antigen assay and Luminex crossmatches. *Tissue Antigens*, v.76, p. 398-403, 2010
12. EVERLY, M.J. *et al.* Reducing De Novo Donor-Specific Antibody Levels during Acute Rejection Diminishes Kidney Allograft Loss. *American Journal of Transplantation*, v. 9, p. 1063-1071, 2009.
13. BUNCE, M. *et al.* Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens*, v. 46, p. 355-367, 1995.
14. ABRAMSON, JH. WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiologic Perspectives & Innovations*, v.1, p. 1-10, 2004.
15. COOPER, J.E. *et al.* Inferior kidney allograft outcomes in patients with de novo donor-specific antibodies are due to acute rejection episodes. *Transplantation*, v. 20, P.1-7, 2011.
16. HWANG, H.S. *et al.* Antibody monitoring system to support the single-antigen Luminex assay in donor-specific antibody detection. *Human Immunology*, v. 73, p. 370-375, 2012.
17. BILLEN, E.V.A.; CHRISTIAANS, M.H.L.; BERG-LOONEN, E.M. Clinical relevance of Luminex donor-specific crossmatches; data from 165 kidney transplants. *Tissue Antigens*, v.74, p. 205-212, 2009.

**Table 1.** Recipients characteristics (pretransplant)

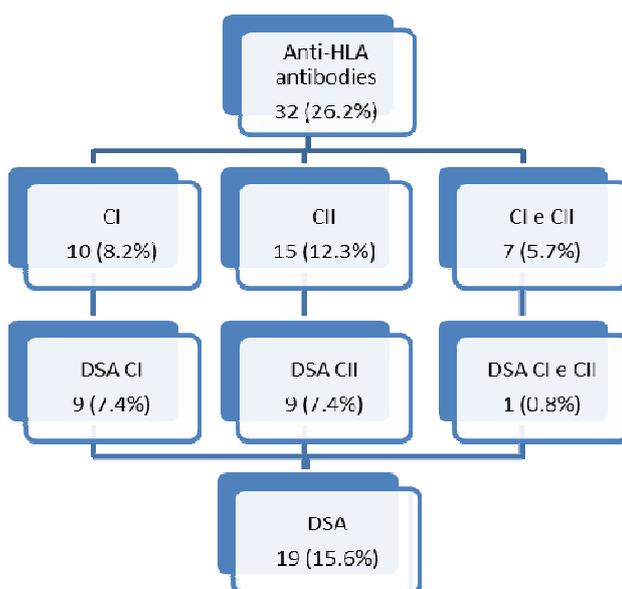
	(n=122)
<b>Age*</b>	48.39 ±11.44
<b>Gender**</b>	
Male	67 (54.9)
Female	55 (45.1)
<b>Ethnicity**</b>	
Caucasian	103 (84.4)
Others	19 (15.5)
<b>Blood Group (ABO)**</b>	
A	61 (50.0)
B	12 (9.8)
AB	2 (1.6)
O	47 (38.5)
<b>Chronic kidney failure diagnostic**</b>	
Undetermined	26 (21.3)
Systemic arterial hypertension	25 (20.5)
Polycystic kidney	21 (17.2)
Diabetes mellitus	19 (15.6)
Glomerulopathy	5 (4.1)
Nephropathies	4 (3.3)
Others <sup>a</sup>	22 (18.0)
<b>Number of Transfusions*</b>	2.09 ±3.25
<b>Number of Pregnancies*</b>	1.22 ±1.83
<b>Prior transplantation*</b>	0.14± 0.37
<b>Number of mismatches*</b>	
A	1.28 ±0.67
B	1.19 ±0.67
DR	0.51 ±0.58
DQ	0.70 ±0.70
ABDR	2.97±1.14
ABDRDQ	3.11 ±1.11
<b>Time on the waiting list(months)***</b>	18 (6-37)
<b>Prior PRA**</b>	
PRA=0	42 (34.4)
PRA≥1	80 (65.6)

\*mean ± standard deviation; \*\* n(%);\*\*\*median (percentis 25-75); <sup>a</sup>=1 nephrotic syndrome, 5 unreported, 16 other causes.

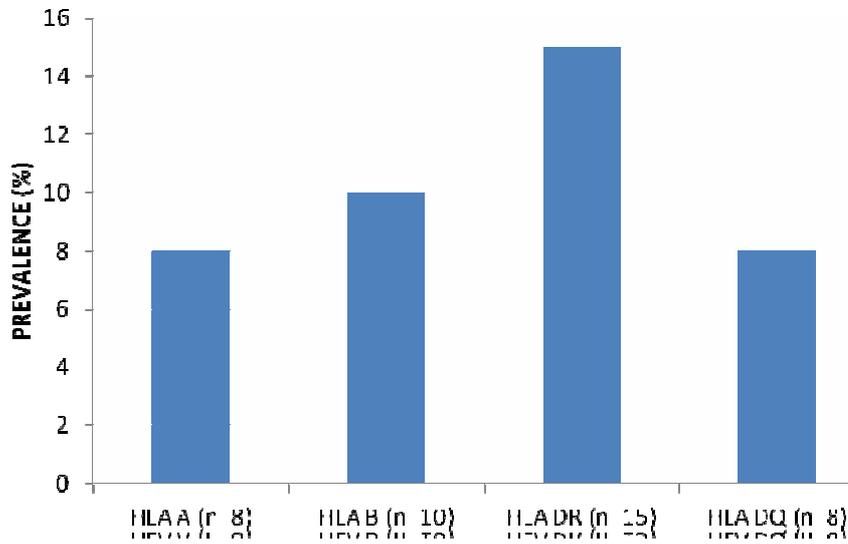
**Figure 1.** Prevalence of anti-HLA antibodies and DSA in the 6<sup>th</sup> month post-transplant (*Single Antigen*)



**Figure 2.** Incidence of anti-HLA antibodies and DSA in the 6<sup>th</sup> month post-transplant (*Single Antigen*)



**Figure 3.** DSA frequency (*Single Antigen*)



**Table 2.** Agreement between Single Antigen and xmDSA in DSA detection

	Test		Kappa*	p**
	Single Antigen	xmDSA		
	n	(%)	n	(%)
DSA Classe I +	17	(13,9)	18	(14,8)
DSA Classe II +	22	(19,6)	18	(14,8)

\*Pabak=ajusted kappa; \*\*chi-square test

**Table 3.** Comparision of FCXM-T, FCXM-B and CDC-B with Single Antigen and xmDSA

		p*
FCXM - T	SA CI	1.00
	XmDSA CI	0.64
FCXM - B	SA CII	0.10
	XmDSA CII	0.04
CDC - B	SA CII	1.00
	XmDSA CII	0.56

\*Fisher's test; FCXM=flow citometry crossmatch; CDC=Complement-dependent cytotoxicity.

**Table 4.** Analysis of predictors of DSA production

<b>Variables</b>	<b>p*</b>
Number of transfusions	0.003
Number of pregnancies	0.020
Number of prior transplant	0.001
Number of ABDR mismatches	0.064
Number of ABDRDQ mismatches	0.034

\*Mann-Whitney test

## 6 ARTIGO ORIGINAL (PORTUGUÊS)

### ANÁLISE COMPARATIVA DE DOIS MÉTODOS DE PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-HLA DOADOR ESPECÍFICO APÓS TRANSPLANTE RENAL

Beatriz Chamun Gil<sup>1,3</sup>, Adriane Stefani Silva Kulzer<sup>1</sup>, Realdete Toresan<sup>1</sup>, Alessandra da Rosa Vicari<sup>2</sup>, Iara dos Santos Fagundes<sup>1</sup>, Joice Merzoni<sup>1,3</sup>, Gisele Menezes Ewald<sup>1</sup>, Mariana de Sampaio Leite Jobim<sup>1</sup>, Roberto Ceratti Manfro<sup>2,4</sup>, Luiz Fernando Jobim<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Serviço de Imunologia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

<sup>2</sup>Serviço de Nefrologia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

<sup>3</sup>Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas - UFRGS

<sup>4</sup>Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas - UFRGS

#### ABSTRACT

Anticorpos pré-formados contra antígenos leucocitários humanos (HLA) podem estar presentes no sangue de pacientes candidatos ao transplante renal. A produção desses anticorpos pode ocorrer em períodos do pós-transplante, podendo ser específicos contra o doador (DSA). Os ensaios baseados na metodologia Luminex são os mais populares na detecção de anticorpos anti-HLA devido à alta sensibilidade e especificidade, como o Labscreen Single Antigen (SA - One Lambda<sup>®</sup>, Canoga Park, CA) e o Donor Specific Antibody (xmDSA) (DSA – Tepnel Lifecodes, Stamford, CT). Este estudo transversal foi realizado com o objetivo de detectar DSA no sexto mês pós-transplante, comparando as metodologias SA e xmDSA. Foram incluídos soros de 122 pacientes submetidos ao transplante renal com doador falecido no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O SA detectou a presença de DSA contra antígenos HLA de classe I em 17 pacientes

(13,9%) e contra os de classe II em 22 pacientes (19,6%), enquanto o xmDSA detectou DSA em 18 pacientes (14,8%) tanto contra os antígenos de classe I como contra os de classe II. DSA foi detectado em 15 pacientes (12,3%) por ambos os métodos. Houve concordância entre os testes para classe I ( $\kappa=0,66$ ,  $p=0,001$ ) e classe II ( $\kappa=0,54$ ,  $p=0,025$ ). A incidência de DSA pelo SA foi de 15,57%, com maior prevalência de DSA contra antígenos HLA-DR. A presença de DSAs detectados por essas técnicas fornecem importantes informações e podem auxiliar no monitoramento pós-transplante e na estratégia de imunossupressão.

**Palavras-chave:** Anticorpos anti-HLA. DSA. Single Antigen. xmDSA. Transplante renal.

## INTRODUÇÃO

A sensibilização aos antígenos HLA pode ocorrer através de transfusões sanguíneas, gestações ou transplantes prévios. Por este motivo, a condição imunológica dos candidatos ao transplante renal deve ser avaliada periodicamente, com a finalidade de monitorar a produção e a titulação desses anticorpos.

A produção de anticorpos contra antígenos HLA pode ocorrer previamente ou após o transplante renal, desencadeando, muitas vezes, anticorpos específicos contra o doador (DSA - *Donor Specific Antibody*)(1,2).

Houve um grande avanço científico na detecção de anticorpos anti-HLA desde que Patel e Terasaki relataram, em 1969, a relevância da prova cruzada prévia para o resultado do transplante renal (2-4). A adição da anti-globulina humana (AGH) melhorou a sensibilidade da

prova cruzada por citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Posteriormente, a prova cruzada por citometria de fluxo (FCXM) acrescentou sensibilidade na pesquisa de anticorpos anti-doador. Recentemente, ensaios de fase sólida foram introduzidos na detecção de anticorpos anti-HLA, como a metodologia Luminex, que utiliza microesferas sintéticas recobertas com moléculas HLA (*Labscreen*<sup>®</sup> – One Lambda<sup>®</sup>, Canoga Park, CA) ou com anticorpos anti-HLA (DSA – Tepnel Lifecodes, Stamford, CT) (3,5-8).

Os ensaios baseados na metodologia Luminex apresentam alta sensibilidade e especificidade (1,3,7,9-11). Existem diferentes tipos de testes que utilizam essa metodologia. Na pesquisa de anticorpos contra antígenos HLA podemos usar os métodos *Labscreen Mixed* e *Labscreen PRA* onde as microesferas são revestidas com diferentes moléculas HLA ou *Labscreen Single Antigen (SA)* onde cada microesfera é revestida com apenas uma especificidade HLA, permitindo uma definição precisa dos anticorpos anti-HLA e do título em que eles são encontrados no soro de um receptor, possibilitando inclusive uma prova cruzada virtual, prevendo reações contra os antígenos HLA do doador (9,11). Já a prova cruzada feita no Luminex (xmDSA) permite uma prova cruzada real, utilizando a molécula HLA do próprio doador (ligada à microesferas recobertas com anticorpos anti-HLA de classe I e II) que se ligará aos anticorpos presentes no soro do receptor (11).

Essas novas técnicas para detecção de DSA fornecem importantes informações imunológicas, havendo, entretanto, a necessidade de mais estudos para estabelecer a melhor conduta e valorização clínica de seus resultados (1,3,5,10,12).

Sendo assim, este estudo foi realizado com o objetivo de detectar DSA no pós-transplante, comparando as metodologias SA e xmDSA.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foi realizado um estudo transversal, incluindo 122 pacientes submetidos a transplante renal com doador falecido no período de março de 2011 a fevereiro de 2013 no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A coleta de soro foi realizada no sexto mês após o transplante e os soros foram testados para a presença de DSA pelas técnicas *Labscreen Single Antigen* (Labscreen® – One Lambda®, Canoga Park, CA) e *Donor Specific Antibody (xmDSA)* (DSA – Tepnel Lifecodes, Stamford, CT). Todos os pacientes foram transplantados com prova cruzada (CDC) negativa para linfócitos T. Os receptores foram previamente tipados para o HLA pelo método PCR-SSO (*Sequence Specific Oligonucleotide*) kit *Labtype* (One Lambda).

As características pré-transplante dos receptores estão descritas na Tabela 1.

## **SINGLE ANTIGEN**

Todos os soros foram testados com o *Single Antigen* (SA) para detecção de anticorpos IgG anti-HLA de classe I (LSA1 – A, B e C) e classe II (LSA2 – DR, DQ e DP) de acordo com as instruções do fabricante (One Lambda). O SA possui um conjunto de microesferas multicoloridas, cada uma revestida com uma única molécula HLA purificada, com as quais o soro do receptor foi inicialmente incubado por 30 min. Após uma série de lavagens para remover os anticorpos que não se ligaram às microesferas, foi adicionada IgG de cabra anti-humana conjugada com ficoeritrina (PE) como anticorpo secundário e novamente incubado por 30 min. Após outra série de lavagens, as amostras foram transferidas para uma placa de leitura para a aquisição dos dados no analisador de fluxo Luminex. Os dados brutos foram coletados pelo Luminex e exportados para o software de análise HLA *Fusion 2.0* (One Lambda). O

resultado foi positivo para a presença de anticorpos quando a média da intensidade de fluorescência (MFI) da reação foi maior do que 500.

## **XMDSA**

A prova cruzada feita no Luminex (xmDSA) foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante (*Donor Specific Antibody* – Tepnel Lifecodes, Stamford, CT).

Primeiro, as células do doador foram isoladas do sangue periférico, do baço, dos linfonodos ou de outros tecidos e dissolvidas com um detergente não-iônico (tampão de lise de linfócitos) que lisa as células e permite que o HLA fique solúvel. Esta solução chamada “lisado” foi congelada e pode ser mantida assim por anos. O teste foi realizado em uma placa-filtro (Millipore, Bedford, MA). O “lisado” foi incubado por 30 min com a mistura de microesferas conjugadas com anticorpos monoclonais específicos para uma região constante das moléculas HLA de classe I ou de classe II que capturam o HLA solubilizado. Foi realizada uma série de lavagens à vácuo. Então, o soro do receptor foi diluído (1:4), adicionado na placa e incubado por 30 min. Após outra série de lavagens, foi adicionada IgG de cabra anti-humana conjugada com ficoeritrina (PE) como anticorpo secundário e realizada nova incubação por 30 min. Então foi adicionado tampão de lavagem e realizada a aquisição dos dados no analisador de fluxo Luminex. Os dados foram coletados e a análise foi realizada no software *Quicktype for LifeMatch* 2.5 (Tepnel Lifecodes) para obter os valores de fluorescência das microesferas (MFI). Para definir positividade, a média dos três controles negativos foram subtraídos do MFI obtido

do soro teste. Um valor de MFI maior que 1000 foi considerado positivo para classe I e maior que 700 positivo para classe II.

### **TIPAGEM HLA DO DOADOR**

As amostras dos doadores falecidos foram previamente tipadas, antes da seleção dos receptores, para os locos HLA-A, B, DR $\beta$ 1 e DQ $\beta$ 1 através da metodologia PCR-SSP (*Sequence Specific Primers*) utilizando um kit *in house* desenvolvido em nosso laboratório (Bunce, 1995)(13).

### **ANÁLISE DOS DADOS**

As análises estatísticas foram realizadas pelos testes Qui-quadrado, Mann-Whitney e teste exato de Fisher. Os dados foram analisados através do programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS versão 20.0). O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ . Para análise de concordância entre SA e xmDSA foi utilizado Kappa com correção Pabak no programa WinPepi (Abramson, 2004) (14).

### **ASPÉCTOS ÉTICOS**

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (projeto nº 110026) e todos os pacientes assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para participar do estudo.

## RESULTADOS

Foram analisados 122 pacientes no 6º mês pós-transplante renal com doador falecido com média de idade de 48,39 anos, a maioria do sexo masculino (54,9%) e caucasóides (84,4%). O grupo sanguíneo A foi o mais prevalente (50%). O tempo médio em lista de espera foi de 18 meses. A maioria dos pacientes (65,6%) era sensibilizada contra antígenos HLA (PRA+) antes do transplante. Alguns pacientes tinham eventos de sensibilizações prévias como transfusões (55,74%), transplantes prévios (13,11%) e gestações (87,3%) (Tabela 1).

Os doadores falecidos tinham idade média de 44,81 anos, eram na maioria procedente do estado do Rio Grande do Sul no sul do Brasil (82%), do sexo masculino (57,4%) e com maior prevalência do grupo sanguíneo A (47,5%).

A análise do SA demonstrou uma prevalência de anticorpos anti-HLA no 6º mês pós-transplante de 90 pacientes (73,8%), sendo 32 (26,2%) contra o doador - DSA (Figura 1). A incidência de anticorpos anti-HLA foi de 26,2%, sendo 15,57% DSA (Figura 2). Houve maior frequência de DSA contra antígenos HLA- DR (Figura 3).

Nos 32 pacientes com DSA positivo pelo SA, 17 (13,9%) tinham DSA anti-HLA de classe I e 22 (19,6%) DSA anti-HLA de classe II, enquanto xmDSA detectou DSA em 27 (22,1%) pacientes sendo 18 (14,8%) DSA anti classe I e 18 (14,8%) DSA anti classe II. Houve concordância entre as duas metodologias para classe I ( $\kappa=0,66$ ) e classe II ( $\kappa=0,54$ ) (Tabela 2).

Considerando o SA como padrão ouro, a metodologia xmDSA mostrou sensibilidade/especificidade de 41,2% e 89,5% para classe I e 31,8% e 87,8% para classe II, respectivamente.

Comparando os resultados de ambas as técnicas com os resultados pré-transplante de CDC com linfócitos B, FCXM para linfócitos T e B, o método xmDSA classe II demonstrou ter significativa correlação com a FCXM-B, enquanto o SA não mostrou significância (Tabela 3).

Entre as variáveis preditoras da produção de DSA, a mais significativa foi transplantes prévios ( $p=0,001$ ) (Tabela 4).

## **DISCUSSÃO**

Os pacientes analisados representam uma amostra dos pacientes em lista de espera para transplante renal no Brasil, com características semelhantes ao senso da Sociedade Brasileira de Nefrologia como sexo e idade.

As variáveis preditoras da produção de DSA significativas foram transplantes prévios, transfusões e gestações, de acordo com a literatura. O número de incompatibilidades ABDR não foi significativo, porém quando foi incluído o HLA-DQ (ABDRDQ) houve significância, mostrando a importância de uma melhor tipagem HLA do doador para a avaliação precisa da presença de DSA. A tipagem HLA do doador falecido é realizada somente para os locos HLA-A, B e DR na maioria dos centros do Brasil.

A prevalência de anticorpos anti-HLA pós-transplante detectados pelo SA foi de 73,8%, sendo 26,2% DSA+, mostrando achados semelhantes a outros estudos (15,16). Já a incidência de DSA foi de 15,57%, sendo mais frequentes os anticorpos contra os antígenos HLA-DR (16). Apesar de muitos pacientes desenvolverem anticorpos contra os antígenos HLA-C e HLA-DP, estes não foram incluídos no estudo devido à falta da tipagem do doador para esses locos (16).

Um estudo que inclua a tipagem HLA do doador completa talvez mostre uma maior incidência de DSA.

Esse estudo demonstrou uma concordância entre as técnicas SA e xmDSA na detecção de DSA, sendo moderada para classe II ( $\kappa > 0,4$ ) e substancial para classe I ( $\kappa > 0,6$ ). A menor concordância em classe II pode ser explicada pela diferença entre as duas técnicas. Enquanto SA detecta anticorpos anti-HLA-DR, DQ e DP o xmDSA detecta apenas HLA-DR (9,10,11,17).

Algumas vantagens de ambos os ensaios são: a detecção de DSA apenas para a classe IgG, desconsiderando outras imunoglobulinas irrelevantes para o transplante; a caracterização de anticorpos anti-HLA de classe I e II, assim como não ser necessária a viabilidade celular (10).

Apesar de haver concordância entre as técnicas, existe diferença de sensibilidade. Em geral, a sensibilidade do SA é maior que do xmDSA para as classes I e II. A concentração de antígenos HLA nas microesferas apresenta provavelmente diferenças relacionadas à base de ligação das moléculas HLA em sua superfície. No SA em cada microesfera há apenas um antígeno HLA, podendo haver grande concentração de antígenos na superfície da microesfera. Já no xmDSA, várias moléculas HLA do doador ligam-se a uma microesfera e a concentração depende da eficácia da sua captura.

A alta sensibilidade e especificidade do SA para detectar DSA permite a realização de uma prova cruzada virtual, comparando a especificidade dos anticorpos do receptor com a tipagem HLA do doador, embora muitos estudos demonstrem que a prova cruzada virtual é limitada para prever o resultado da prova cruzada, porque o SA não é específico para o doador (16).

Neste contexto, observa-se que quando a presença de DSA é positiva pela metodologia SA e negativa pelo xmDSA pode-se dizer que os anticorpos do receptor talvez não tenham a mesma especificidade dos antígenos do doador em alta resolução. Ao contrário disso, quando a presença de DSA é negativa pela metodologia SA e positiva pelo xmDSA pode-se dizer que a especificidade do antígeno do doador pode não estar contemplada no painel de microesferas do SA.

Quando comparados com a prova cruzada por CDC e FCXM, os ensaios pelo Luminex mostram maior sensibilidade e especificidade na detecção de DSA (9). Os resultados do xmDSA classe II foram significantes quando comparados com FCXM-B e demonstraram maior correlação com CDC e FCXM do que SA. Isso pode ocorrer devido ao fato de que essas técnicas usam as moléculas HLA próprias do doador. Já o SA não utiliza a própria molécula do doador, mas antígenos HLA purificados ligados às microesferas podendo distorcer a conformação das moléculas durante o processo de ligação (9).

O xmDSA demonstra vantagens em relação às provas cruzadas convencionais (CDC e FCXM) visto que o lisado pode ser estocado por longo tempo, sendo muito útil no monitoramento pós transplante. Além disso, o xmDSA pode detectar anticorpos contra HLA raros por ser específico contra os antígenos do órgão do doador, inclusive que podem não estar incluídos no painel de microesferas do SA (9).

Em conclusão, esse estudo demonstrou que os ensaios de fase sólida no Luminex têm alta sensibilidade e especificidade na detecção de DSA sendo um fator preditivo para a rejeição. O SA demonstrou maior sensibilidade enquanto o xmDSA é específico contra a molécula HLA do doador, permitindo sugerir que os dois métodos possam ser complementares.

A metodologia Luminex possibilita a quantificação dos anticorpos (MFI), permitindo uma estratificação dos pacientes por grupos de risco (sensibilização) (3).

Outros estudos são necessários, pois a relevância clínica dos anticorpos detectados pelo Luminex ainda não está totalmente esclarecida (9,11).

## REFERÊNCIAS

1. MOURA, L.R.R *et al.* Diagnóstico e tratamento da rejeição aguda mediada por anticorpo no transplante renal: papel do C4d e da pesquisa de anticorpo específico contra o doador. *Einstein*, v. 7, p. 427-435, 2009.
2. CARO-OLEAS, J.L. *et al.* Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*, v. 27, p. 1231-1238, 2012.
3. GIBNEY, E.M. *et al.* Detection of donor-specific antibodies using HLA-coated microspheres: another tool for kidney transplant risk stratification. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 21, p. 2525-2629, 2006.
4. PICASCIA, A.; INFANTE, T.; NAPOLI, C. Luminex and antibody detection in kidney transplantation. *Clinical Exp. Nephrology*, v. 16, P. 373-381, 2012.
5. TAIT, B.D. *et al.* Consensus Guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation*, v.95, p.19-47, 2013.
6. EL-AWAR, N.; LEE, J. ; TERASAKI, P.I. HLA Antibody Identification With Single Antigen Beads Compared To Conventional Methods. *Human Immunology*, v. 66, p. 989-997, 2005.
7. TAIT, B.D. *et al.* Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. *Nephrology*, v.14, p. 247-254, 2009.
8. TAIT, B. Solid phase assays for HLA antibody detection in clinical transplantation. *Current Opinion in Immunology*, v. 21, p. 573-577, 2009.
9. ENG, H.S. *et al.* Clinical significance of anti-HLA antibodies detected by Luminex: Enhancing the interpretation of CDC-BXM and important post-transplantation monitoring tools. *Human Immunology*, v. 70, p. 595-599, 2009.

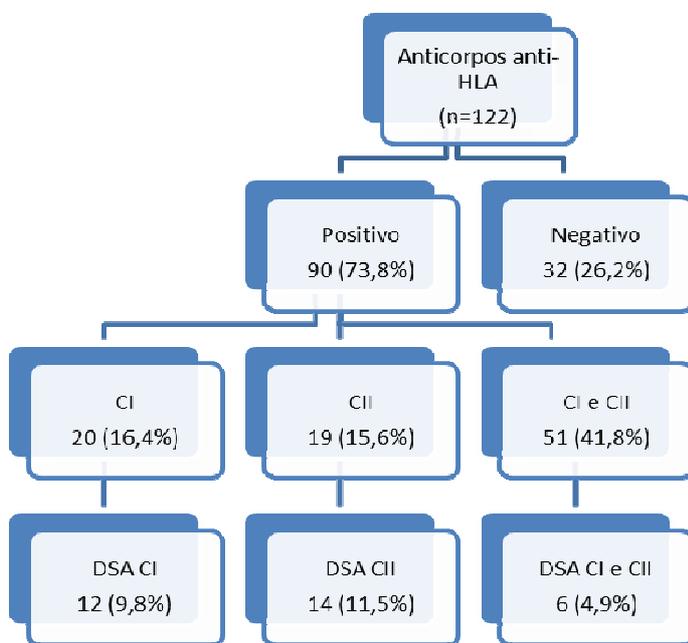
10. BILLEN, E.V.A. *et al.* Luminex donor-specific crossmatches. *Tissue Antigens*, v. 71, p. 507-513, 2008.
11. CARO-OLEAS, J.L. *et al.* Donor-specific antibody detection: comparison of single antigen assay and Luminex crossmatches. *Tissue Antigens*, v.76, p. 398-403, 2010
12. EVERLY, M.J. *et al.* Reducing De Novo Donor-Specific Antibody Levels during Acute Rejection Diminishes Renal Allograft Loss. *American Journal of Transplantation*, v. 9, p. 1063-1071, 2009.
13. BUNCE, M. *et al.* Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens*, v. 46, p. 355-367, 1995.
14. ABRAMSON, JH. WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiologic Perspectives & Innovations*, v.1, p. 1-10, 2004.
15. COOPER, J.E. *et al.* Inferior kidney allograft outcomes in patients with de novo donor-specific antibodies are due to acute rejection episodes. *Transplantation*, v. 20, P.1-7, 2011.
16. HWANG, H.S. *et al.* Antibody monitoring system to support the single-antigen Luminex assay in donor-specific antibody detection. *Human Immunology*, v. 73, p. 370-375, 2012.
17. BILLEN, E.V.A.; CHRISTIAANS, M.H.L.; BERG-LOONEN, E.M. Clinical relevance of Luminex donor-specific crossmatches; data from 165 renal transplants. *Tissue Antigens*, v.74, p. 205-212, 2009.

**Tabela 1.** Características dos receptores (pré-transplante)

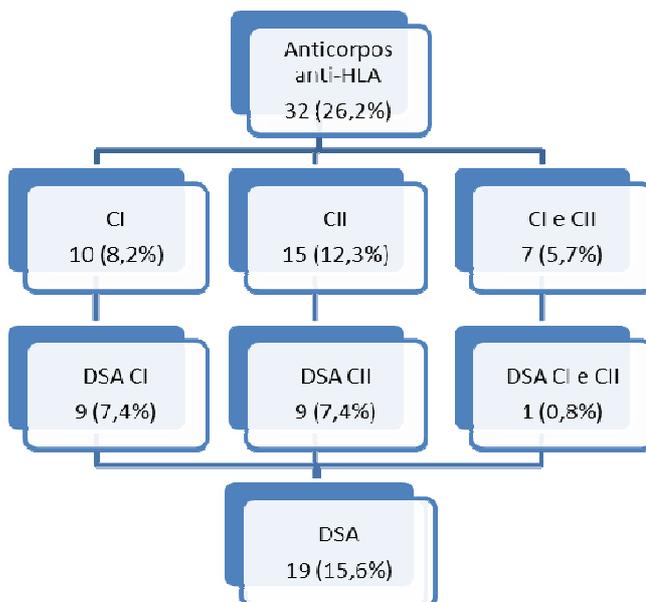
	(n=122)
<b>Idade*</b>	48,39 ±11,44
<b>Sexo**</b>	
Masculino	67 (54,9)
Feminino	55 (45,1)
<b>Etnia**</b>	
Caucasóide	103 (84,4)
Outros	19 (15,5)
<b>Grupo Sanguíneo (ABO)**</b>	
A	61 (50,0)
B	12 (9,8)
AB	2 (1,6)
O	47 (38,5)
<b>Diagnóstico de IRC **</b>	
Causa Indeterminada	26 (21,3)
Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)	25 (20,5)
Rins policísticos	21 (17,2)
Diabetes mellitus	19 (15,6)
Glomerulopatias	5 (4,1)
Nefropatias diversas	4 (3,3)
Outros <sup>a</sup>	22 (18,0)
<b>Nº de Transfusões*</b>	2,09 ±3,25
<b>Nº de Gestações*</b>	1,22 ±1,83
<b>Transplantes prévios*</b>	0,14± 0,37
<b>Nº incompatibilidades*</b>	
A	1,28 ±0,67
B	1,19 ±0,67
DR	0,51 ±0,58
DQ	0,70 ±0,70
ABDR	2,97±1,14
ABDRDQ	3,11 ±1,11
<b>Tempo em lista de espera (em meses)***</b>	18 (6-37)
<b>PRA prévio**</b>	
PRA=0	42 (34,4)
PRA≥1	80 (65,6)

\*média ± desvio padrão; \*\* n(%);\*\*\*mediana (percentis 25-75); IRC= Insuficiência renal crônica; <sup>a</sup>=1 síndrome nefrótica, 5 não informadas, 16 outras causas.

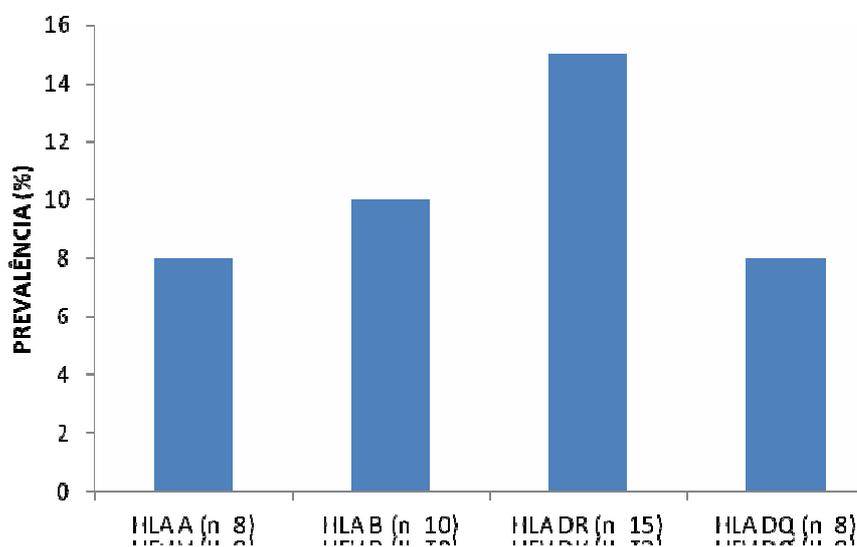
**Figura 1.** Prevalência de anticorpos anti-HLA e DSA no 6° mês pós-transplante (*Single Antigen*)



**Figura 2.** Incidência de anticorpos anti-HLA e DSA no 6° mês pós-transplante (*Single Antigen*)



**Figura 3.** Frequência de DSA positivo (*Single Antigen*)



**Tabela 2.** Concordância entre Single Antigen e xmDSA para detecção de DSA

	Teste				Kappa*	p**
	Single Antigen		xmDSA			
	n	(%)	n	(%)		
DSA Classe I +	17	(13,9)	18	(14,8)	0,66	0,001
DSA Classe II +	22	(19,6)	18	(14,8)	0,54	0,025

\*Pabak=kappa ajustado; \*\*teste qui-quadrado

**Tabela 3.** Comparação da FCXM-T, FCXM-B e CDC-B com Single Antigen e xmDSA

		p*
FCXM - T	SA CI	1,00
	XmDSA CI	0,64
FCXM - B	SA CII	0,10
	XmDSA CII	0,04
CDC - B	SA CII	1,00
	XmDSA CII	0,56

\*Teste exato de Fisher; FCXM=prova cruzada por citometria de fluxo; CDC=Citotoxicidade dependente de complemento.

**Tabela 4.** Análise das variáveis preditoras da produção de DSA

<b>Variáveis</b>	<b>p*</b>
Nº transfusões prévias	0,003
Nº gestações prévias	0,020
Nº transplantes prévios	0,001
Nº incompatibilidades ABDR	0,064
Nº incompatibilidades ABDRDQ	0,034

\*teste Mann-Whitney

## **7 ANEXOS**

ANEXO I- PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS

PROJETO: "PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-HLA DOADOR ESPECÍFICO EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE RENAL"

1.Nome : \_\_\_\_\_ N°: \_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_

2.Idade: \_\_\_\_\_ Data Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

3.Sexo: \_\_\_\_\_ 4.Raça: \_\_\_\_\_

5.Transfusões pré-tx: \_\_\_\_\_ Última (data): \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

6.Gestações pré-tx: \_\_\_\_\_ Última (data): \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

7. ABO: \_\_\_\_\_ Rh: \_\_\_\_\_

8.PRA pré-tx: CI: \_\_\_\_\_ CII: \_\_\_\_\_ MIC-A: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

8.PRA pós-tx: CI: \_\_\_\_\_ CII: \_\_\_\_\_ MIC-A: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

9. Tipagem HLA: A \_\_, \_\_ B \_\_, \_\_ Cw \_\_, \_\_ DR \_\_, \_\_ DQ \_\_, \_\_

10.Doença Renal Primária: \_\_\_\_\_

11. Outras doenças significativas: \_\_\_\_\_

12.Data do Transplante: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

13.Doador

( ) Vivo HLA: A \_\_, \_\_ B \_\_, \_\_ DR \_\_, \_\_ DQ \_\_, \_\_ Parentesco: \_\_\_\_\_

( ) Cadáver HLA: A \_\_, \_\_ B \_\_, \_\_ DR \_\_, \_\_ DQ \_\_, \_\_

14.Transplante(s) Prévio(s) ( ) Sim ( ) Não

15. Protocolo de Imunossupressão Inicial: \_\_\_\_\_

16. Biópsia pós-TX Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Resultado: \_\_\_\_\_

17. DSA: CI: \_\_\_\_\_ CII: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ LISADO N°: \_\_\_\_\_

## ANEXO II- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### II – TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

##### PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-HLA DOADOR ESPECÍFICO EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE RENAL

NOME DO PACIENTE:

Nº:

DATA:

##### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

A rejeição é uma importante causa de perda de órgãos transplantados. Muitos estudos mostram que a presença de anticorpos circulantes específicos contra o doador está associada com rejeição e perda do enxerto. Isso torna esses anticorpos um tópico importante para o estudo da imunologia dos transplantes. A produção de anticorpos anti-HLA (pequenas proteínas de defesa produzidas pelo organismo) pode ocorrer através de transfusões sanguíneas, gestações ou transplantes anteriores.

O objetivo deste estudo é identificar a presença de anticorpos anti-HLA circulantes específicos contra o doador no soro de pacientes submetidos a transplante renal no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

##### DE QUE CONSTA A PESQUISA?

A pesquisa consta da coleta de uma amostra de sangue realizado por punção venosa, como um simples exame de sangue realizado de rotina. As amostras são levadas para o Laboratório de Imunologia no próprio hospital, onde, por técnicas laboratoriais, se chega ao resultado desejado (pesquisa de anticorpos específicos contra o doador).

Comitê de Ética em Pesquisa  
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

14,04/2014

110026 TAV

#### **QUAIS SÃO AS VANTAGENS EM PARTICIPAR DO ESTUDO?**

A participação será muito importante para o conhecimento sobre a rejeição do rim transplantado e para um melhor direcionamento quanto aos tratamentos instituídos.

#### **QUAIS SÃO AS DESVANTAGENS DE PARTICIPAR DO ESTUDO?**

Realizar punção venosa para coleta de sangue, podendo causar dor temporária e hematoma.

#### **DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PACIENTE**

- Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificar os pacientes em hipótese alguma.
- O participante não terá custos relativos à sua participação no estudo.
- A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, cada paciente é livre para decidir de não participar.
- A decisão de não participar não interferirá no acompanhamento normal dos pacientes no Ambulatório, na Emergência nem na Internação do Hospital de Clínicas.
- O paciente é livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa.
- O presente termo é elaborado em duas vias ficando uma via com o pesquisador responsável e outra via com o participante.

Comitê de Ética em Pesquisa  
GPPG/HCPA

**VERSÃO APROVADA**

14 / 04 / 2011

11.0026 TAV

### COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

Eu, \_\_\_\_\_, compreendi as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas. O termo que li, esclarece os riscos e benefícios da pesquisa. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu atendimento e tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo.

Eu CONCORDO em fazer parte do estudo voluntariamente.

Nome legível: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Pesquisadores responsáveis:

Dr. Luiz Fernando Jobim

Beatriz Chamun Gil

Serviço de Imunologia - Telefone / FAX: (51) 3359-8020 ou (51) 9147-9554

Comissão de Ética em Pesquisa

HCPA – sala 2227 (2º andar)

Telefone/FAX: (51) 3359-7640

Comitê de Ética em Pesquisa  
GPPG/HCPA

**VERSÃO APROVADA**

14 / 04 / 2011

110026 TAV

## ANEXO III- CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A Comissão Científica e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 110026      **Versão do Projeto:** 25/02/2011      **Versão do TCLE:** 25/03/2011

**Pesquisadores:**

LUIZ FERNANDO JOB JOBIM  
ROBERTO CERATTI MANFRO  
BEATRIZ CHAMUN GIL

**Título:** PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-HLA DOADOR ESPECÍFICO EM PACIENTES  
SUBMETIDOS A TRANSPLANTE RENAL

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos, bem como o respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais de pesquisa clínica, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

- Os membros da Comissão Científica e do Comitê de Ética em Pesquisa não participaram do processo de avaliação dos projetos nos quais constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.
- Somente poderá ser utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no qual conste o carimbo de aprovação do CEP/HCPA.

Porto Alegre, 14 de abril de 2011.

Profª Nadine Clausell  
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

