

FANY VERÓNICA TICONA PÉREZ

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-HLA CLASSE I E II
EM PACIENTES SUBMETIDOS AO
TRANSPLANTE RENAL**

CAMPINAS

2007

FANY VERÓNICA TICONA PÉREZ

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-HLA CLASSE I E II
EM PACIENTES SUBMETIDOS AO
TRANSPLANTE RENAL**

*Dissertação do Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica
Médica, área de concentração em Ciências Básicas.*

ORIENTADOR: Prof. CÁRMINO ANTÔNIO DE SOUZA

CO-ORIENTADORA: Prof^ª. DRA. SOFIA ROCHA LIEBER

CAMPINAS

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

T437p Pérez Ticoná, Fany Verónica
Pesquisa de anticorpos anti-HLA classe I e II em pacientes submetidos ao transplante renal / Fany Verónica Ticoná Pérez. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientadores : Cármino Antônio de Souza, Sofia Rocha Lieber
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Transplante de Rim. 2. Transplante de órgãos e tecidos, etc.
3. Rejeição de enxerto. 4. Rim. 5. Teste imunoenzimático. 6. ELISA. 7. Antígenos HLA. I. Souza, Cármino Antonio de. II. Lieber, Sofia Rocha. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : “Anti HLA antibodies in renal transplanted patients”

Keywords: • Kidney Transplantation
• Transplant
• Graft Rejection
• Kidney
• Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
• HLA Antigen

Titulação: Mestre em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

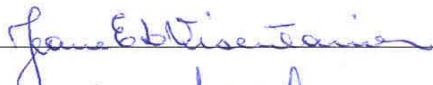
Prof Dr Cármino Antônio de Souza
Profa. Dra. Jeane Eliete Laguila Visentainer
Prof Dr José Francisco Comenalli Marques Junior

Data da defesa: 29 - 08 - 2007

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof Dr. Cármino Antonio de Souza

Membros:

1. Prof(a). Dr(a) .Jeane Eliete Laguila Visentainer 
 2. Prof(a). Dr(a). José Francisco Comenalli Marques Junior 
 3. Prof(a). Dr(a). Cármino Antonio de Souza 
-

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 29/08/2007

DEDICATÓRIA

.....A minha alma, que me permitiu, existir e guiou a minha vida, até leva-la onde hoje me encontro: *Graças a Deus e Jesus Cristo*, pela vida maravilhosa com que me presentearam.

.....A minha mente, aquela que foi chave para a inspiração e força para começar este mestrado, que me animou e me alentou com seu amor.

Graças a meus avós: Lucia e Paulino

.....As minhas pernas, porque me permitiram caminhar dia a dia, me ensinando o caminho que devo seguir, e evitando que eu caia; e se eu caio me ajudam a levantar-me .

Graças a meus pais: Fidelita e Zacarias, exemplo de vida, amor e apoio permanente.

.....Aos meus braços, porque me serviram de apoio todo este tempo, me prestaram sua ajuda em todas as ações da minha vida e tem todo meu amor: *Graças a meu irmão Ramiro*, graças por gostar de mim e estar sempre do meu lado.

.....As minhas mãos, aqueles que dão o toque final das minhas ações, que melhoram tudo o que faço, e corrigem os erros: *Graças a meus colegas do laboratório*.

.....Aos meus olhos, os que me permitiram achar a luz quando tudo parecia escuridão, os que tiraram das penumbras, com só abri-los; e me deram a esperança o que hoje é uma realidade: *Graças a meus queridos amigos*.

.....A meu coração, que com seu bater permanente, me fez conhecer o belo da vida e dentro da vida, esse sentimento maravilhoso que é o amor, um amor que me faz sentir viva.

Adaptado por Perez, 2007

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto minha gratidão e a todas elas e de forma particular:

Ao Prof. Dr. Cármino Antônio de Souza, pela atenção, oportunidade, confiança e apoio na realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Sofia Rocha Lieber, na orientação e planejamento dos experimentos laboratoriais, correção e adequação do manuscrito, indispensável para a realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Marilda Mazzali, pela orientação relativa aos dados clínicos durante o percurso do trabalho.

À Dra. Silvia Barbosa Dutra Marques, pelo apoio desmedido na concessão da utilização do Laboratório de Histocompatibilidade.

Aos funcionários do Laboratório de Histocompatibilidade, Adriana de Souza, Marcia Regina Tabossi, Silvio Quiterio, Edilaine Gildo, Edilaine Corradine pela amizade e colaboração na execução de diversas atividades e apoio técnico na realização dos testes laboratoriais.

Aos funcionários do Laboratório de Nefrologia, Juliana Manfrinato, pela disposição do material biológico e apoio em todas as horas deste trabalho.

Às secretarias Nicete Romano e Cristiane Patrícia de Freitas, pelo imenso carinho e atenção prestada no decorrer do trabalho.

Aos pacientes que aceitaram participar deste estudo.

Este trabalho foi financiado pela:

Coordenação e Apoio ao Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Não procures a verdade fora de ti, ela está em ti, em teu ser.
Não procures o conhecimento fora de ti, ele está em tua fé interior.
Não procures a paz fora de ti, ela está instalada em teu coração.
Não procures a felicidade fora de ti, ela habita em ti desde a eternidade.

(Mestre Khane)

	<i>PÁG.</i>
RESUMO.....	<i>xxxiii</i>
ABSTRACT.....	<i>xxxvii</i>
1- INTRODUÇÃO.....	41
1.1- Histórico.....	43
1.2- Transplante renal.....	48
1.2.1- Tipos de transplante.....	48
1.3- Histocompatibilidade.....	50
1.4- Componentes imunológicos da rejeição.....	53
1.4.1- Mecanismos efetores da resposta imune.....	55
1.4.2- Influência da presença dos anticorpos anti-HLA na sobrevida do enxerto.....	55
1.4.3- Influência dos componentes da imunidade celular na sobrevida do enxerto.....	56
1.5- Rejeição.....	57
1.5.1- Rejeição hiperaguda mediada por anticorpos.....	57
1.5.2- Rejeição aguda.....	58
1.5.3- Rejeição crônica.....	59
1.6- Imunossupressão no transplante renal.....	60
1.6.1- Drogas antiinflamatórias hormonais.....	60
1.6.2- Antimetabólitos.....	61

1.6.3- Ciclosporina e outras drogas.....	61
1.6.4- Agentes biológicos.....	62
1.7- Prova cruzada (Crossmatch).....	63
1.8- Compatibilidade HLA.....	64
1.9- Reatividade contra painel.....	65
1.9.1- Avaliação do grau de sensibilização aos antígenos HLA: Reatividade contra painel.....	65
2- HIPÓTESE.....	67
3- OBJETIVOS.....	71
3.1- Objetivo geral.....	73
3.2- Objetivos específicos.....	73
4- METODOLOGIA.....	75
4.1- Casuística.....	77
4.1.1- Elegibilidade.....	77
4.1.2- Critérios de inclusão.....	77
4.1.3- Critérios de exclusão.....	78
4.1.4- Variáveis.....	78
4.1.5- Pacientes.....	79
4.2- Métodos.....	81
4.2.1- Tipagem dos antígenos de histocompatibilidade.....	81
4.2.2- Prova cruzada pré-transplante.....	81
4.2.3- Obtenção dos soros.....	81

4.3- Pesquisa de anticorpos anti-HLA em amostra de soro de receptores de rim de doador cadáver.....	82
4.3.1- Pesquisa de anticorpos contra os antígenos HLA classes I e II no soro de pacientes submetidos ao transplante de rim cadavérico, avaliados por ensaios imunoenzimáticos.....	82
4.3.1.1- Distribuição dos reagentes na placa Terasaki para o LAT TM10x5 Lambda Antigens Tray Mixed.....	82
4.3.2- Caracterização da especificidade anti-HLA dos anticorpos detectados nas amostras de soro de pacientes submetidos ao transplante de rim cadavérico, e determinação do nível de reatividade contra painel de antígenos (PRA), avaliados por ensaios imunoenzimático.....	86
4.3.2.1- Distribuição dos reagentes na placa Terasaki para o LAT 1240 Lambda Antigens Tray.....	87
4.3.3- Validação dos ensaios imunoenzimáticos.....	89
4.4- Cálculos do ensaio.....	89
4.4.1- Reação positiva-negativa.....	89
4.4.2- Definição do valor de corte (Cut-Off).....	90
4.5- Análise estatística.....	91
5- RESULTADOS.....	93
5.1- Caracterização e seguimento dos pacientes submetidos ao transplante renal.....	95
5.2- Número de antígenos HLA discrepantes entre receptor e doador do enxerto renal.....	97

5.3- Caracterização histológica da biópsia do enxerto renal e classificação do tipo de rejeição, segundo o critério proposto por Banff 97.....	99
5.4- Pesquisa de anticorpos anti-HLA classe I e II no soro de pacientes submetidos ao transplante de rim cadavérico.....	101
6- DISCUSSÃO.....	105
7- CONCLUSÕES.....	111
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
9- ANEXOS.....	131

LISTA DE ABREVIATURAS

ABO	Grupo Sangüíneo
ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
AZA	Azatioprina
AGH	Antiimunoglobulina Humana
APCs	Células Apresentadoras de antígenos
ALG	Globulina Antilinfocitaria
ATG	Globulina Antimonocitaria
β-microglobulina	Beta microglobulina
° C	Graus Celsius
CYA	Ciclosporina A
CTS	<i>Collaborative Transplant Study</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
dL	Decilitros
DTT	Dithiotreitol
D.O.	Densidade Ótica
DST	<i>Donor Specific Transfusion</i>
FK506	Tacrolimus
g	Gramas
GNC	Glomérulo Nefrite Crônica
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HLA	Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano
HLA-A	Antígeno HLA referente aos loci A

HLA-B	Antígeno HLA referente aos <i>locus</i> B
HLA-C	Antígeno HLA referente aos <i>locus</i> C
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano <i>locus</i> DR
HLA-I	Antígeno HLA da classe I
HLA-II	Antígenos HLA da classe II
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IL-2	Interleucina 2
IL-2R	Receptor da Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IFN- γ	Interferon gama
LAT TM	<i>Lambda Antígenos Tray Mixed</i>
LAT 1240	<i>Lambda Antígenos Tray 1240</i>
CPH	Complexo Maior de Histocompatibilidade
NK	Célula Natural Killer
mL	Mililitros
mg	Miligramas
MICA	<i>MHC class I chain-related molecule A</i>
μ L	Microlitros
MMF	Micofenolato de Mofetil
OKT3	Anticorpo Antileucocitário T
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRA	<i>Painel Reactive Anibody</i>

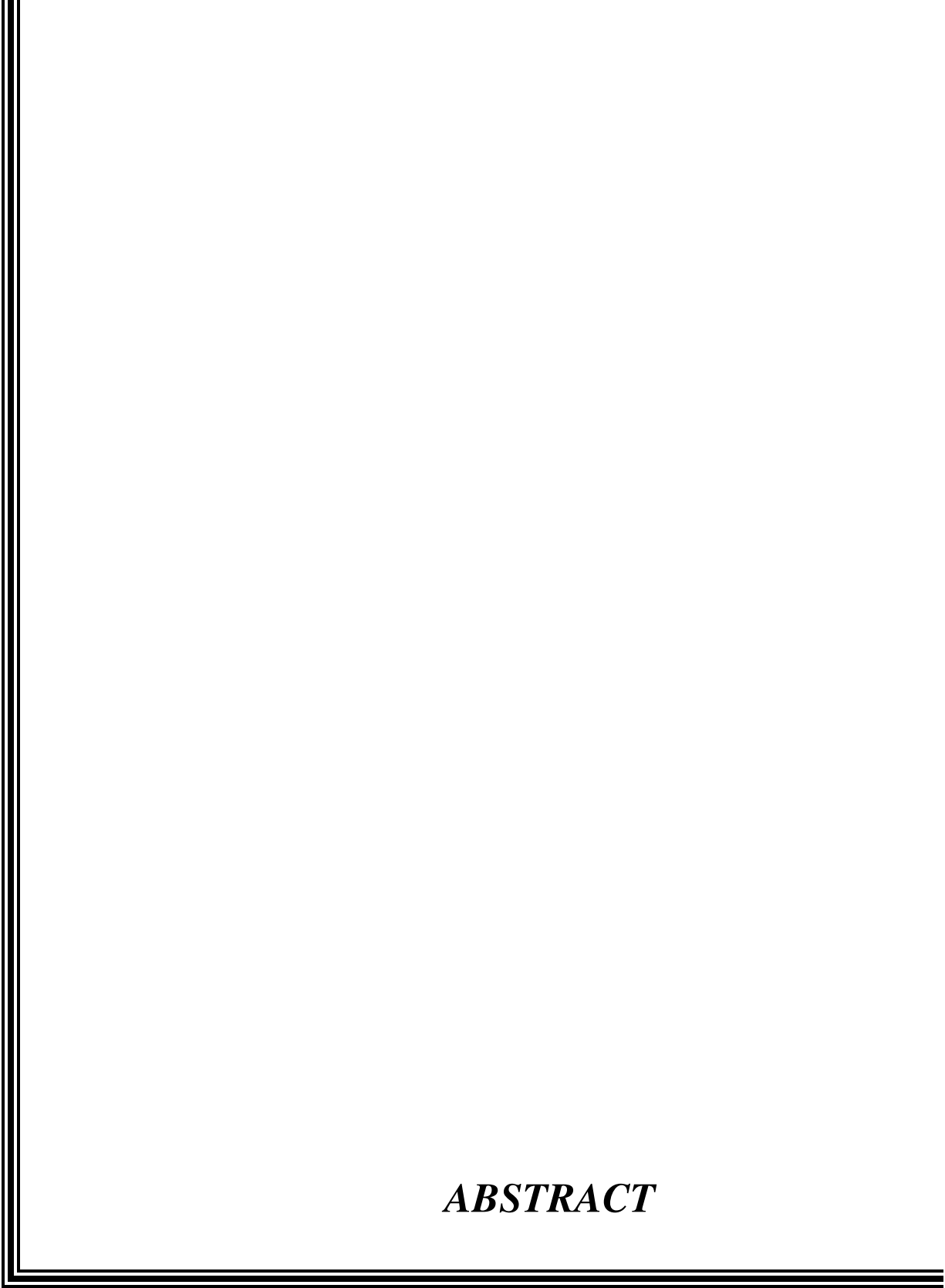
RPM	Rotações por minuto
RCP	Reatividade Contra Pannel de Antígenos HLA
SSP	<i>Sequence Specific Primers</i>
SSO	<i>Sequence Specific Oligonucleotide</i>
Ta	Linfócitos T Auxiliares
Tc	Linfócitos T Citotóxicos
TCR	Receptor de Células T
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TCD4	Linfócitos T portadores de marcador CD4
TCD8	Linfócitos T portadores de marcador CD8
Th1	Linfócitos T auxiliador (helper) tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliador (helper) tipo 2
UCLA	<i>University of Califórnia, Los Angeles</i>

	PÁG.
Tabela 1- Dados demográficos relativos aos pacientes renais crônicos que receberam enxerto de rim cadavérico, subdivididos de acordo com a evolução clínica pós-transplante.....	80
Tabela 2- Densidade óptica (DO) dos reativos para a validação do ensaio.....	89
Tabela 3- Sistema de Pontuação da Reação Positiva e Negativa.....	90
Tabela 4- Caracterização dos sub-grupos de pacientes submetidos ao transplante de rim cadavérico.....	96
Tabela 5- Distribuição dos pacientes nos grupos com (A) e sem (B) complicações clínicas após o transplante renal, de acordo com o nível de incompatibilidade HLA entre receptor e doador.....	98
Tabela 6- Biópsias descritivas dos pacientes do grupo A.....	100
Tabela 7- Nível de sensibilização aos antígenos HLA (% PRA*), nos períodos pré e pós-transplante com rim de doador cadavérico, em pacientes com complicações (grupo A) no período pós-transplante.....	102

	PÁG.
Figura 1- Análise Comparativa de Transplantes realizados no ano de 2004 e 2005.....	50
Figura 2- Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano – HLA (Fonte: Duarte de Sillos & Fagundes U, 2003).....	51
Figura 3- Representação esquemática da definição da especificidade anti-HLA do anticorpo, em duas amostras de soro avaliada na placa LATM 10X5 (One Lambda).....	85
Figura 4- Representação esquemática da definição da especificidade anti-HLA do anticorpo, em duas amostras de soro avaliadas na placa LATTM1240 (One Lambda). Adaptado por Lieber, 2007.....	88
Figura 5- Distribuição dos receptores de enxerto de rim cadavérico com (A) e sem (B) episódios de rejeição, de acordo com o número de transfusões sanguíneas prévias.....	96
Figura 6- Distribuição dos receptores de enxerto de rim cadavérico com (A)e sem (B) episódios de rejeição de acordo com o numero de incompatibilidades no HLA A , B e DRB1.....	99

RESUMO

Este estudo prospectivo avalia os níveis séricos e as especificidades dos anticorpos anti-HLA em receptores de rim de doador cadáver, além de estimar sua influência na etiologia e gravidade das crises de rejeição. Entre os meses de junho de 2004 a agosto de 2006 foram analisados 40 receptores de transplante renal com prova cruzada pré-transplante negativa e acompanhados, clinicamente, no mínimo por 90 dias após o transplante. Os pacientes foram estratificados por sintomatologia clínica de rejeição bem sucedido e mau sucedido, sendo o grupo A composto de 26 casos com rejeição e o grupo B com 14 casos sem complicações. As amostras de soro para a pesquisa de anticorpos anti-HLA, aplicando os testes imunoenzimáticos (One Lambda Inc.), foram obtidas antes e até 60 dias depois do transplante, pois coincide com o aumento dos níveis de creatinina sérica, nos pacientes com má evolução do enxerto. O resultado dos anticorpos anti-HLA antes do transplante foi negativo. Enquanto o número médio de incompatibilidade HLA (mismatched) entre receptor e doador, considerando os loci HLA-A, B e DR, foi 4/6 em ambos os grupos, sendo que no grupo A as mais freqüentes foram 4/6 e 3/6 e do grupo B somente 4/6. Dentre os 26 pacientes do grupo A, 3 (11,5%) desenvolveram anticorpos anti-HLA detectados nos dias 16, 28 e 46 após o transplante. Os anticorpos desenvolvidos foram específicos aos antígenos do doador, sendo apenas um caso pertencente ao grupo de reação cruzada, no qual se incluía também o antígeno do doador. Estes pacientes desenvolveram rejeição aguda do tipo vascular. Os demais pacientes deste grupo apresentaram crises de rejeição reversíveis com a administração da terapia imunossupressora (ciclosporina, micofenolato e tacrolimus) estabelecida pelos protocolos do Centro Integrado de Nefrologia. Enquanto o grupo B não desenvolveu anticorpos anti-HLA. Embora a casuística seja pequena, os resultados sugerem a importância de desenvolver anticorpos que combatam os antígenos HLA do doador perante a gravidade da crise de rejeição e por conseguinte, na perda do enxerto.



ABSTRACT

This prospective study evaluates the seric levels and anti-HLA antibodies' specificities of kidney receptor from dead donor, besides to esteem its influence in the etiology and its severity in the rejection crises. From June 2004 to August 2006, 40 transplanted kidney receptors had been analyzed with negative crossed test before of transplant and followed, clinically, at least 90 days after transplant. Patients were grouped by positive and negative rejection of clinical symptoms, being the group A made up of 26 positive cases and group B 14 negative cases. The serum samples for researching anti-HLA antibodies, applying the immunoenzimatic tests (One Lambda Incorporation), had been gotten just before and up to 60 days after the transplant, so that it coincides with increasing creatinine serum levels in the patients with bad evolution of engraftment. The anti-HLA antibodies results before transplant were negative. While the average number of HLA incompatibility (mismatched) between receptor and donor, considering HLA-A, B and DR loci, was 4/6 in both groups. Being in the group A the most frequent had been 4/6 and 3/6 and in the group B only 4/6. Among 26 patients of group A, 3 (11.5%) had developed detected anti-HLA antibodies in days: 16, 28 and 46 after transplant. The developed antibodies had been specific to donor's antigens, being only one case belongs to the crossed reaction group, which it had also the donor's antigens. These patients had an acute rejection of the vascular type. The others of this group presented reversible crises of rejection using immunosuppressive therapy (cyclosporine, mycophenolate and tacrolimus) determined by the Institution protocols. Group B did not develop anti-HLA antibodies. Although this sample is small, the results suggest the importance of creating antibodies that battle with donor's HLA antigen due to severity of rejection crisis and therefore, its loss.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Histórico

A idéia de transplante de órgãos é muito antiga na humanidade. Muitas são as esculturas e pinturas em que quimeras são representadas. Dentre as mais famosas lendas com transplantes está aquela que teria ocorrido no século XIII envolvendo São Cosme e São Damião. Os santos teriam aparecido a um sacristão que tinha perdido sua perna e colocaram uma outra proveniente de um etíope recém-morto. O doente recuperado voltou a caminhar, tudo isto reproduzido num óleo de tela na Espanha em 1495. No entanto, o transplante de órgãos passou da fantasia, como em “*Frankenstein*” (clássico da ficção, escrito por Mary Shelley, 1818), à possibilidade quando, no início do século XX, se aprimoraram as técnicas cirúrgicas, que permitiram efetivamente a realização de enxertos. Alexis Carrel, Prêmio Nobel de Medicina em 1912, descreveu a anastomose de vasos sanguíneos. Após estes estudos, Ulmann realizou os primeiros transplantes em animais [ROBERT , 2005]

Inicialmente, o transplante de pele foi a terapia de escolha em situações de extensas áreas com queimaduras, no entanto, a rejeição rápida do enxerto não permitia sua utilização generalizada. O problema passou a ser dramático durante a Segunda Guerra Mundial, quando as queimaduras eram responsáveis por grande número de mortos. Nesta ocasião, a Força Aérea Real Britânica solicitou ao pesquisador Peter Medawar, um médico de origem libanês nascido no Brasil e que trabalhava na Inglaterra, para investigar este tema. Realizando pesquisas com enxertos de pele em coelhos verificou que, entre indivíduos geneticamente distintos, a rejeição de enxertos seguia as leis da resposta imune com especificidade e memória. Por estes trabalhos, Medawar foi agraciado com o Prêmio Nobel de Medicina em 1960 [MEDAWAR, 1991].

Em 1958, Hamburger e Merrill publicaram o primeiro caso de transplante renal com boa evolução em longo prazo. Neste trabalho, os autores transplantaram o rim de uma vítima fatal de acidente em seu irmão gêmeo univitelino e o sucesso do procedimento abriu as portas para que novos experimentos fossem feitos [MURRAL et al.,1958., MERRIL et al.,1963].

Em 1954, no Centro Nacional de Transfusão Sangüínea de Paris, ao estudar o poder leucoaglutinante de soro de pacientes poli transfundidos e de múltiparas, Jean Dausset descreveu as bases de um sistema antigênico, expresso na superfície dos leucócitos, denominado antígenos HLA (do inglês: representando, inicialmente, a abreviatura de “Human Leucocyte Antigens”)[MARCHAL , et al.,1954]. Mais tarde, verificou-se que estes antígenos estavam expressos na superfície de todas as células somáticas e eram os principais alvos da resposta imunológica, que culminava na rejeição de enxertos. Posteriormente, foi verificado que estes antígenos eram codificados por genes que apresentavam alto grau de polimorfismo, ocupando diferentes *locus*, localizados numa pequena região do braço curto do cromossomo 6 humano. Esta região gênica passou a ser conhecida como “Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano” e a sigla HLA passou a representar, na língua inglesa “Histocompatibility Loci Antigens”, isto é, Antígenos dos *Locus* de Histocompatibilidade [DAUSSET, 1989]. Devido à estreita proximidade dos *locus*, o conjunto gênico é herdado em bloco e a expressão co-dominante faz com que tanto os antígenos de origem materna, como paterna, sejam representados nos tecidos. Pela importância de seus trabalhos para a compreensão dos mecanismos de rejeição de órgãos, Jean Dausset recebeu o Prêmio Nobel de Medicina em 1980.

Estudos realizados relataram dois casos de rejeição hiperaguda de enxerto de rim associados à presença, no soro de receptor, de anticorpos contra linfócitos do doador. Achados semelhantes foram a seguir relatados por Patel e Terasaki. Os autores [KISSMEYER-NIELSEN, 1966; PATEL e TERASAKI, 1969, TERASAKI, 1991] enfatizavam que os receptores haviam recebido previamente transfusões sanguíneas e sugeriram que as mesmas fossem evitadas em candidatos ao transplante. Desde então, esta conduta passou a ser seguida pela grande maioria dos centros de transplantes. Alguns pacientes, entretanto continuaram a receber transfusões sanguíneas por absoluta necessidade clínica.

No início da década de 1970, Opelz e colaboradores (1973) surpreenderam a comunidade envolvida com transplantes com o relato da análise referente aos Registros de Transplantes da Universidade da Califórnia, Los Angeles (UCLA). Esta análise mostrava que, em 12 meses de seguimento, a sobrevida do enxerto de rim de cadáver era

significativamente maior em receptores que haviam recebido mais de 10 transfusões (80%), no período pré-transplante, em comparação aos receptores não transfundidos (40%). Inicialmente, esta observação foi recebida com bastante ceticismo, porém, em 1976, foram publicados dados de um grande centro de transplante europeu, que também sugeriram a relação entre transfusão sanguínea prévia e a melhor sobrevida do transplante. Neste estudo, foi observado que até 1972 a sobrevida, em 12 meses, do rim de doador cadáver era 80%. Entre 1972 e 1974, quando o número médio de transfusão sanguínea por paciente caiu de 60% para 3%, a sobrevida do enxerto também caiu para 50% [PERSIJN, et al.,1977].

A seguir, numerosos estudos uni e multi-cêntricos, retrospectivos e prospectivos, claramente mostraram a menor sobrevida do enxerto em receptores não transfundidos, tanto em casos de transplantes com doador cadáver como com doador aparentado (HLA haplo-idêntico). A magnitude do incremento da sobrevida do enxerto em receptores transfundidos em relação a não transfundidos variava muito de centro para centro (9 a 70%) mas em geral, situava-se entre 10 a 20%. Foi também demonstrado que o efeito das transfusões e da compatibilidade HLA era independente e aditivo. [OPELZ e TERASAKI, 1976, PERSIJN et al.,1979; OPELZ e TERASAKI , 1978; PERSIJN et al., 1979; BARRY et al., 1980; SOLHEIM et al., 1980; SPEES et al., 1980; OPELZ et al., 1981; BETUEL et al., 1982; KOVITHAVONGS et al., 1982; MOORHEAD et al., 1983; VAN ROOD, 1983; PFAFF et al., 1984].

Tendo em vista o aparente efeito benéfico das transfusões sanguíneas no aumento da sobrevida dos transplantes renais, Salvatierra e colaboradores introduziram um protocolo com transfusões específicas do doador vivo, denominado DST (do inglês, Donor-Specific Transfusion), revelando que este procedimento aproximava a sobrevida do enxerto à realizada com doador HLA idêntico [SALVATIERRA, et al.,1981]. Desde então, numerosos centros, incluindo do Brasil passaram a adotar variações do protocolo, na disponibilidade de doador vivo aparentado ou não. Os mecanismos responsáveis por este efeito não são conhecidos, sendo que as teorias mais aceitas referiam-se à seleção e à indução de tolerância imunológica. Todavia, cerca de 25 a 30% dos pacientes submetidos à DST desenvolviam anticorpos anti-HLA, inviabilizando o potencial doador para o transplante renal. Esta sensibilização foi sendo reduzida a cerca de 10 a 15% com o uso

concomitante de drogas imunossupressoras ou administrando sangue armazenado [ANDERSON, et al., 1982].

A relação entre antígenos HLA do doador de sangue e do receptor do transplante poderia também ser um fator importante na determinação do efeito benéfico das transfusões, que é mais evidente quando há o compartilhamento de pelo menos um antígeno HLA-DR. Transfusão de sangue incompatível para 2 antígenos HLA-DR parece ser contra-indicada devido ao risco aumentado de sensibilização e por não melhorar a sobrevida do enxerto [HIESSE e LANG, et al., 1995]. Dependendo da porção do antígeno HLA reconhecida pelo sistema imune do paciente, podem ser gerados anticorpos que também reagem com diferentes outros antígenos HLA, tornando o paciente hipersensibilizado, o que dificultaria o encontro de novo potencial doador para o qual não esteja pré-sensibilizado. Em vista disto, muitos centros descontinuaram os protocolos de DST.

Desde os anos 60, já está bem estabelecido que, em pacientes submetidos ao transplante renal, a presença de anticorpos pré-existentes específicos para os antígenos HLA do doador pode resultar na rejeição hiperaguda ou na perda acelerada do enxerto [KISSMAYER-NIELSEN, et al, 1966; ROSS e YAP, et al., 1990]. Mesmo pacientes que possuem anticorpos anti-HLA que não são específicos para o doador, porém apresentando mais de 50% de reatividade contra painel (PRA, do inglês Panel Reative Antibody), têm um risco maior de desenvolver episódios de rejeição aguda e reduzida sobrevida renal [KERMAN et al., 1996].

A reatividade contra painel (%PRA) é um indicativo da sensibilização do paciente contra os antígenos HLA freqüentes numa população. Esta reatividade é maior em pacientes que foram politransfundidos, em mulheres múltiparas e em pessoas com transplantes prévios. Quanto mais alta, esta reatividade, maiores serão as probabilidades de provas cruzadas positivas contra potenciais doadores de rim. Em 1992, foi publicado um relato sobre o nível de sensibilização contra os antígenos de histocompatibilidade, em 1500 candidatos ao primeiro transplante de rim de cadáver, num centro do Estado de São Paulo. Neste trabalho, os autores relataram uma maior sensibilização e variação da PRA entre pacientes do sexo feminino, cujo nível variava ao longo do tempo, sugerindo que a

correlação positiva entre o número de transfusões sanguíneas e nível de PRA era maior entre os pacientes do sexo masculino[LIEBER et al., 1992a]. Resultados semelhantes foram observados em outro estudo, realizado na Universidade Estadual de Campinas [LIEBER et al., 1992b].

O uso de terapias imunossupressoras mais adequadas e a seleção de doador cadáver com maior número possível de compatibilidade HLA com o receptor têm minimizado o efeito adverso da alta percentagem de PRA [ZHOU e CECKA, 1991]. Apesar disto, parâmetro como prova cruzada negativa e determinação do grau de PRA pré-transplante ainda são muito importantes no momento da seleção de um receptor para transplante renal.

Nos últimos anos, vários estudos vêm relatando a prevalência de anticorpos anti-HLA, desenvolvidos após o transplante renal e sua relevância clínica, em relação ao risco de crises de rejeição aguda ou crônica do enxerto. Diferentes níveis de associação entre episódios de rejeição aguda e desenvolvimento de anticorpos anti-HLA têm sido demonstrados e a rejeição parece ser mais freqüente quando a especificidade dos anticorpos está relacionada com os antígenos do doador. Todavia, ainda não está claro se a pesquisa destes anticorpos seria relevante e se poderia ser considerada como um parâmetro de diagnóstico de rejeição aguda do rim. Apesar de a rejeição crônica ser considerada a principal causa de perda do enxerto a longo prazo, os limites e o grau de envolvimento dos mecanismos celulares e humorais ainda não estão bem estabelecidos, e o desenvolvimento de anticorpos anti-HLA também devem contribuir substancialmente para a rejeição crônica [KERMAN et al., 1997].

Grande avanço na sobrevida renal foi obtido com os trabalhos de Jacques Borel que descobriu a ciclosporina. Seus primeiros ensaios mostraram o efeito imunossupressor da ciclosporina, e esta passou a ser utilizada em todo o mundo com excelentes resultados. A ciclosporina age inibindo IL-2, IL-2R e $INF\gamma$. Todavia, esta droga apresenta nefrotoxicidade e este efeito adverso deve ser monitorado nos pacientes [KAHAN, 1989].

Recentemente, vários outros imunossuppressores foram lançados, tais como: Tacrolimus e Rapamicina, ampliando o arsenal e as possibilidades terapêuticas [KALIL, et al., 2003.]. Apesar dos sucessos obtidos, a tão sonhada e desejada imunossupressão específica para um determinado doador ainda não foi alcançada.

1.2- Transplante renal

Os pacientes com doença renal em estágio terminal podem ser considerados candidatos ao transplante renal. As contra-indicações absolutas incluem condições passíveis de interferir na administração segura de anestesia ou terapia imunossupressora. A avaliação imunológica pré-operatória inclui: tipagem do grupo sanguíneo ABO e dos antígenos de histocompatibilidade (HLA) do receptor e potencial doador, pesquisa de anticorpos no soro do receptor contra o potencial doador (prova cruzada ou do inglês: crossmatch); avaliação do estado de pré-sensibilização contra os antígenos HLA (%PRA) e sorologia viral [DANIEL P. STITES. 2000].

1.2.1- Tipos de transplante

Considerando à origem do enxerto e seu receptor, os transplantes podem ser classificados em:

1. Auto-enxerto: transplante onde doador e receptor são a mesma pessoa.
2. Isoenxerto: transplante realizado entre indivíduos geneticamente idênticos.
3. Aloenxerto: transplante onde doador e receptor são da mesma espécie, porém geneticamente distintos.
4. Xenoenxerto: transplante em que o doador e receptor são de espécies distintas.

Clinicamente, os transplantes renais realizados se classificam, quanto à relação doador/receptor, em três tipos, a saber:

1. Doador vivo aparentado: neste transplante o doador está geneticamente relacionado ao receptor.
2. Doador vivo não-aparentado: trata-se de doador sem relação genética com o receptor.
3. Doador cadáver: é o doador em morte encefálica decorrente de traumatismo ou acidente vascular craniano, que do ponto de vista ético seria o doador de órgãos ideal para todos os tipos de transplante. No caso do transplante renal, sua utilização tem sido crescente no nosso meio. Neste tipo de transplante não há parentesco com o receptor e é possível graças aos esforços das equipes multidisciplinares de captação de órgãos.

No Brasil, números expressivos de transplantes renais são ainda realizados com doadores vivos aparentados, diferentemente de outros países desenvolvidos, cuja fonte de órgãos é, preferencialmente, o doador cadáver. Através de organizações de sociedades civis, como a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), organizaram-se programas de captação de órgãos com o auxílio dos governos estaduais. Com isto, tem-se elevado em muito o número de transplantes cadavéricos. Segundo dados da ABTO, há 208 centros de transplante renal cadastrados nos país. Em 2005, foram realizados 3362 transplantes renais, dos quais, 1594 (47,4%) com doador cadáver e 1768 (52,6%) com doador vivo mostrando um ligeiro aumento com respeito a 2004.

Na figura 01, está representado o número de transplantes realizados no Brasil nos anos 2004 e 2005, período onde se encontra a maioria dos nossos pacientes, observando-se um aumento no número de cirurgia de transplante com doador cadáver em relação aqueles realizados com doador vivo.

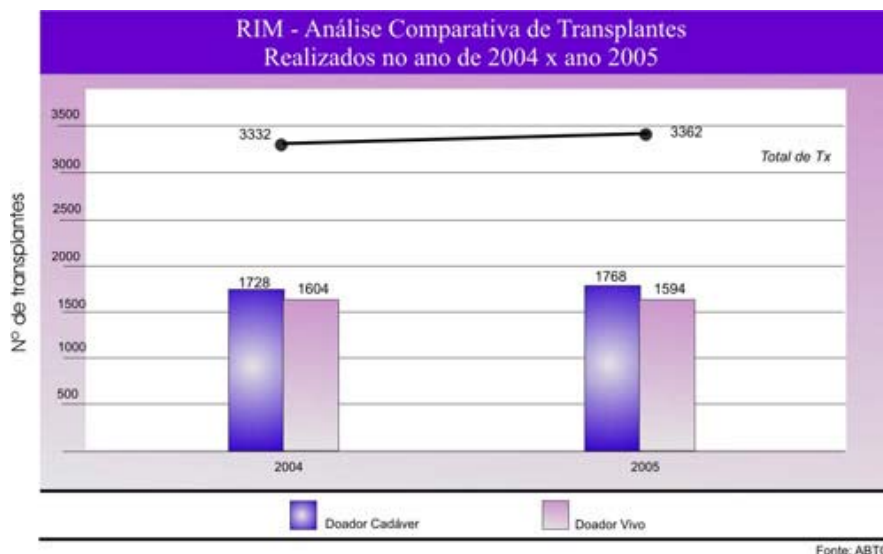


Figura 1- Análise Comparativa de Transplantes realizados nos anos de 2004 e 2005

1.3- Histocompatibilidade

As técnicas para definir os antígenos de histocompatibilidade em humanos foram cruciais para o desenvolvimento dos transplantes, como mencionado anteriormente. Estes antígenos provocam reações imunes quando tecidos são transplantados de um indivíduo para outro geneticamente não idêntico o que resulta num processo denominada rejeição.

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) é uma região cromossômica que compreende um conjunto de genes codominantes, altamente polimórficos que expressam seus produtos na superfície de uma variedade de células. Mais de 200 genes estão localizados nesta região [TROWSDALE e CAMPBELL, 1997]. Nos humanos, o CPH se encontra localizado no braço curto do cromossomo 6 e subdivide-se em três classes (Figura 02). O sistema HLA constitui um subconjunto de genes do CPH humano, estes genes são denominados HLA de classe I e de classe II [SACHS et. al.,1984].

Os *locus* clássicos do CPH classe I (HLA-A, -B, -C) codificam glicoproteínas de membrana de alto polimorfismo, envolvidas em importantes mecanismos de contato imune intercelular [ZINKERNAGEL e DOERTHY, 1979]. Na superfície celular, as

moléculas classe I estão associadas, de maneira não covalente, com a beta-2-microglobulina, uma molécula menor, codificada por um gene não polimórfico, localizado no cromossomo 15, fora do CPH.

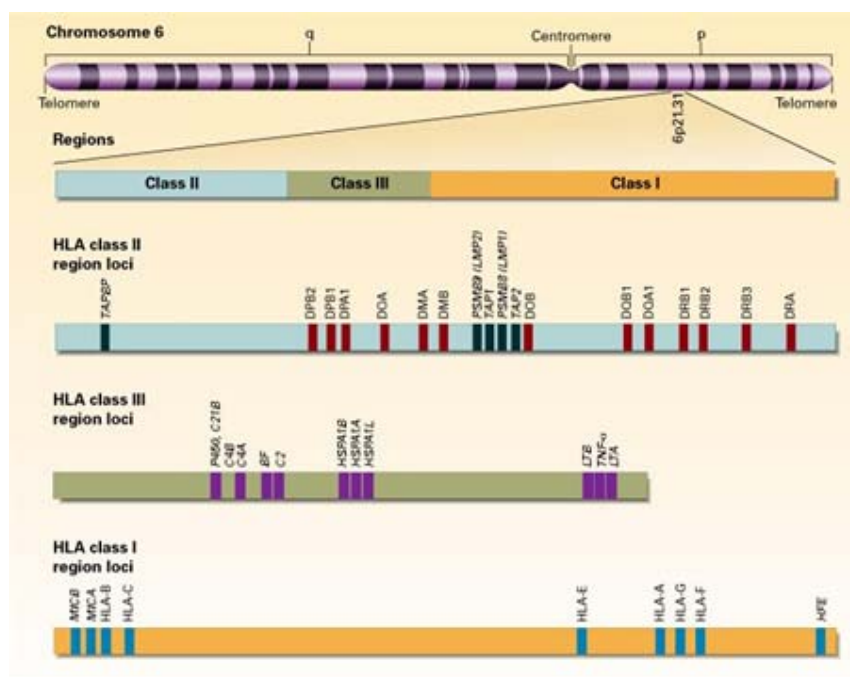


Figura 2- Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano – HLA (Fonte: Duarte de Sillos & Fagundes U, 2003)

As moléculas HLA de classe I estão presentes na superfície de todas as células nucleadas e participam na apresentação de derivados peptídicos intracelulares às células T citotóxicas CD8+. Uma vez que o reconhecimento é feito, o linfócito T citotóxico destrói a célula-alvo que apresenta o antígeno. Nas condições não-fisiológicas de transplantes, são as moléculas HLA de classe I estranhas (ligadas a peptídeos endógenos) que são reconhecidas pelos linfócitos Tc do hospedeiro durante a rejeição. Outros *locus* HLA classe I foram identificados, HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H e HLA-J [NEPOM BS, e NEPOM, 1995], entretanto sua relevância na resposta alogênica ao transplante ainda permanece desconhecida.

Os antígenos HLA classe II são codificados por dois diferentes tipos de genes, denominados “A” e “B”. Três genes funcionais A e seis B estão localizados nas sub-regiões denominadas HLA-DR, -DQ e -DP. Os genes A e B codificam glicoproteínas transmembrânicas denominadas cadeias α e β , organizados em domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\beta 1$, $\beta 2$ respectivamente, as quais formam um heterodímero na superfície celular. Todos os antígenos HLA-DR apresentam a mesma cadeia α , não polimórfica. Assim, o que distingue um antígeno de outro são diferenças na sequência de aminoácidos encontradas nas cadeias β . A cadeia β presente nos antígenos HLA-DR1 a DR18 é codificada pelo gene DRB1. As proteínas dos antígenos HLA-DQ e -DP são codificadas por dois pares de genes A e B ambas polimórficas. As moléculas de histocompatibilidade de classe II têm uma distribuição celular mais restrita, sendo encontradas, constitutivamente, em linfócitos B, macrófagos/monócitos, células dendríticas, células de Langerhans da pele e em algumas células hematopoiéticas precursoras. A expressão das moléculas classe II também pode ser induzida em linfócitos T ativados e em outras células incluindo fibroblastos e células endoteliais. Estas moléculas HLA classe II têm como função apresentar peptídeos exógenos ao receptor do linfócito T auxiliador (Ta), CD4+, durante a resposta imune. A principal função dos linfócitos T auxiliares é a secreção de citocinas, as quais atuam sobre as próprias células T auxiliares, sobre as T citotóxicas, além de atuar em outras células, incluindo linfócitos B, células NK (do inglês, *Natural Killer*), macrófagos, polimorfonucleares e endotélio vascular. Estas citocinas exercem vários efeitos que promovem e regulam as respostas imunes específicas humoral e celular e também a reação inflamatória.

O complexo gênico HLA é herdado em bloco e a expressão dos produtos gênicos é codominante. Assim, o conjunto de alelos herdados no mesmo cromossomo é chamado haplótipo e representa o material genético herdado do pai ou da mãe.

As moléculas HLA expressas nas superfícies celulares agem como fortes antígenos de transplantação e o seu polimorfismo constitui uma séria barreira para transplantes de órgãos entre indivíduos não consangüíneos. A presença do HLA-DR prediz a incidência de rejeição humoral do enxerto e minimiza o grau de sensibilização dos candidatos a re-transplante [MARLIES, et al.,2004]. Estudos recentes mostram a

prevalência dos anticorpos anti-HLA na presença da rejeição dos enxertos nos pacientes com transplante renal [MORALES-BUENROSTRO et al., 2006].

1.4- Componentes imunológicos da rejeição

O reconhecimento de aloantígenos pelo sistema imune é realizado pelo receptor (TCR) presente na superfície da célula T, que os reconhecem apenas quando estão apresentados na superfície de outras células, que atuam como células apresentadoras de antígenos[SAYEGH et al., 1994]. As células apresentadoras de antígenos podem ser tanto células do doador como do receptor. No primeiro caso, as células estão presentes dentro de órgãos vascularizados transplantados, sendo chamados de "leucócitos passageiros", expressando, tanto antígenos de classe I, quanto classe II e com capacidade de estimular, diretamente, as células T do receptor caracterizando a via direta do alo-reconhecimento. Na outra forma de reconhecimento, as células apresentadoras de antígenos do receptor fagocitam os aloantígenos desprendidos do órgão transplantado, expressando os epítomos processados nas fendas da superfície celular, caracterizando a via indireta do alo-reconhecimento [LARSEN et al., 1990].

Os receptores de células T (TCR) estão associados às moléculas CD3 formando o complexo “TCR-CD3”, que é responsável pela transmissão do sinal de ativação para o citoplasma da célula, através de sua porção intracitoplasmática. Vários sítios de fosforização são ativados pelas vias de proteína-quinase e outras proteína-quinases dependentes de cálcio e de calmodulina. Estes sítios são alvos de ação de várias drogas imunossupressores tais como: a ciclosporina e tacromilus [HARRISON, et al., 2007]

A apresentação antigênica ao receptor do linfócito T auxiliador representa o primeiro sinal para sua ativação e, conseqüentemente, para o desencadeamento do processo de rejeição ao enxerto. Porém, ainda é necessário que ocorram sinais adicionais (co-estimulatórios) induzidos nas células T, por outros receptores inespecíficos (segundo sinal) para que a ativação ocorra efetivamente. Na verdade, os sinais do complexo “TCR-CD3” podem levar até à inativação celular, levando ao estado de anergia celular, caso estes

não forem acompanhados pelo segundo sinal. Atualmente, o sistema melhor documentado do segundo sinal é o associado ao resultado da ligação de moléculas CD28 do linfócito T CD4 com seus ligantes da família da proteína B7 (B7-1 e B7-2) presentes na superfície da APC [ADAM, et al., 1997].

A ativação dos linfócitos T auxiliares é resultante da mobilização de íons cálcio dos estoques intracelulares e numerosos promotores que ativam uma proteína quinase que, no final, irá fazer com que promovam a expressão de IL-2 e de seu receptor (IL-2R), essenciais para a resposta imune ao transplante favorecendo a expansão clonal das células T [ROITT, 1997].

Os linfócitos T CD4⁺ ou auxiliares são de grande importância para a ativação do mecanismo imune de rejeição ao aloenxerto e são subdivididos em 2 sub-populações, que são os linfócitos T auxiliares 1 e 2 (Th1 e Th2). Estas sub-populações são diferenciadas pelo perfil das citocinas (interleucinas) produzidas. Entre as citocinas tipo Th1 estão incluída: a interleucina 2 (IL-2), interleucina 3 (IL-3), fator de necrose tumoral-beta (TNF- β), interferon-alfa, beta e gama (INF α,β,γ); e parecem ser responsáveis pelo componente celular da resposta imune. Entre as citocinas tipo Th2 estão incluídas a interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10) que são responsáveis pelo componente humoral da resposta imune.

As citocinas produzidas e secretadas pelas células T e por outras células se ligam aos seus receptores presentes na superfície de linfócitos T citotóxicos, células B, dos próprios linfócitos T auxiliares, macrófagos e outras células, induzindo sinais de ativação nas células alvo que levam à nova produção de citocinas, proliferação celular, diferenciação e ação específica.

As células Th1 e Th2 se desenvolvem a partir de um mesmo precursor e podem apresentar função regulatória sobre a atividade da outra. O INF- γ inibe a expressão das citocinas produzidas por células Th2, enquanto IL-4 e IL-10 inibem as produzidas pelas células Th1. A citocina chave na rejeição é o INF- γ . Ele atrai e ativa os macrófagos, ativa células endoteliais e aumenta a expressão de CPH [ADAM, et al., 1997].

Uma vez ativados os linfócitos T, o passo seguinte é a migração dos leucócitos para o tecido transplantado, que, posteriormente, sofrerá a ação citotóxica ao enxerto. Para que ocorra essa migração, é necessário a expressão de moléculas de adesão tanto nos leucócitos quanto nas células endoteliais que facilitam a passagem das células pela parede vascular até o tecido. As principais moléculas de adesão leucocitárias são LFA-1, VLA-4 e L-selectina; e as principais moléculas de adesão vasculares são ICAM-1, ICAM-2 e VCAM-10. Essas facilitam a adesão das células ao endotélio vascular, favorecendo a migração por diapedese através da parede celular. Após a entrada das células (fagócitos, NK e T citotóxico) no órgão transplantado, passa-se então ao processo de citotoxicidade que levará, finalmente, ao dano tecidual do aloenxerto. [ADAM, et al., 1997].

1.4.1.-Mecanismos efetores da resposta imune

A resposta imune pode ser dividida em dois grupos: a resposta imune humoral, que é mediada por anticorpos produzidos por plasmócitos; e resposta imune celular que é mediada pelos linfócitos T e substâncias por eles produzida como as citocinas, fatores de crescimento e inflamatórios e enzimas.

1.4.2- Influência da presença dos anticorpos anti-HLA na sobrevida do enxerto

O papel desempenhado pelos anticorpos em resposta ao aloenxerto passa pela ativação dos linfócitos B, que é dependente do estímulo produzido por citocinas secretadas pelas células T auxiliares tipo 2. Estes linfócitos produzem IL-4, IL-6 e IL-10, culminando na expansão e proliferação dos linfócitos B. Após sua diferenciação em plasmócitos, ocorre a produção de anticorpos (em geral, anti-HLA) que irão se ligar à parede da célula do órgão enxertado e daí, através da ação do sistema complemento ocorre a lesão da membrana celular, levando à destruição do tecido, por meio da geração de proteínas formadoras de poros (polimerização de C9). Além disto, sub-produtos da ativação da cascata do sistema complemento e ativação plaquetária contribuem para a quimiotaxia e

adesão de células fagocitárias que acabam despejando seu conteúdo lisossomal nas células do órgão transplantado. Anticorpos anti-HLA da classe IgG também contribuem para aumentar adesão das células fagocitárias, uma vez que estas são possuidoras de moléculas CD16, isto é, receptor para a porção Fc da IgG [JAMES, et al., 1997]

1.4.3- Influência dos componentes da imunidade celular na sobrevida do enxerto

Existem duas vias que explicariam como a célula T teria a capacidade de lisar as células-alvo: a via das perforinas e granzimas. Estas vias estariam envolvidas no processo de lise celular que ocorre minutos ou horas após a sua ativação. Discute-se ainda uma terceira via, a via do fator de necrose tumoral (TNF) que participa de forma mais lenta na morte celular. Os grânulos de linfócitos T citotóxicos também contêm certo número de proteases séricas chamadas granzimas (grânulos de enzimas) cuja forma de atuação permanece incerta podendo ser por ativação da perforina, alterando a estrutura da superfície da célula alvo ou entrando na célula após a geração dos poros, levando à morte celular [CARDONI, et al,2005].

Os macrófagos são também importantes na imunidade mediada por células e rejeição aos enxertos. As células T citotóxicas produzem e secretam citocinas que atraem macrófagos para o local do enxerto e outras que fazem com que os macrófagos fiquem ativados e desenvolvam atividade citotóxica, aumentando com isso o número de células efectoras para a lesão do enxerto.

Em suma, com o mecanismo imunológico de rejeição aos enxertos, tornar possível observar a importância do aloreconhecimento para o início da resposta imune e a sequência do evento, através da ativação da célula T, posterior produção de citocinas, atração de células inflamatórias, expressão de moléculas de adesão, entrada no tecido enxertado e finalmente, ação citotóxica contra o enxerto, levando à destruição celular.

1.5- Rejeição

Por razões históricas a rejeição do enxerto é classificada de acordo a histopatologia e/ou tempo transcorrido entre o transplante e o início da rejeição, além dos mecanismos envolvidos no processo.

A rejeição do aloenxerto renal pode ser mediada tanto por mecanismos humorais como celulares. Nas rejeições humorais, destaca-se a rejeição hiperaguda mediada por anticorpos pré-formados oriundos de sensibilização prévia contra antígenos do doador. A primeira barreira a ser evitada para este tipo de rejeição é a incompatibilidade ABO e, depois, anticorpos contra as moléculas HLA. A pré-sensibilização contra antígenos HLA ocorre ou por transfusões sanguíneas prévias, ou por gestações, ou transplantes prévios.

O diagnóstico da presença de rejeição nos pacientes é, geralmente, avaliado por critérios clínicos como: febre, oligúria, aumento de peso e, especialmente, por um rápido incremento nos níveis de creatinina. A rejeição é confirmada pelos resultados da biópsia do enxerto, considerando critérios da classificação Mundial Banff 1997 [RACUSEN, SOLEZ et al. 1999].

1.5.1- Rejeição hiperaguda mediada por anticorpos

A rejeição hiperaguda é caracterizada por hemorragias e oclusão trombótica da vasculatura do enxerto, começando dentro de minutos a horas depois que os vasos sanguíneos do hospedeiro são anastomosados aos vasos do enxerto, e é mediada por anticorpos preexistentes na circulação do hospedeiro que se ligam aos antígenos endoteliais do doador. A ligação do anticorpo ao endotélio, ativa o sistema complemento e induz alterações no endotélio do enxerto, promovendo a trombose intravascular. As células endoteliais passam a secretar formas de fator de Von Willebrand com peso molecular elevado, que acabam levando à adesão e agregação de plaquetas. As células endoteliais perdem os proteoglicanos do sulfato de heparan da superfície das células que, no estado normal, interagem com a anti-trombina III para inibir a coagulação. A ativação do

complemento induz também lesão das células endoteliais e exposição das proteínas da membrana basal subendotelial e exposição das proteínas. Esses processos contribuem para a trombose e a oclusão vascular, e o órgão enxertado sofre dano isquêmico irreversível [CAI et. al., 2005]. Com a utilização da prova cruzada pré-transplante para pesquisa de anticorpos anti-HLA pré-formados e órgãos ABO compatíveis, a rejeição hiperaguda é, perfeitamente, evitada. [KALIL et al., 2004; TERASAKI et. al., 2005]. A rejeição tipo hiperaguda detectada atualmente é, em geral, devida à presença de anticorpos da classe IgG contra aloantígenos não HLA clássicos, expressos nas células endoteliais vasculares, ou à reativação de células de memória contra antígenos de histocompatibilidade clássicos ou não. Esses anticorpos geralmente surgem transfusão de sangue, transplante anterior ou gestações múltiplas. Se o título desses aloanticorpos for baixo, a rejeição hiperaguda poderá se desenvolver lentamente, ao longo de vários dias. Para distinguir das rejeições hiperagudas que ocorriam no passado, este tipo de rejeição é denominado como “rejeição acelerada do aloenxerto”, que tem início mais precoce do que o da rejeição aguda típica (ABBAS, 2003). Atualmente, com o propósito de minimizar a rejeição acelerada, alguns centros vêm utilizando métodos mais sensíveis, como a citometria de fluxo, para a detecção de baixos títulos de aloanticorpos [LOPEZ- HOYOS, FERNANDEZ- FRESNEDO, et al. 2003].

1.5.2- Rejeição aguda

A rejeição aguda é um processo de lesão vascular e parenquimatosa mediado pelas células T, por macrófagos e por anticorpos, começando geralmente depois da primeira semana do transplante. A diferenciação das células efectoras e a produção de anticorpos que mediam a rejeição aguda ocorrem em resposta ao enxerto, o que explica o retardamento do início da rejeição aguda. A ativação primária dos linfócitos T exerce um papel central na rejeição aguda ao responder aos aloantígenos presentes nas células vasculares endoteliais e parenquimatosas. A lise das células do enxerto é provocada diretamente por linfócitos T citotóxicos ativados ou por células inflamatórias recrutadas por linfocinas liberadas por linfócitos T auxiliares, levando à necrose do enxerto. Nos enxertos vascularizados, como os de rins, as células endoteliais constituem o alvo inicial da rejeição aguda. Nos episódios

de rejeição aguda, um freqüente achado inicial é uma endotelialite microvascular. No primeiro estágio da rejeição ocorre também uma endotelialite ou arterite da íntima das artérias de médio calibre, que serve como o principal indicador de falha aguda e irreversível do enxerto. Os anticorpos podem também mediar rejeição aguda depois que o enxerto elabore resposta imune humoral aos antígenos das paredes dos vasos e aos anticorpos que são produzidos liguem-se as paredes dos vasos do enxerto com inflamação aguda, que é diferente da oclusão trombótica sem necrose da parede do vaso, observada na rejeição hiperaguda.

1.5.3- Rejeição crônica

A rejeição crônica é caracterizada por fibrose com perda das estruturas normais do órgão, ocorrendo em prazo prolongado. Como a terapia para controlar a rejeição aguda melhorou, a rejeição crônica mostra-se como a forma principal da perda de aloenxerto. A patogenia da rejeição crônica é menos conhecida do que a da rejeição aguda. Em muitos casos como resultado da proliferação de células de músculos lisos na íntima, ocorre oclusão arterial do enxerto. Esse processo é chamado arteriosclerose acelerada do enxerto. A arteriosclerose do enxerto é freqüentemente observada nos transplantes cardíacos e renais mal sucedidos e pode se desenvolver em qualquer enxerto do órgão vascularizado dentro de 6 meses a 1 ano após o transplante. A lesão parece ocorrer sem evidência de lesão vascular declarada, e não foi claramente estabelecida nenhuma correlação entre o desenvolvimento da arteriosclerose do enxerto e infecções, ou episódios de rejeição aguda anterior, nem anormalidades dos lipídeos. A proliferação de células de músculos lisos na íntima vascular poderá caracterizar a rejeição tardia, uma vez que linfócitos ativados pelos aloantígenos das paredes dos vasos dos enxertos induzem os macrófagos a secretarem fatores de crescimento de músculos lisos [ABBAS, 2005]. A fibrose da rejeição crônica pode também representar a cicatrização do ferimento após a necrose celular parenquimatosa da rejeição aguda. A fibrose observada na rejeição crônica poderá resultar de macrófagos ativados secretando fatores de crescimento de células mesenquimais, como ocorre com o fator de crescimento derivado das plaquetas, que estimula a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno [ABBAS, 2005].

Entre os fatores que predisõem ao aparecimento da rejeição crônica estão incluídos: o tempo de isquemia fria, o número de episódios de rejeição, o número de incompatibilidades HLA e a infecção por citomegalovírus.

1.6- Imunossupressão no transplante renal

O sucesso dos transplantes hoje em dia é devido em grande parte à variedade de drogas disponível. É uma análise clínica bem criteriosa para correta utilização destas após uma cuidadosa seleção. Além da ciclosporina, droga tradicional usada desde a década de 60, os agentes biológicos utilizados nos últimos anos são considerados como aquisições de grande relevância na área de imunossupressão do transplante. O tratamento imunossupressor ideal deveria promover a aceitação do enxerto sem interferir nas outras ações do sistema imunológico, tais como a defesa contra as infecções e o controle câncer. Dentre as drogas utilizadas correntemente estão aquelas que têm uma ação antiinflamatória hormonal, aquelas que interferem na multiplicação celular e, conseqüentemente, linfocitária, aquelas de ação específica na ativação do sistema imune e, por último, aquelas que vão especificamente destruir o linfócito, eliminando-o do processo de rejeição já instalado [KALIL, 2003].

1.6.1- Drogas antiinflamatórias hormonais

Os glicocorticóides são uma classe de hormônios esteróides, utilizados como coadjuvantes importantes nas terapias imunossupressoras, com múltiplas funções tais como: inibir o deslocamento (quimiotaxia) de macrófagos ativados, monócitos e neutrófilos para áreas inflamatórias, inibir a expressão das moléculas de histocompatibilidade e inibir a produção de IL-1 pelos macrófagos / monócitos, um importante co-estimulador dos linfócitos T auxiliador e mediador inflamatório sistêmico. Dentre as ações sobre os linfócitos, estão a indução de morte celular e a sua redistribuição no sangue e líquido extracelular, também contribuindo para o efeito antiinflamatório. Existem tentativas clínicas de retirada de corticóide em alguns casos de transplantados, tanto em crianças

como em pacientes diabéticos, porém, nem sempre a retirada é um sucesso, porque estes são utilizados nos casos de rejeição aguda celular na assim chamada pulsoterapia com corticóide, acreditando que nesses casos exista uma ação lítica direta dos linfoblastos [KALIL, 2003].

1.6.2- Antimetabólitos

As primeiras drogas imunossupressoras que surgiram foram os antimetabólitos. Destes, sem dúvida a mais utilizada é a azatioprina. Análogo e antagonista das purinas, a azatioprina inibe a síntese de DNA e com isso a multiplicação celular. Assim, esta droga tem ação em todas as células em multiplicação no organismo, não atuando exclusivamente na divisão linfocitária. Como consequência, existem riscos de diminuição de produção de outras células do sistema hematológico, causando pancitopenia. Até há pouco tempo, era a droga imunossupressora de escolha, apesar dos problemas advindos da sua utilização. Há 25 anos, com a instituição da ciclosporina houve queda de seu uso como imunossupressor de escolha. Hoje, a azatioprina é muito usada conjuntamente com corticóide e ciclosporina no chamado esquema tríplice. [KALIL, 2003].

1.6.3- Ciclosporina e outras drogas

A ciclosporina é um produto do fungo *Tricoderma polysporum* inicialmente proposta para ser utilizada como antibiótico. Sua utilização clínica como droga imunossupressora começou nos anos 80, conhecido como “a era da ciclosporina”, apesar da sua nefrocitotoxicidade. Mais recentemente, outras drogas com atividade semelhante foram introduzidas como: a FK506 e a Rapamicina. Estas drogas agem através de um receptor de membrana e ligam a proteínas citoplasmáticas chamadas imunofilinas, inibindo a ativação dos genes responsáveis pela codificação e liberação de IL-2, IL-2R e INF- γ . [KALIL, 2003].

1.6.4- Agentes biológicos

Ademais de contar com as drogas imunossupressoras, outra alternativa são os agentes biológicos utilizados para combater processos de rejeição. Trata-se de anticorpos policlonais e monoclonais que vão agir especificamente sobre os linfócitos T. A Globulina Anti-linfocitária (ALG) e Globulina Anti-timócito (ATG) são exclusivos no tratamento de rejeições celulares agudas refratárias à pulso-terapia. O grande inconveniente deste tipo de tratamento é o risco de infecções e de doenças linfoproliferativas. A tecnologia de Anticorpos Monoclonais, vem revolucionando o esquema das drogas imunossupressoras. Foi desenvolvido comercialmente o anticorpo OKT3 na metade dos anos 80, este anticorpo reconhece a molécula CD3 presente nos linfócitos T periféricos maduros. Sua grande vantagem é a alta especificidade para linfócitos T e a pequena quantidade de proteína animal necessária. Entretanto, sua utilização tem alguns inconvenientes tais como reações febris, alergias e, sobre tudo, o risco da indução de anticorpos [KALIL et al., 2002].

Outro anticorpo atualmente em uso clínico é específico para o CD25, que é uma subunidade- α do receptor da IL-2. Esse agente é administrado no momento do transplante para evitar a ativação da célula, bloqueando a ligação da IL-2 às células ativadas, e pode promover uma depleção da expressão das células TCD25 já ativadas. A rejeição hiperaguda mediada por anticorpos pré-formados pode ser evitada pela remoção desses anticorpos da circulação, conhecida como plasmaférese [ABBAS, 2003].

Outra alternativa na terapêutica são as toxinas metabólicas que matam as células T em proliferação, os quais sendo também usadas para evitar a rejeição de enxertos, esses agentes inibem a maturação dos linfócitos desde a fase de precursores e também matam as células T maduras em proliferação que foram estimuladas por aloantígenos. Drogas mais recentes e largamente usada, como é o Micofenolato de Mofetil (MMF), que é metabolizado em ácido micofenólico, o qual bloqueia uma isoforma linfócito - específica de monofosfato de inosina desidrogenase, uma enzima exigida para sintetizar “de novo” os nucleotídeos guanina. Como o MMF inibe seletivamente a isoforma linfócito - específica dessa enzima, manifesta poucos efeitos tóxicos.[ABBAS, 2005].

1.7- Prova cruzada (Crossmatch)

Independentemente do grau de sensibilização do receptor, o teste fundamental que tem por objetivo verificar se o receptor tem anticorpos pré-formados contra o potencial doador é a prova cruzada [ZANE, 2001]. Com o emprego do método de microlinfocitotoxicidade, a prova cruzada foi introduzida por Paul Terasaki e Rose Pane, nos anos 60, e foi responsável pela diminuição dramática no número de rejeições hiperagudas. No início, essa prova era realizada diretamente com soro do receptor, linfócitos periféricos do doador e a adição de soro de coelho como fonte de complemento. Posteriormente, o método foi modificado, visando aumentar a sua sensibilidade, com a introdução de lavagem para a retirada de imunocomplexos antes da adição do complemento e a pontencialização com a adição de anti-imunoglobulina humana [HOPKINS, 1990; AMOS, et al., 1969; JOHNSON, et al., 1972]. Em 1983, foi introduzida a citometria de fluxo, considerada mais sensível, porém menos específica [GAROVVOY, et al., 1983].

A contra-indicação formal para a realização do transplante é a presença de IgG anti-HLA de classe I do doador no soro do receptor. A positividade devida a anticorpos IgM é normalmente dirigida contra auto-antígenos e não contra-indica o transplante e IgM aloespecíficos também parecem não ser deletérios ao enxerto, pois podem ser controlados com a imunossupressão pós-transplante. Para se distinguir a classe do anticorpo (IgG ou IgM) responsável pela positividade da prova, costuma-se tratar, previamente, o soro do paciente com detioteithrol (DTT), um redutor e inativador de IgM, que não interfere da atividade citotóxica da IgG [KHODADADI, et al., 2006].

Entre as limitações das técnicas envolvendo a microlinfocitotoxicidade existem: a necessidade do uso de células vivas; dificuldade em diferenciar anticorpos citotóxicos não-HLA de anticorpos anti-HLA específicos, a não detecção de anticorpos não fixadores de complemento como IgG2 e IgG4 e a impossibilidade do seu uso em pacientes transplantados em tratamento com anticorpos citotóxicos contra células T ou timócitos ou anticorpos monoclonais anti-linfócitos, tipo OKT3 [ZACHARY A, et al., 1995].

1.8- Compatibilidade HLA

No transplante renal, quanto maior a similaridade HLA entre doador e receptor, melhor a sobrevida do enxerto, especialmente no primeiro ano do transplante. Estudos clínicos demonstraram que de todos os *locus* da classe I e da Classe II, as similaridades entre HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 são as mais importantes para prever o diagnóstico do transplante. Em geral, nos transplantes de órgãos sólidos, a similaridade do HLA-A e B é importante tanto no período inicial como no tardio, após o transplante. A compatibilidade nos *locus* HLA-DRB1 só é importante nos três primeiros meses após o transplante, devida sua expressão limitada às células apresentadoras de antígenos, principalmente, em relação as células dendríticas [ABBAS, 2000; CLAAS et al., 2004].

Considerando-se os três *locus* do complexo principal de histocompatibilidade humano: HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1 e a codominância dos alelos, é possível se determinar de 0 a 6 compatibilidades ou ausência de compatibilidade, conhecidas, na língua inglesa como: *Match* (M) ou *Miss Match* (MM), respectivamente. A melhor sobrevida do enxerto é observada em presença de 6 compatibilidades HLA entre o receptor e doador. Quanto menor o número de compatibilidade, menor é a sobrevida do enxerto [OPELZ, et al., 1999].

Estudos realizados com primeiros transplantes de rim de doadores cadavéricos pelos grupos *Collaborative Transplant Study* (CTS) em soros pré-transplante, mostraram que anticorpos IgG do receptor estão dirigidos contra os antígenos HLA; mostrando uma influência na sobrevida e posterior perda do enxerto. A característica deste estudo é a diferenciação dos antígenos dos anticorpos anti-HLA da Classe I e da Classe II pelo método imunoenzimático ELISA. Os resultados obtidos foram publicados na literatura, observando-se que pacientes com a presença de anticorpos tanto da classe I como os da classe II têm uma taxa mais baixa de sobrevida do enxerto, em comparação com aqueles que apresentavam só anticorpos da classe I ou da classe II.

1.9- Reatividade contra painel

1.9.1- Avaliação do grau de sensibilização aos antígenos HLA: Reatividade contra painel

Como mencionado anteriormente, candidatos a receptores de rim podem desenvolver anticorpos anti-HLA em decorrência de transfusões sanguíneas, gestação ou transplante prévio, que são extremamente deletérios para a evolução do enxerto.

Inicialmente estes anticorpos eram detectados por microlinfocitotoxicidade, onde o soro dos pacientes era avaliado contra painel de linfócitos obtidos de indivíduos sadios, em que a grande maioria das especificidades HLA da população estava representada. Atualmente, existem métodos semi-automatizados, imunoenzimáticos ou empregando fluorocitometria, onde o soro do paciente é avaliado contra antígenos HLA purificados e adsorvidos em placas ou micro pérolas de poliestireno. Em geral, costuma-se avaliar amostras de soro dos pacientes em lista de espera de rim cadavérico, colhidas em intervalos de três meses ou 10 a 20 dias após ter recebido transfusão sanguínea. O estudo seriado das amostras de soro permite selecionar a amostra mais positiva, também conhecida como histórica, para ser utilizada, por ocasião da prova cruzada pré-transplante, em paralelo com a amostra de soro mais recente, possibilitando a detecção de anticorpos que sofreram queda no título, por ocasião do teste. Além disto, com a análise das reações é possível a definição das especificidades anti-HLA e evitar o transplante com rins de doadores que possuam o antígeno correspondente.

O grau de reatividade de soro PRA (*do inglês Painel Reative Antibody*) pode variar de 0 a 100%. O receptor é considerado não sensibilizado quando o PRA for igual a 0%. Níveis entre 1 e 10% não são considerados importantes e em geral os trabalhos não mostram diferença na sobrevida do enxerto renal entre os grupos de pacientes com 0% e com 1 a 10% de PRA. Pacientes com PRA variando de 11 a 50% são considerados sensibilizados e com PRA maior de 50% são, em geral, classificados como hipersensibilizados. Esta definição pode variar conforme o centro transplantador, sendo que em alguns, somente são considerados pacientes hipersensibilizados aqueles com PRA acima de 70%. [SINGH, KIBERD, WEST et al., 2003].

A relação que existe entre os níveis do PRA no período pré-transplante com resposta no pós-transplante está diretamente relacionada com a sobrevida do enxerto. Pacientes hipersensibilizados têm maior dificuldade para encontrar um doador contra o qual a prova cruzada seja negativa, isto é, ausência de anticorpos linfocitotóxicos. Além deste problema, vários estudos têm mostrado a correlação entre alta reatividade contra painel e a menor sobrevida do transplante.

A análise de um grande número de transplantes compilados pelo *Collaborative Transplant Study*, mostra uma influência do grau de compatibilidade HLA entre receptor e doador na melhor sobrevida do enxerto renal de doador cadavérico, em pacientes hipersensibilizados [CTS, 1, 2004]; número de compatibilidade HLA tem grande pontuação no critério de escolha do receptor do rim cadavérico, conforme a política adotada em nosso meio.

Poucos estudos existem em relação aos anticorpos anti-HLA gerados após o transplante renal. Considera-se a detecção de anticorpos anti-HLA presentes no período pós-transplante como um novo método de monitorização [LÓPEZ-HOYOS M, 2004]. Alguns trabalhos têm relacionado anticorpos anti-HLA da classe II como fator de risco no desenvolvimento de complicações imunológicas durante os primeiros meses após o transplante. [SLAVCEV A et al., 2004, CAMPOS EF, 2006].

Podemos afirmar que os anticorpos anti-HLA gerados após o transplante têm uma significativa relevância na evolução do enxerto, já que as evidências mostram que estes anticorpos eluídos do enxerto após rejeição crônica. Sendo uma grande vantagem para o paciente receptor a identificação precoce destes aloanticorpos ajudando na orientação da necessidade de biópsia e no protocolo imunossupressor, revertendo a sensibilidade recebida no transplante [CARDARELLI. et. al. 2005; PANIGRAHI,et. al., 2006].

2- HIPÓTESE

As crises de rejeição vascular aguda do enxerto renal cadavérico podem estar relacionadas ao desenvolvimento, no receptor, de anticorpos anti-HLA, específicos ou não ao doador após o transplante.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Avaliar a relação dos anticorpos anti - HLA, gerados após o transplante renal, com a evolução do enxerto, proveniente do doador cadavérico.

3.2- Objetivos Específicos

- Levantar o grau de compartilhamento de antígenos HLA entre receptor e doador.
- Levantar a ocorrência de episódios de rejeição ou perda do enxerto.
- Pesquisar a presença de anticorpos anti-HLA classes I e II nos períodos: pré e pós-transplante nos períodos.
- Avaliar a correlação entre a especificidade anti-HLA e a tipagem do doador.
- Avaliar a correlação entre o desenvolvimento de anticorpos anti-HLA e o tipo histológico de rejeição.

4- METODOLOGIA

4.1- Casuística

O presente trabalho refere-se a um estudo prospectivo, que incluiu 40 pacientes submetidos ao transplante de rim cadavérico, no Centro Integrado de Nefrologia, da Universidade Estadual de Campinas, entre junho de 2004 e março de 2006. Os dados relativos à evolução clínica foram levantados até Julho 2006

4.1.1- Elegibilidade

A seleção dos pacientes para o transplante renal seguiu os critérios pré-estabelecidos pelo Sistema Nacional de Transplante, que criou o “Cadastro Técnico Único” (Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo, 2004).

A seleção prioriza o grau de compatibilidade HLA entre receptor e doador, seguido do tempo de espera em lista, do nível de reatividade do soro contra painel de antígenos HLA, da idade e o “status” da doença de base, em relação à doença renal.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa, 667/2004 (ANEXO 1)
- Carta de Informação ao Sujeito de Pesquisa (ANEXO 2)
- Termo de Consentimento livre e Esclarecido (ANEXO 3)

4.1.2- Critérios de Inclusão

1. Pacientes adultos (idade ≥ 18 anos), de ambos os sexos, submetidos ao transplante de rim cadavérico, no período junho 2004 a março de 2006.
2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento assinado.

3. Tempo mínimo de 100 dias de seguimento pós - transplante.
4. A existência de amostras de soros armazenadas, correspondentes aos períodos pré-transplante e 30 e 60 dias após o transplante.
5. Sobrevida renal ou do paciente de, pelo menos, 90 dias após transplante.

4.1.3- Critérios de exclusão

1. Pacientes pediátricos.
2. Pacientes submetidos a transplante renal de doador cadáver fora do período estabelecido.
3. Pacientes com acompanhamento inferior ao período estabelecido de 100 dias.
4. Pacientes sem amostras de soro armazenadas (ou com volume insuficiente), equivalentes ao período pré-transplante e até 90 dias após o transplante.

4.1.4- Variáveis

1. Número de transplante prévio.
2. Número de transfusões sanguíneas prévias.
3. Sexo do doador ou receptor.
4. Tempo de isquemia fria.
5. Tipagem HLA-A, HLA-B e HLADRB1 do doador e receptor.
6. Nível de sensibilização aos antígenos HLA, nos períodos pré e pós-transplante.

7. Especificidades anti-HLA dos anticorpos no soro dos receptores, quando for o caso.
8. Evolução do enxerto renal definida por critérios clínicos e histológicos.

4.1.5- Pacientes

Foram selecionados 40 pacientes que receberam enxerto de rim de doador cadavérico, incluindo um, que havia rejeitado, previamente, o enxerto proveniente de doador cadáver. A idade dos pacientes variou de 25 a 65 anos (Mediana = 46). A idade dos doadores variou de 12 a 55 anos (Mediana= 38 anos) e 65% pertenciam ao sexo masculino. Foram realizados 30 transplantes com receptor e doador do mesmo sexo, representando, 22,5% das mulheres e 52,5% dos homens.

Considerando-se a evolução clínica no período pós-transplante, os pacientes foram divididos em dois grupos (A e B). O Grupo A era constituído de 26 pacientes com complicações do tipo funcional, sendo que todos foram acompanhados por mais de 90 dias, sendo glomerulonefrite crônica a doença de base com maior frequência em ambos os grupos, seguida de Nefroesclerose Hipertensiva, sendo que 10 foram acompanhados por mais de 90 dias e o Grupo B com 14 pacientes que apresentaram boa evolução, sem nenhum episódio de rejeição ou infecção.

As características gerais dos grupos de pacientes estão sumarizadas na Tabela 1. As tipagens HLA dos receptores e respectivos doadores, valores da reatividade contra painel de antígenos HLA, juntamente com especificidades dos anticorpos e os dados relativos à evolução de cada paciente estão descritos no anexo 8.

Tabela 1- Dados demográficos relativos aos pacientes renais crônicos que receberam enxerto de rim cadavérico, subdivididos de acordo com a evolução clínica pós-transplante.

Características		Grupo A	Grupo B
Eventos Clínicos no pós-transplante		Com	Sem
Número de Casos		26	14
Número de Pacientes do sexo masculino (%) ¹		15 (57,7%)	11 (78,6%)
Idade dos Receptores (em anos: mediana / mínima / máxima) ²		46/ 25 / 65	45/ 34 / 61
Idade dos Doadores (em anos: mediana / mínima / máxima) ³		38 / 12 / 55	33/16/58
Relação Gênero (Doador / Receptor) ⁴	Masculino / Masculino	11	10
	Feminino / Masculino	4	1
	Masculino / Feminino	4	1
	Feminino / Feminino	7	2
Número de Transfusões Sangüíneas Prévias ⁵	Média	8	0,8
	Mínimo	0	0
	Máximo	27	4
Número de Pacientes com Transfusões Sangüíneas ⁶	= 0	4(15,4%)	8 (57,1%)
	= 1-2	5 (19,2%)	4(28,6%)
	= 3-5	6 (23,0%)	2(14,3%)
	≥ 5	11(42,3%)	0(0%)
Número de Pacientes com pelo menos um Transplante Prévio		1	0
Doença de Base ⁷	Rim Policístico	4	3
	Nefropatia Lúpica	0	1
	Nefropatia Diabética	5	1
	Nefroesclerose Hipertensiva	1	0
	Glomérulo Nefrite Crônica	9	2
	HAS	2	1
	Indeterminada	5	6

Teste Fisher(4,5 e 7) $p < 0,05$ e Teste de Wilcoxon (2,3,e 6) (¹) $p = < 0,05$.

4.2- Métodos

4.2.1- Tipagem dos antígenos de histocompatibilidade

As tipagens HLA dos receptores e doadores foram determinadas pela definição genérica (baixa resolução) dos genes alelos, empregando-se métodos de biologia molecular. A maioria das tipagens incluiu os alelos dos *locus* HLA-A, HLA-B e HLADRB1 e, em alguns casos, também foram determinados os alelos HLA-DQB1. Basicamente, os procedimentos incluíram a coleta da amostra de sangue em EDTA, a extração do DNA, e a amplificação específica dos alelos, pelos métodos de PCR-SSP (do inglês, *Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers*) ou PCR-SSO (do inglês, *Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotide*), sua detecção em gel de agarose e a interpretação dos resultados.

4.2.2- Prova cruzada pré-transplante

As provas cruzadas foram realizadas pelo método de citotoxicidade dependente de anticorpo e complemento, potencializado com antigamaglobulina humana. As provas foram consideradas negativas, quando as amostras de soro (tratadas e não tratadas com ditiotreitol) se mostraram não reativas frente à população enriquecida de linfócitos T, obtidas a partir de gânglios linfáticos do doador cadáver [MICKEY, et al., 1989].

4.2.3- Obtenção dos soros

As amostras de soro disponíveis no período pós-transplante foram obtidas por ocasião das avaliações clínicas e armazenadas a -20°C, gentilmente, cedidas pela equipe de Laboratório de Nefrologia, para o estudo da reatividade contra painel de antígenos HLA.

4.3- Pesquisa de anticorpos anti-HLA em amostra de soro de receptores de rim de doador cadáver

4.3.1- Pesquisa de anticorpos contra os antígenos HLA classes I e II no soro de pacientes submetidos ao transplante de rim cadavérico, avaliados por ensaios imunoenzimáticos

Neste procedimento, foi realizada uma pré-investigação nas amostras de soro do paciente, para se determinar a presença ou não de algum tipo de anticorpo anti-HLA classe I ou II, sem levar em consideração a sua especificidade ou o grau de sensibilização do paciente.

4.3.1.1- Distribuição dos reagentes na placa Terasaki para o LAT TM10x5 *Lambda Antigens Tray Mixed*

Para esta finalidade, foi empregado o teste imunoenzimático indireto, utilizando-se o “kit” comercial, *LATTMM10X5 - Lambda Antigens Tray Mixed*, produzido e fornecido pela One Lambda, Inc. (Los Angeles, CA, USA).

Os procedimentos e as instruções para o preparo dos reagentes que acompanham o “kit” foram realizados, conforme metodologia descrita pelos fabricantes (ANEXO 6). A placa de Terasaki *LATTMM10X5* apresenta 96 poços distribuídos em 12 linhas, identificadas por números, seqüenciais, de 1 a 12 e 8 colunas, identificadas por letras, seqüenciais, de A a H. Esta identificação tem por objetivo facilitar a distribuição dos reagentes e a identificação das reações, referentes aos controles e às amostras de soro dos pacientes. As duas primeiras linhas da placa são reservadas para a transferência de reagentes controles do teste e as demais, para as amostras dos pacientes.

Os poços “A” e “B” das linhas “1” e “2” e os poços “F”, “G” e “H”, da linha “2” são utilizados para controle denominado “branco”. Nestas escavações, não é adicionado soro e não existe nenhum antígeno HLA (ou quaisquer outros reagentes) adsorvido no plástico, elas têm por objetivo, detectar a fixação inespecífica do conjugado, ao plástico. A

reação colorimétrica resultante nestas escavações é denominada “*reação de fundo*”, importante para a calibração das demais reações. O valor referente à média das densidades ópticas definidas nestas 7 escavações deve ser descontado dos valores das demais reações. Ainda na linha “1”, os poços “C”, “D” e “E” são reservados para a transferência do soro controle negativo e os poços “F”, “G” e “H”, para o soro controle positivo. O controle de qualidade do conjugado é realizado nos poços “C”, “D” e “E”, da linha “2” e contém apenas IgG humana, previamente fixada no plástico e tem por finalidade avaliar a atuação da enzima fosfatase, sobre o substrato cromogênico.

Nas linhas “3” a “12”, as escavações “A”, “B”, “E” e “F” contêm uma mistura de antígenos HLA classe I e as escavações “C”, “D”, “G” e “H”, mistura de antígenos HLA classe II. Estas escavações são utilizadas para as amostras de soro dos pacientes, que são avaliadas em duplicatas para cada classe de antígeno, permitindo o total de 20 avaliações, por placa. As escavações referentes aos antígenos classe I contêm uma mistura de 81 diferentes antígenos, dos tipos HLA-A, B, C e Bw, enquanto que, as escavações reservadas para a pesquisa de anticorpos contra antígeno classe II contêm uma mistura de 25 diferentes antígenos, dos tipos HLA-DR e DQ. Os antígenos estão adsorvidos na superfície do material plástico, que constituía placa e foram purificados a partir de linhagens de celulares de linfoblastos humanos, transformados pelo vírus EBV.

Além da placa, o “kit” era acompanhado de: ⁽¹⁾ um frasco com soro humano liofilizado contendo anticorpos anti-HLA e utilizado como “*controle positivo*”; ⁽²⁾ um frasco com soro humano liofilizado sem anticorpos anti-HLA e utilizado como “*controle negativo*”; ⁽³⁾ um frasco contendo uma solução denominada “*diluyente de anticorpo*”, contendo albumina bovina; ⁽⁴⁾ um frasco contendo “*tampão de lavagem*”, constituído de cloreto de sódio, tampão Tris e Tween-20; ⁽⁵⁾ um frasco denominado “*conjugado de enzima IgG*”, contendo anticorpo específico para cadeia gama da IgG humana, conjugado com a enzima fosfatase alcalina, cloreto de sódio, albumina bovina e tampão tris; ⁽⁶⁾ um frasco denominado “*substrato colorimétrico*”, contendo fosfato 5-bromo-4-cloro-3-indolil (BCIP); ⁽⁷⁾ um frasco denominado “*tampão de substrato*”, constituído de tampão glicerina, cloreto de magnésio e cloreto de zinco e ⁽⁸⁾ um frasco denominado “*reagente de paragem*”, contendo ácido etilenodiamenotetracético, sal dissódico (EDTA).

Os soros controles liofilizados foram reconstituídos em 0,1 mL de água deionizada estéril. Antes da transferência dos soros (controles e de pacientes) para as devidas escavações da placa, foram necessárias pré-diluições, utilizando-se a solução “*diluyente de anticorpo*”, que acompanhava o “kit”. O soro controle positivo foi diluído na proporção 1:10 e os demais, na proporção 1:3.

Após a transferência das amostras de soro dos pacientes (e controles), as placas foram deixadas a incubar, por 1 hora, em temperatura ambiente (20-25°C) e, em seguida, lavadas com o tampão de lavagem diluído, previamente, na proporção de 10:1, em água destilada. O excedente do tampão de lavagem foi retirado com o auxílio de uma bomba de aspiração a vácuo. A seguir, a todos os poços da placa, foram adicionados 10 µL da solução contendo o conjugado (anticorpo anti-IgG humana, ligado à Fosfatase Alcalina), previamente diluída na proporção 1:100, com solução diluyente de anticorpo. A placa foi deixada a incubar por mais 40 minutos, à temperatura ambiente e, em seguida, se procedeu a segunda lavagem. Posteriormente, a todas as escavações da placa foram adicionados 10µL do substrato colorimético, previamente preparado no respectivo tampão. Após nova incubação a 37°C, por 10 a 15 minutos, foram adicionados 5 µL do “reagente de paragem” (EDTA), em cada poço, para interromper a reação cromogênica. A densidade óptica das reações foi determinada em espectro-fotômetro apropriado para placas de Terasaki (ELX800NB, *Bio-Tek ELISA tray reader*), utilizando-se o comprimento de onda de 630 nm.

A figura 3 ilustra a representação esquemática do final da reação, numa placa de Terasaki *LATTM10X5*, contendo três exemplos de amostras de soro reativas para a pesquisa de anticorpos anti HLA classe I ou II. Nesta, podem ser observadas uma amostra de soro com reatividade para antígenos HLA classe II (linhas 4), uma amostra contendo anticorpos para antígenos classes I e II (linha 6) e uma amostra com anticorpos reativos para antígeno HLA classe I (linha 8), bem como as reações colorimétricas nas escavações contendo soro controle positivo e destinadas ao controle de qualidade do conjugado (Figura 3).

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	B	B	CN	CN	CN	CP	CP	CP
2	B	B	IgG	IgG	IgG	B	B	B
3	HLA-I	HLA-I	HLA-II	HLA-II	HLA-I	HLA-I	HLA-II	HLA-II
4	HLA-I	HLA-I	HLA-II	HLA-II	HLA-I	HLA-I	HLA-II	HLA-II
5	HLA-I	HLA-I	HLA-II	HLA-II	HLA-I	HLA-I	HLA-II	HLA-II
6	HLA-I	HLA-I	HLA-II	HLA-II	HLA-I	HLA-I	HLA-II	HLA-II
7	HLA-I	HLA-I	HLA-II	HLA-II	HLA-I	HLA-I	HLA-II	HLA-II
8	HLA-I	HLA-I	HLA-II	HLA-II	HLA-I	HLA-I	HLA-II	HLA-II
9	HLA-I	HLA-I	HLA-II	HLA-II	HLA-I	HLA-I	HLA-II	HLA-II
10	HLA-I	HLA-I	HLA-II	HLA-II	HLA-I	HLA-I	HLA-II	HLA-II
11	HLA-I	HLA-I	HLA-II	HLA-II	HLA-I	HLA-I	HLA-II	HLA-II
12	HLA-I	HLA-I	HLA-II	HLA-II	HLA-I	HLA-I	HLA-II	HLA-II

Figura 3- Representação esquemática da definição da especificidade anti-HLA do anticorpo, em duas amostras de soro avaliadas na placa LATM 10X5 (*One Lambda*). Adaptado por Lieber, 2007.

4.3.2- Caracterização da especificidade anti-HLA dos anticorpos detectados nas amostras de soro de pacientes submetidos ao transplante de rim cadavérico, e determinação do nível de reatividade contra painel de antígenos (PRA), avaliados por ensaios imunoenzimáticos

Neste ensaio, só foram incluídas as amostras de soro dos pacientes que se mostraram reativas para os antígenos HLA classes I ou II, no procedimento anterior. Para as avaliações se empregou o teste imunoenzimático indireto. Utilizando-se o “kit” comercial, *LATTM1240 - Lambda Antigens Tray Mixed*, produzido e fornecido pela One Lambda, Inc. (Los Angeles, CA, USA).

O “kit” *LATTM1240* são acompanhado das mesmas soluções descritas no “kit” *LATTM10X5* e as etapas dos procedimentos são bastante semelhantes. A principal diferença está nos reagentes adsorvidos nas 96 escavações da placa de Terasaki, de modo a permitir a caracterização das especificidades anti-HLA dos anticorpos presentes no soro e definir a proporção de reações positivas, frente aos diferentes antígenos adsorvidos, separadamente, nas escavações da placa. Esta proporção é denominada como PRA e expressa em porcentagem, permitindo a distinção do nível de reatividade do soro (% PRA), contra antígenos classe I, ou classe II, separadamente.

Este “kit” permite o estudo de apenas duas amostras de soro por placa. Para cada soro existem 28 escavações contendo antígenos HLA classe I e 12 com antígenos classe II. O teste além de revelar as especificidades contra antígenos HLA denominados como “privados”, também define as especificidades relacionadas ao grupo de antígenos de reação cruzada (CREG, do inglês, do *Cross Reaction Group*). Cada um dos antígenos está presente em mais de uma escavação da placa. O posicionamento dos antígenos está identificado e relatado num mapa que acompanha o “kit”. Este mapa também está incluído no programa computacional que avalia, diretamente, a intensidade das reações cromogênicas, reveladas pelo aparelho espectrofotométrico e definindo a pontuação das reações (*scores*: 0, 2, 4, 6 e 8). O programa também permite a realização automática dos ajustes necessários para definir o critério de positividade do soro, levando em considerações as densidades ópticas obtidas nas reações controles. Estes critérios serão

relatados nos itens descritos mais adiante e são, basicamente, os mesmos para os dois “kits” da *One Lambda*, utilizados neste estudo.

4.3.2.1- Distribuição dos reagentes na placa Terasaki para o LAT 1240 *Lambda* *Antigens Tray*

Na placa LATTM1240, as escavações destinadas ao controle do teste estão localizadas nas linhas “1” e “12”. Diferente do “kit” anterior, aqui também foram incluídos controles para avaliar a adesão inespecífica de IgG ao material plástico dos dois soros avaliados na mesma placa, representados pelas escavações “A” e “B” da linha “1” e “G” e “H” da linha “12”. O controle da “reação de fundo” (branco para calibração das reações) é realizado nas escavações “C”, “D”, “E” e “F” da linha “12”. Na linha “1”, as escavações “C”, “D”, “E” e “F” são destinadas para à adição do soro controle negativo ou, quando este não estiver disponível, para adição da solução “diluyente de anticorpo” e as escavações “G” e “H” são reservadas para a transferência do soro controle positivo. O controle de qualidade do conjugado é realizado nas escavações “A” e “B”, da linha “12”, onde foi pré-adsorvido IgG humana.

A certificação das especificidades dos anticorpos presentes no soro do paciente só é estabelecida, na presença de reação positiva na maioria das escavações, que porta o mesmo antígeno. A figura 4 ilustra a representação esquemática do final da reação, numa placa de Terasaki LATTM1240, onde foram avaliados dois soros: o primeiro (avaliado nas linhas “2” a “6”) se mostrou reativo em todas as escavações portadoras do antígeno HLA-A2 e o segundo (avaliado nas linhas “7” a “11”) se mostrou reativo em todas as escavações portadoras do antígeno HLA-DR4. O esquema também mostra intensa reação colorimétrica nos controles positivo e no controle de qualidade do conjugado e ausência de cor nos demais controles.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	SI Ag	SI Ag	SCN	SCN	SCN	SCN	SCP	SCP
2	A1 2B E 2, 3B EWA ₂ CWA ₇	A1 32 E 8D, 9A EWA ₂ CWA ₁₀	A1 6B E 3B, 4B EWA ₂ CWA ₁₁	A2 11 E 4A, 8D EWA ₂ CWA ₁₀	A2 11 E 32, 7B EWA ₂ CWA ₂	A2 2B E 47 6B EWA ₂ CWA ₂	A2 2B E 11, 9A EWA ₂ CWA ₁₄	A2 3 E 27, 4A EWA ₂ CWA ₈
3	A2 3A E 12, 72 EWA ₂ CWA ₅	A2 3D E 7, 17 EWA ₂ CWA ₂	A2 E 12, 42 EWA ₂ CWA ₁₈	A2 E 2, 12 EWA ₂ CWA ₇	A3 2B E 27, 17 EWA ₂ CWA ₇	A3 3D E 35, 16 EWA ₂ CWA ₄	A3 32 E 10, 19 EWA ₂ CWA ₈	A3 9D2 E 7, 21 EWA ₂ CWA _{15, 12}
4	A11, 22 E 11, 14 EWA ₂ CWA ₁₈	A11 E 32, 7B EWA ₂ CWA ₂	A23, 9B E 41, 71 EWA ₂ CWA ₁₇	A24, 25 E 12, 72 EWA ₂ CWA ₁₂	A24, 2B E 37, 81 EWA ₂ CWA ₈	A24, 21 E 19, 19 EWA ₂ CWA ₄	A25, 32 E 82, 12 EWA ₂ CWA ₁₈	A25, 6B E 32, 16 EWA ₂ CWA ₇
5	A3D, 21 E 12, 71 EWA ₂ CWA ₈	A32, 3B E 12, 82 EWA ₂ CWA ₁₄	A32, 7A E 82, 42 EWA ₂ CWA ₇	A9D, 82 E 44, 4B EWA ₂ CWA ₇	DR 1, 4 DR 12, X DQ 1, 2	DR 1, 7 DR 12, X DQ 2, 5	DR 10, 16 DR 11, X DQ 1, X	DR 4, 10 DR 12, 12 DQ 7, 2
6	DR 4, 19 DR 11, 12 DQ 4, 5	DR 7, 2 DR 12, X DQ 2, 4	DR 2, 12 DR 12, X DQ 4, 8	DR 8, 12 DR 12, 12 DQ 2, 5	DR 11, 16 DR 11, 12 DQ 4, 7	DR 11, 17 DR 12, X DQ 1, 9	DR 12, 17 DR 12, X DQ 2, 9	DR 12, 12 DR 12, X DQ 4, 9
7	A1 2B E 2, 3B EWA ₂ CWA ₇	A1 32 E 8D, 9A EWA ₂ CWA ₁₀	A1 6B E 3B, 4B EWA ₂ CWA ₁₁	A2 11 E 4A, 8D EWA ₂ CWA ₁₀	A2 11 E 32, 7B EWA ₂ CWA ₂	A2 2B E 47 6B EWA ₂ CWA ₂	A2 2B E 11, 9A EWA ₂ CWA ₁₄	A2 3 E 27, 4A EWA ₂ CWA ₈
8	A2 3A E 12, 72 EWA ₂ CWA ₅	A2 3D E 7, 17 EWA ₂ CWA ₂	A2 E 12, 42 EWA ₂ CWA ₁₈	A2 E 2, 12 EWA ₂ CWA ₇	A3 2B E 27, 17 EWA ₂ CWA ₇	A3 3D E 35, 16 EWA ₂ CWA ₄	A3 32 E 10, 19 EWA ₂ CWA ₈	A3 9D2 E 7, 21 EWA ₂ CWA _{15, 12}
9	A11, 22 E 11, 14 EWA ₂ CWA ₁₈	A11 E 32, 7B EWA ₂ CWA ₂	A23, 9B E 41, 71 EWA ₂ CWA ₁₇	A24, 25 E 12, 72 EWA ₂ CWA ₁₂	A24, 2B E 37, 81 EWA ₂ CWA ₈	A24, 21 E 19, 19 EWA ₂ CWA ₄	A25, 32 E 82, 12 EWA ₂ CWA ₁₈	A25, 6B E 32, 16 EWA ₂ CWA ₇
10	A3D, 21 E 12, 71 EWA ₂ CWA ₈	A32, 3B E 12, 82 EWA ₂ CWA ₁₄	A32, 7A E 82, 42 EWA ₂ CWA ₇	A9D, 82 E 44, 4B EWA ₂ CWA ₇	DR 1, 4 DR 12, X DQ 1, 2	DR 1, 7 DR 12, X DQ 2, 5	DR 10, 16 DR 11, X DQ 1, X	DR 4, 10 DR 12, 12 DQ 7, 2
11	DR 4, 19 DR 11, 12 DQ 4, 5	DR 7, 2 DR 12, X DQ 2, 4	DR 2, 12 DR 12, X DQ 4, 8	DR 8, 12 DR 12, 12 DQ 2, 5	DR 11, 16 DR 11, 12 DQ 4, 7	DR 11, 17 DR 12, X DQ 1, 9	DR 12, 17 DR 12, X DQ 2, 9	DR 12, 12 DR 12, X DQ 4, 9
12	IgG	IgG	B	B	B	B	SI Ag	SI Ag

Figura 4- Representação esquemática da definição da especificidade anti-HLA do anticorpo, em duas amostras de soro avaliadas na placa LATTM1240 (*One Lambda*). Adaptado por Lieber, 2007.

4.3.3- Validação dos ensaios imunoenzimáticos

A validação do ensaio imunoenzimático é um instrumento de avaliação da eficácia e segurança do teste. Consiste na quantificação dos controles positivos, negativos e amostras.

O ensaio deve ser considerado válido se os valores se encontram dentro dos seguintes parâmetros:

Tabela 2- Densidade óptica (DO) dos reativos para a validação do ensaio.

Reativos	D.O.
Controle de Qualidade (IgG fixada)	> 1,000 - 2,000
Soro Controle POSITIVO	> 0,800 – 1,500
Valor do Fundo (sem antígenos)	< 0,250 (diluyente de anticorpo) < 0,500 (soro controle)

Fonte: One Lambda Inc.

4.4- Cálculos do ensaio

4.4.1- Reação positiva-negativa

Para se determinar o limiar entre positividade e negatividade do soro, deve-se, inicialmente, subtrair o valor da densidade óptica, correspondente à correção de fundo (Branco: poços 1A e 1B) dos valores obtidos utilizando o soro controle positivo e o soro controle negativo. Após esta subtração o teste será considerado válido somente se a razão entre a densidade óptica com controle positivo e negativo for maior que 5,0. Esta operação está sumarizada na seguinte fórmula:

$$\text{POS / NEG} = \frac{(\text{D.º Média SCP} - \text{D.º Média S/ Ag})}{(\text{D.º Média SCN} - \text{D.º Média S/ Ag})} > 5,0$$

Fonte: One Lambda Inc.

O sistema é usado para a pontuação dos escores como no teste de microlinfocitotoxicidade.

Tabela 3- Sistema de Pontuação da Reação Positiva e Negativa

Percentagem (%)	Escore
0-10	1 (negativo)
11-20	2 (reação fraca-positiva ou negativa)
21-50	4 (reação positiva)
51-80	6 (reação positiva forte)
81 a >100	8 (reação positiva muito forte)

Fonte: One Lambda Inc.

Para se considerar o escore “2” de reação neste método imunoenzimático (equivalente a 50% de células mortas no método clássico de microlinfocitotoxicidade) como reação positiva e para se ter maior confiança estatística, é necessário utilizar a relação POSITIVA/NEGATIVA mais alta e esta pré-determinação pode variar, de acordo com os resultados de cada laboratório e seus requisitos de sensibilidade. Os poços de Garantia de Qualidade revestidos com IgG humano são ocasionalmente incluídos para verificar o desempenho do conjugado secundário de anticorpos-enzimas. A leitura média para estes poços deve ser sempre >1,000 (geralmente >2,000). O valor médio dos poços contendo soro controle positivo deve ser sempre >0,800 (idealmente >1,500).

4.4.2- Definição do valor de corte (Cut-Off)

Os limites foram calculados como percentagens da faixa de reatividade do soro controle positivo fornecido pelo fabricante do “kit”, subtraindo o valor da densidade óptica de fundo (não específico) provocada pela reação do soro teste (ou diluente de anticorpo) na ausência de antígeno HLA.

Portanto, para identificar valores na listagem acima ou abaixo de um determinado limite, pode-se calcular um limite ajustado. Por exemplo, para o limite de 20%:

$\text{Valor de corte} = [(\text{D.O. Média SCP} - \text{D.O. Média S/ Ag}) \times 0,20] + [\text{D.O. Média S/ Ag}]$

Onde, D.O= densidade óptica; SCP=Soro Controle Positivo. S/Ag=Poço do fundo sem antígeno

4.5- Analise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando-se os pacotes estatísticos computacionais. R: Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN,3-900051-07-0. O nível de significância adotado foi de 5% ou seja $p \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A comparação das variáveis, número de transfusões, doença base, número de discrepâncias antigênicas e tipo de rejeição entre o grupo A (Com complicações) e o grupo B (Sem complicações), foi realizada pelo Teste Exato de Fisher.

A comparação das variáveis numéricas entre os dois grupos foi realizada pelo Teste de Wilcoxon.

5- RESULTADOS

5.1- Caracterização e seguimento dos pacientes submetidos ao transplante renal

A avaliação clínica dos receptores de enxerto de rim cadavérico incluídos neste estudo, abrangeu o período compreendido entre Junho 2004 e agosto de 2006. O tempo médio de seguimento pós-transplante foi 365 dias, sendo que 18 (45%) pacientes foram acompanhados por mais de 12 meses e 7 (17,5%) por menos de 6 meses. O tempo de seguimento e a evolução de cada paciente do grupo A estão relatado no anexo 8. Dentre os 40 pacientes selecionados, 26(65,0%) apresentaram complicações no pós-transplante e destes, 7 (17,5%) acabaram perdendo o enxerto.

Na tabela 4, estão sumarizados os dados relativos às possíveis variáveis intervenientes como, idade, gênero, número de gestações prévias, número de transfusões sanguíneas e transplantes prévios, bem como, o tempo de isquemia fria a que o enxerto foi submetido. A aplicação do Teste Fisher revelou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de pacientes, em relação a todas as variáveis levantadas. A figura 5 apresenta a distribuição dos pacientes de acordo com o número de transfusões sanguíneas prévias ao transplante. No grupo A dos pacientes com rejeição se observou 4 (15,4%) sem transfusão; 5 (19,2%)pacientes que receberam de 1 a 2 transfusões; 6 (23,1%) pacientes com 3 a 5 transfusões e 11 (42,3%) pacientes com mais de 5 transfusões. Nos pacientes do grupo B, 8(57,1%) sem nenhuma transfusão; 4 (28,6%) pacientes com 1 a 2 transfusões; 2 (14,3%) pacientes com 3 a 5 transfusões e nenhum paciente com mais de 5 transfusões.

Tabela 4- Caracterização dos sub-grupos de pacientes submetidos ao transplante de rim cadavérico

Variáveis	Grupo A	Grupo B
Complicações no Pós Transplante	Sim	Não
Número de pacientes	26	14
Sexo (masculino/feminino) ¹	15/11	11/3
Idade (anos) ²	46,4	45,4
Número de Transfusões ³		
Sanguíneas Prévias		
0	4	8
1-2	5	4
3-5	6	2
Mais de 5	11	0
Número de transplantes prévios ⁴	1	0
Tempo de Isquemia (horas) ⁵	16,4	13,8

Teste Exato de Fisher,(1,3,4) P<0,05, Teste de Wilcoxon (2,5) P<0,05

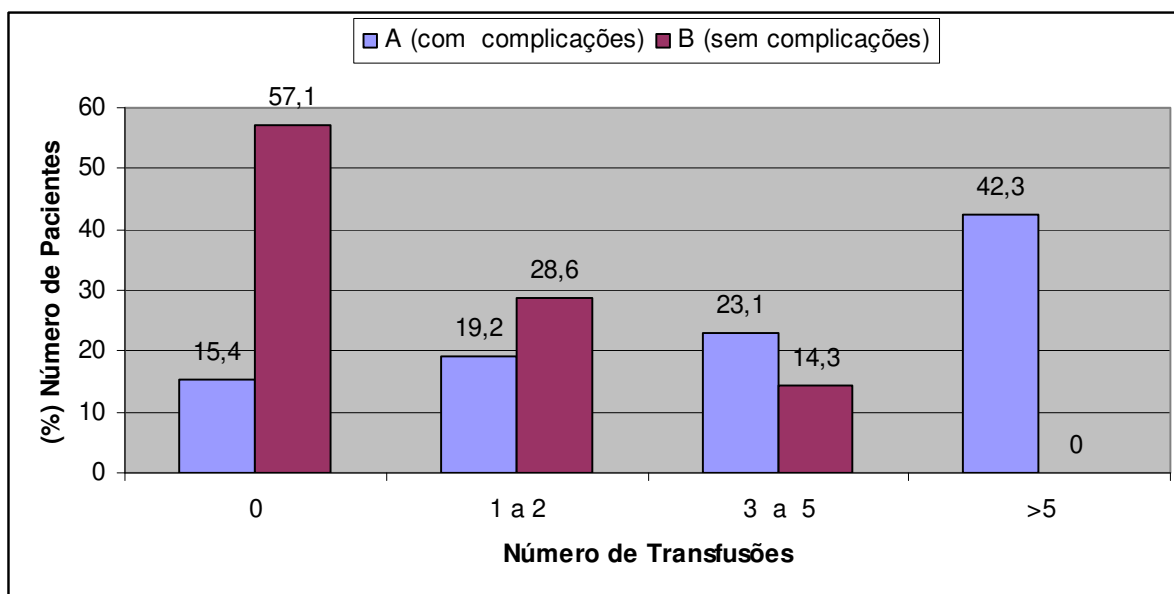


Figura 5- Distribuição dos receptores de enxerto de rim cadavérico com (grupo A) e sem (grupo B) complicações no período pós-transplante, de acordo com o número de transfusões sanguíneas prévias.

5.2- Número de antígenos HLA discrepantes entre receptor e doador do enxerto renal

Para este levantamento, foram considerados os antígenos HLA referentes aos *locus* HLA-A, HLA-B e HLA-DR, neste último levando em consideração a genotipagem HLA-DRB1. Considerando-se a codominância dos genes alelos, o número de incompatibilidades HLA entre receptor e doador poderia variar de 0 a 6. Os dados relativos a cada transplante estão apresentados no anexo 7.

Na tabela 5, se observam os níveis de incompatibilidades dos grupo A, nos *locus* A, B e DRB1; observando-se que 17(65,4%) do *locus* A com 2 incompatibilidades entre doador e receptor.; 9(34,6%) do *locus* A com 1 incompatibilidades entre doador e receptor e nenhuma compatibilidade no *locus* A, sendo que no *locus* B 14 (87,5%) apresentam com 2 incompatibilidades, 11(42,3%) apresentam incompatibilidade com 1 incompatibilidade; e 1(3,8%) apresentam compatibilidade entre doador e receptor, sendo que no *locus* DRB1, 11 (42,3%) de compatibilidade, 11 (42,3%) com 1 de 2 incompatibilidades, e 4 (15,4%) com 2 de 2 incompatibilidades. Sendo que no grupo B, 7(50%) das incompatibilidades do *locus* A são com 2, e 7 (50%) com 1 incompatibilidade, no *locus* B 9(64,3%) com 1 incompatibilidade entre receptor e doador, e 5(37,5%) com 1 compatibilidades entre receptor e doador; no Locus DRB1 8(57,1%) com 1 incompatibilidade; 2(14,3%) com 2 incompatibilidades; e 4(15,4%) com compatibilidades no Locus DRB1.

Nesta mesma tabela, se observa o total de incompatibilidades entre doador e receptor, mostrando-se 15(57,8%) com 4 incompatibilidades entre doador e receptor; 7(50,%) com 2 incompatibilidades e 4(15,8%) com 5 incompatibilidades. No grupo B, se observam 7(50%) com 4 incompatibilidades entre doador e receptor, 4 (28,6%) com 3 incompatibilidades entre doador e receptor e 3(21,4%) com 5 incompatibilidades entre doador e receptor.

Tabela 5- Distribuição dos pacientes nos grupos com (A) e sem (B) complicações clínicas após o transplante renal, de acordo com o nível de incompatibilidade HLA entre receptor e doador

Nível de Incompatibilidades HLA-A, B e DRB1		Grupo A (Com complicações) (N= 26)	Grupo B (Sem complicações) (N= 14)
Lócus HLA-A	0/2	0	0
	1/2	9	7
	2/2	17	7
Lócus HLA-B	0/2	1	0
	1/2	11	9
	2/2	14	5
Lócus HLA-DRB1	0/2	11	4
	1/2	11	8
	2/2	4	2
Total	0/6	0	0
	1/6	0	0
	2/6	0	0
	3/6	7	4
	4/6	15	7
	5/6	4	3
	6/6	0	0

Teste de Fisher $p \leq 0,05$

Na figura 6, se observa que no grupo A dos pacientes com rejeição, 15 (57,7%) pacientes apresentam 4 incompatibilidades entre doador e receptor, 7(26,9%) com 3 incompatibilidades entre doador e receptor.; 4(15,4%) com 5 incompatibilidades entre doador e receptor.. No grupo B, se observa 7(50%) com 4 incompatibilidades entre doador e receptor; 4(28,6%) com 3 incompatibilidades entre doador e receptor e 3(21,4%) com 5 incompatibilidades entre doador e receptor.

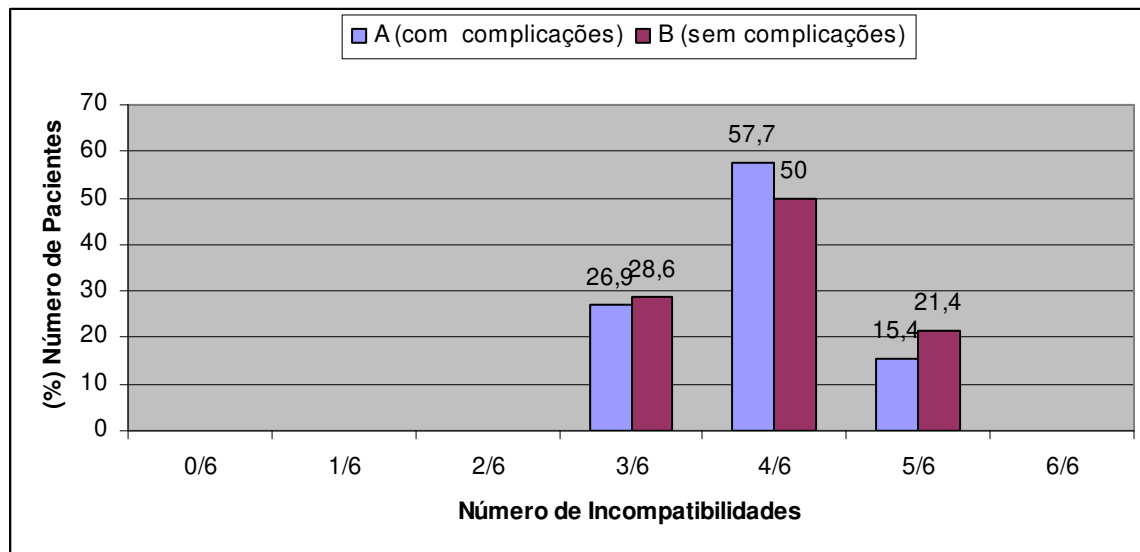


Figura 6- Distribuição dos receptores de enxerto de rim cadavérico com (A) e sem (B) episódios de rejeição, de acordo com o número de incompatibilidades no HLA-A, -B e -DRB1.

5.3- Caracterização histológica da biópsia do enxerto renal e classificação do tipo de rejeição, segundo o critério proposto por Banff 97

A classificação do tipo de rejeição, de acordo com a análise histológica das biópsias do enxerto renal, seguiu os critérios de Banff definidos em 1997 [Racusen, et al., 1999].

Vinte e seis (26) pacientes pertencentes ao grupo A, isto é, aqueles com complicações clínicas após o transplante, com sintomatologia de rejeição aguda ou crônica foram submetidos à biópsia do enxerto. A descrição histológica renal e o tipo de rejeição de cada paciente está apresentada no anexo 8.

Foram analisadas 25 (96,2%) biópsias dos pacientes que apresentaram algum tipo de rejeição do grupo A, podendo ser aguda ou crônica; destes, 4(15,4%) pacientes apresentaram suspeita do início de rejeição aguda (Borderline), sendo que todos eles progrediram para rejeição aguda; 5(19,2%) dos pacientes desenvolveram rejeição aguda do tipo IA com característica de infiltração intersticial associada a uma tubulite moderada com

a presença de mais de quatro células mononucleadas, todas elas associadas com necrose tubular aguda; 7(26,9%) pacientes desenvolveram rejeição aguda do tipo IIA caracterizada pelo acometimento moderado da íntima destas pacientes 3 associados com necrose tubular aguda; e 2(7,7%) pacientes com uma rejeição aguda do tipo III caracterizada pela arterite transmural acompanhada de uma arterite fibrinóide, sendo só 1(3,8%) associado com necrose tubular aguda; 7(26,9%) pacientes com necrose tubular aguda e observando-se 1(3,8%) paciente com necrose cortical. O número de perdas do enxerto foi 7(26,9%) no grupo A, com 2(7,7%) pacientes com óbito.

Tabela 6- Biópsias descritivas dos pacientes do grupo A

Pacientes (Grupo A)	Borderline	Rejeição Aguda	Necrose Tubular Aguda	Rejeição Crônica	Outros
A1		III	+		
A2			+		
A3			+		
A4	+	IIA			
A5		IA	+		
A6		IA	+		
A7		IA	+		
A8		IA	+		
A9			+		
A10			+		
A11		IIA			POLIOMA
A12			+		
A13		IIA	+		
A14					POLIOMA
A15		IIA			
A16		IA	+		
A17			+		
A18	+				
A19		IIA	+		
A20	+		+		
A21	+				
A22		IIA			
A23		IIA	+		
A24		III			
A25				NC	

NC Necrose Cortical

5.4- Pesquisa de anticorpos anti-HLA classe I e II no soro de pacientes submetidos ao transplante de rim cadavérico

No período anterior próximo ao transplante, o nível de sensibilização aos antígenos HLA (% PRA) no grupo A foi menor a 10% em todos os receptores do grupo B foi zero.

Após o transplante, foram detectados anticorpos anti-HLA em apenas três pacientes (7,5% dos 40), números A24, A25 e A26 (Anexo 5). Sendo que o paciente A25 acabou perdendo o enxerto. Os níveis de sensibilização (%PRA) para a classe I foram respectivamente, 21%, 17% e 39% e para a classe II foram respectivamente, 8%, 75% e 0%. Em todos os três casos, as especificidades dos anticorpos eram direcionadas aos antígenos classe I do doador (casos A24,A25 e A26), ou classe II (casos A24 e A25) ou ambos (caso A24 e A25). Deve-se ressaltar que o paciente número A26 era um caso de re-transplante. O alto nível de reatividade observada nos pacientes números A24 A25 e A26 é devido à capacidade do anticorpo do soro do receptor detectar outros antígenos HLA, que reagem de maneira cruzada com os antígenos do doador. A tabela 7 mostra as tipagens HLA dos receptor e doadores e o nível de reatividade contra painel de antígenos HLA das amostras de soro dos receptores que apresentaram complicações no período pós-transplante (grupo A) obtidas por ocasião da prova cruzada pré-transplante nos períodos 1 a 30 e 31 a 60 dias após o transplante, bem como, em caso de reatividade, as especificidades dos anticorpos.

O paciente A24, encontram-se anticorpos interligados, pertencentes ao grupo BW6(B7,B60,B64,B81), junto com o grupo DR52 (DR13,DR17) da classe II, não mostrando reação cruzada entre o receptor e o doador. No paciente A25, a presença dos anticorpos interligados pertencentes ao grupo DR52 (DR18,DR14,DR17,DR13) mostram a reação cruzada entre DR53 do receptor com o DR4 do doador dos antígenos da classe II. No paciente A26, se observou a presença do grupo A2 que mostra uma reação cruzada com o antígeno B57 do doador, da classe I.

Tabela 7- Nível de sensibilização aos antígenos HLA (% PRA*), nos períodos pré e pós-transplante com rim de doador cadavérico, em pacientes com complicações (grupo A) no período pós-transplante.

Caso	Tipagem HLA-A, B,DR	Período Correspondente à Amostra de Soro Avaliada					
		Pré-Transplante		1 a 30 dias Pós-Transplante		31 a 60 dias Pós-Transplante	
		PRA*	Especificidades	PRA	Especificidades	PRA	Especificidades
01	¹ R: A2,32;B49,53; DR4,13	I: 0%		I: 0%		I:	
02	² D: A3,24; B-,49; DR-,13	II: 0%		II: 0%		II:	
	R: A29,31B-,44,DR4,7	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A3,68,B49,61,DR4,7	II: 0%		II: 0%		II:	
03	R: A3,26;B49,72;DR4,6	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A3,24;B49,-;DR13,-	II: 0%		II: 0%		II:	
04	R: A3,69;B-,1;DR1,11	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A24,25;B51,53;DR1,11	II: 0%		II: 0%		II:	
05	R: A3,31;B38,40;DR4,-	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A3,11;B40,55;DR4,13	II: 0%		II: 0%		II:	
06	R: A30,33;B14,53;DR1,16	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A2,33;B7,14;DR1,15	II: 0%		II: 0%		II:	
07	R: A3,33;B7,14;DR1,65	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A23,68;B14,39;DR1,-	II: 0%		II: 0%		II:	
08	R: A2,68;B39,53;DR8,13	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A23,33;B44,53;DR4,8	II: 0%		II: 0%		II:	
09	R: A29,31;B35,44;DR7,4	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A11,23;B35,58;DR7,14	II: 0%		II: 0%		II:	
10	R: A1,-;B3,44;DR-,13	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A24,26;B7,44;DR3,4	II: 0%		II: 0%		II:	
11	R: A24,32;B35,38;DR3,4	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A1,3;B18,44;DR3,4	II: 0%		II: 0%		II:	
12	R: A23,33;B42,45;DR3,7	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A2,31;B4,51;DR4,7	II: 0%		II: 0%		II:	
13	R: A2,74;B14,49;DR1,11	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A24,25;B51,53;DR1,11	II: 0%		II: 0%		II:	
14	R: A26,30;B45,51;DR1,7	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A2,29;B44,53;DR1,7	II: 0%		II: 0%		II:	
15	R: A3,23;B37,49;DR1,7	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A2,29;B44,53;DR1,7	II: 0%		II: 0%		II:	
16	R: A24,33;B40,44;DR4,13	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A3,68;B18,40;DR13,-	II: 0%		II: 0%		II:	
17	R: A1,31;B8,51;DR3,8	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A2,11;B8,35;DR3,7	II: 0%		II: 0%		II:	
18	R: A1,2;B7,38;DR11,15	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A2,33;B7,14;DR1,15	II: 0%		II: 0%		II:	
19	R: A3,68;B7,58;DR1,13	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A2,3;B27,40;DR1,13	II: 0%		II: 0%		II:	
20	R: A2,-;B39,50;DR8,13	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A2,24;B5,39;DR7,-	II: 0%		II: 0%		II:	
21	R: A1,2;B8,51;DR3,13	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A1,3;B7,49;DR-,13	II: 0%		II: 0%		II:	
22	R: A2,29;B45,58;DR7,13	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A2,24;B5,39;DR-,7	II: 0%		II: 0%		II:	
23	R: A24,68;B15,51;DR11,15	I: 0%		I: 0%		I:	
	D: A2,33;B15,51;DR8,15	II: 0%		II: 0%		II:	
24	R: A1,2;B42,57;DR15,13	I: 0%		I: 0%		I:	AntiCREG-BW6
	D: A2,11;B49,51;DR7,15	II: 0%		II: 0%		II:	AntiCREG-DR52
25	R: A3,24;B14,15;DR4,8	I: 0%		I:	Anti-A2	I:	
	D: A31,68;B35,-;DR4,8	II: 0%		II:	AntiCREG-DR52	II:	
26	R: A23,74;B45,35;DR1,13	I: 0%		I:	Anti-A2	I:	
	D: A1,11;B35,57;DR1,13	II: 0%		II: 0	0	II:	

*PRA, do inglês, *Panel Reactive Antibody* = percentagem de antígenos HLA, representados no painel, para os quais a amostra de soro se mostra reativa: PRA-I= nível de reatividade contra antígenos HLA classe I e PRA-II= nível de reatividade contra antígenos HLA classe II; ¹R= tipagem HLA do receptor; ²D= tipagem HLA do doador; ³CREG, do inglês, *Cross Reaction Group* = Grupo de Antígenos com Reação Cruzada.

Assim, dentre os 26 casos com complicação no pós-transplante (grupo A), apenas em 3 (11,6%) esta pode ser atribuída ao desenvolvimento de anticorpos anti-HLA. A análise histológica das biópsias corrobora com este achado, tendo em visto que nos três casos foi observada lesão da vasculatura.

As amostras de soro escolhidas para a pesquisa de anticorpos anti-HLA após o transplante foram coletadas em dois intervalos, sendo o primeiro compreendido entre 1 e 30 dias e o segundo entre 31 e 60 dias, períodos estes que coincidiam com o aumento da creatinina sérica, observado na maioria dos casos com má evolução do enxerto.

Nos pacientes A25 e A26, a presença de anticorpos anti-HLA foi detectada nas amostras de soro correspondentes, respectivamente, aos 16 e 28 dias do transplante quando os níveis de creatinina plasmática estavam em 13,8 mg/dL e 12,5 mg/dL respectivamente. Destes dois pacientes, apenas o A25 teve a biópsia analisada e esta revelou tratar-se de necrose cortical, segundo a classificação de Banff -97. O terceiro caso A24, em que também foi detectado o desenvolvimento de anticorpos anti-HLA, estes surgiram mais tardiamente, associado à amostra de soro equivalente ao 46 dia depois do transplante, quando o nível de creatinina plasmática estava em 15,5 mg/dL e a análise histológica da biópsia revelou uma rejeição aguda do tipo III (arterite transmural), sendo considerada como uma rejeição aguda tardia.

No restante dos pacientes do grupo A (com complicações) e que não desenvolveram anticorpos, os níveis de creatinina aumentaram e foram tratados com protocolos de imunossupressão baseado em CYA e FK506 e MMF. Todos eles foram acompanhados até o dia 60 pós-transplante. No grupo B (sem complicações), os níveis de creatinina que eram altos foram diminuindo gradualmente até serem estáveis mostrando uma boa progressão do transplante. Todos estes dados dos níveis de creatinina dos 40 pacientes se encontram resumidos no anexo 8.

6- DISCUSSÃO

O presente estudo nasceu da necessidade de saber se seriam os anticorpos anti-HLA que provocariam crises de rejeição no período pós-transplante. O método imunoenzimático ELISA, junto com outros métodos, detecta a prevalência dos anticorpos HLA presentes no período pré e pós-transplante [McKENNA et al, 2000].

Nossos dados encontrados neste estudo contrastam com os de Supon et al.(2001) e Costa et al. (1997), que também utilizaram ELISA como técnica para a detecção destes anticorpos. O método imunoenzimático ELISA, utilizado neste estudo para detectar a prevalência dos anticorpos anti-HLA, tem relevância clínica no percurso do período pré e pós-transplante, a qual não deve ser ignorada, para o bom sucesso do transplante[KOZMA, 2007].

A compatibilidade dos principais antígenos do sistema HLA entre o receptor e doador que realizam transplante, muitas vezes não é suficiente para evitar o problema de rejeição do enxerto. Neste estudo, o levantamento das discrepâncias dos antígenos HLA referentes aos *locus* HLA-A, HLA-B e HLA-DR entre os receptor e doador demonstraram que, as discrepâncias são maiores no *locus* HLA-A, seguida do *locus* HLA-B e observando-se um significativo grau de compartilhamento no *locus* HLA-DR, nos pacientes do grupo A (com complicações). Enquanto no grupo B, (sem complicações) observou discrepâncias parecidas ao grupo A. Alguns autores reportaram que o grau de compartilhamento de antígenos HLA pode também estar envolvido com o desenvolvimento da rejeição [HENE, et al, 2007].

No presente estudo, os níveis de incompatibilidade dos antígenos HLA entre doador e receptor variam de 0 a 6, e foram comparados entre os dois grupos com e sem complicações, observando-se uma diferença entre eles. No grupo A (com complicações) a maior frequência é com 4 incompatibilidades, seguida de 3 incompatibilidades. Contudo, uma análise mais detalhada das incompatibilidades revelou que, nas primeiras semanas de pós-transplante há uma tendência à diminuição da sobrevida do enxerto [OPELZ et al., 1999].

Previos estudos têm elucidado e analisado a ação das transfusões sanguíneas em receptores e têm mostrado a correlação entre as transfusões e a sobrevida do enxerto [PERSIJN, et al.,1977; TERASAKI,et al., 1991; ZHOU, et al., 1991; HIESSE, et al., 2001;

USTA, et al., 2002; LEZAIC, et al., 2002]. No presente estudo, o levantamento do número de transfusões sangüíneas prévias ao transplante no grupo A (com complicações) foi de 42,3% nos pacientes que receberam mais de 5 transfusões, 15,4% sem nenhuma transfusão e no grupo B (sem complicações) nenhum caso com mais de 5 transfusões e 57,1% com nenhuma transfusão. Certamente o maior número de transfusões sangüíneas recebidas pelos receptores representou a menor probabilidade de uma boa evolução do enxerto [TERASAKI, et al, 1991].

No estudo, a análise histológica das biópsias do enxerto renal seguiu os critérios Banff definidos em 1997. Vinte e seis (26) pacientes do grupo A (com complicações) apresentaram rejeição aguda associada à necrose tubular aguda. Uma explicação seria a produção de citocinas que levam à citotoxicidade celular, associada ao dano citolítico devido a ativação de mediadores inflamatórios [KALIL, et al 2003].

Rejeição aguda tem sido reportada em receptores de transplante renal após transplante [HUANG, et al.,2004; CANTAROVICH, et al., 2004; PAWLIK, et al., 2005; MORRISSEY, et al., 2005; SURESHKUMAR, et al., 2007; LERUT, et al., 2007; SLATINSKA,et al.,2007; SUZUKI, et al.,2005]. Neste estudo, a rejeição aguda foi associada a perda do enxerto, com 5 pacientes do grupo com complicações.

A rejeição aguda diminuiu muito nos últimos anos (GJERTSON et al., 2000), diminuindo de forma significativa a perda do enxerto (MEIER-KRRIESCHE et al., 2000). Apesar disso continua a ser um dos problemas mais complexos em transplante renal. Apesar do pequeno número de pacientes deste estudo, se conseguiu demonstrar a presença de anticorpos anti-HLA nos períodos pré e pós-transplante. Existem indícios de uma alta percentagem de risco para desenvolverem uma rejeição aguda e posterior perda de enxerto nos pacientes que desenvolvem anticorpos anti-HLA e MICA no período pós-transplante [PANIGRAHI, et al., 2007] e anticorpos anti-HLA da classe II e I como fator de risco na falha do enxerto renal [CAMPOS, et al.,2006; MAO, et al., 2007]. Estudos recentes mostram que pacientes com anticorpos anti-HLA classe I e níveis de PRA maiores a 10% têm alto risco de apresentar rejeições agudas ou crônicas ou um incremento na reatividade no período pós-transplante. A presença de anticorpos anti-HLA classe I é relatada a ineficiência de terapia ou disfunção do enxerto [MONTEIRO et al.,1997].

Neste estudo, se encontraram três pacientes com anticorpos anti-HLA da classe I e dois pacientes com anticorpos anti-HLA da classe II.

O PRA mostram o grau de reatividade do paciente. A relação entre os níveis do PRA no período pré e a resposta no período pós-transplante está diretamente ligada com a sobrevida do enxerto. Em pacientes hipersensibilizados, a possibilidade de produzir anticorpos anti-HLA contra os antígenos do doador é considerável [SINGH, et al., 2003]. Entretanto, neste estudo, os níveis de PRA encontrados no período pré-transplante foram zero em todos os pacientes do grupo A (com complicações) e, no período pós-transplante, estes níveis foram incrementados nos três pacientes com anticorpos anti-HLA. O paciente A24 com 21% para a classe I e 8% para a classe II. O paciente A25 com 17% para a classe I e 75% para a classe II e o paciente A26 com somente 39% para a classe I. É importante ressaltar que o paciente A25 perdeu o enxerto depois de 16 dias transcorrido o transplante. Uma explicação para este fato poderia ser a presença destes anticorpos anti-HLA da classe II, fator de risco para a perda do enxerto [CAMPOS, et al., 2006].

Neste estudo, a presença destes anticorpos oferecem os primeiros indícios de reações cruzadas entre receptores e doadores que levariam a uma possível rejeição do enxerto. No paciente A26, a presença de anticorpos interligados que formam parte de um mesmo grupo GREG A2, tem uma reação cruzada com um anticorpo do doador B57. E podem ser controlados pelos protocolos de imunossupressão. Além disto, o risco para a aparição de rejeição foi maior por ser um paciente que teve um transplante prévio [KERMAN et al., 1996; LIEBER et al., 1992]. No paciente A25 se reconhecem a presença de anticorpos pertencentes aos grupos DR53 e DR52. O DR53 tem reação cruzada com DR4 do doador, sendo estes antígenos da Classe II os principais responsáveis da rejeição. No caso estes antígenos não puderam ser controlados pela terapia imunossupressora, levando a perda do enxerto.

No paciente A24 foram encontrados os grupos BW6 e DR52, sem reação cruzada entre o doador e os anticorpos atuais do receptor, controladas pela imunossupressão [FERNANDEZ-FRESNEDO et al., 1999].

Os soros com anticorpos anti-HLA do períodos pós-transplante são específicas, podendo haver a ativação policlonal durante algum processo inflamatório, observado pelo aumento de PRA .[SUMITRAN-HOLGERSSON et al., 2001, LIEBER S R, PEREZ F V T, et al., 2007, SLAVCEV A et al., 2004, CAMPOS E F, et al, 2006]. Este fato ocorreu no paciente A24 com 21% para a classe I e 8% para a classe II, no paciente A25 com 17% para a classe I e 75% para a classe II e o paciente A 26 com 39% para a classe I

A classificação Banff (1997) padroniza a interpretação das biópsias dos enxertos, servindo como guia para a terapia imunossupressora. Dentre os 40 pacientes estudados, no presente trabalho, 7(17,5%) acabaram perdendo o enxerto e destes, em 5(12,5%) a perda foi associada à rejeição aguda. As demais perdas foram devidas a outras complicações. [GEORGESCU, et al., 2007].

Concluindo nosso estudo a relação entre a detecção de anticorpos anti-HLA gerados após o transplante sua avaliação foi prejudicada pelo pequeno número de pacientes inseridos no estudo, apenas 3 pacientes (7,5%) do grupo total apresentaram o desenvolvimento destes anticorpos.

7- CONCLUSÕES

- Em relação a presença de anticorpos anti-HLA gerados após o transplante renal, sua avaliação foi prejudicada pelo pequeno número de pacientes inseridos no estudo.

Apenas 3 pacientes (7,5% do grupo total, ou 11,5% dos pacientes com complicações) apresentaram o desenvolvimento destes anticorpos;

- 4/6 antígenos HLA (57,7%) foram encontrados nos pacientes do grupo com complicações;
- O número de rejeições foi de 26 (65,0%) sendo que 7 (17,5%) perderam o enxerto;
- No período pré-transplante não houve a detecção de anticorpos anti-HLA da Classe I e da Classe II, e no período pós-transplante 3 pacientes (7,5%) todos da Classe I e 2 da Classe II, foram detectados.
- Em relação a correlação de especificidades dos anticorpos anti-HLA do doador e do receptor, 3 pacientes apresentaram tal correlação, sendo que no paciente A24 foi 21 para a Classe I e 8% para a Classe II, no paciente A25 foi 17% para a Classe I e 75% para a Classe II e no paciente A26 somente 39% para a Classe I;
- Os pacientes com anticorpos anti-HLA apresentaram algum tipo de rejeição sendo que o padrão não foi homogêneo, sendo que o paciente A24 apresentou uma rejeição aguda do tipo III, no paciente A25 apresentou necrose cortical, e o paciente A26 não realizou a biopsia renal.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KISSMEYER-NIELSEN F.; OLSEN F.; PETERSEN, V.; FJELDBORG, O- Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells.- Lancet 2: 662-665, 1966.
2. KAHAN, B. D. Cyclosporine. N Engl J Med, v. 321, n. 25, p.1725-38, 1989.
3. KALIL,J;PANAJOTOPOULOS, Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroelétricos. Miguel Carlos Riella-Editora Guanabara.Koogan. 2003.
4. DANIEL P. STITES. Imunologia Medica.9na edição. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro 2000.
5. URS NYDEGGER,PAUL MOHACSI, SIMON KOESTNER, ANDRÉAS KAPPELER, THOMAS SCHAFFNER, THIERRY CARREL. ABO histo-blood group system-incompatible allografting.- International Immunopharmacology 5(2005) 147-153.
6. TROWSDALE, J.; CAMPEBELL, R.D.-The 12th International MHC map.- In: Charron, D.(ed)-Genetic diversity of HLA Funcional and Medical Implication – Vol 1 – EDK – Medical and Scientific International Publisher, Paris – 1997.p.499-504.
7. SACHS, D.H. The major histocompatibility complex. In: Paul, W. E., Ed. Immunology. New York, Raven, 1984.
8. ZINKERNAGEL, R. M.; DOHERTY, P.C.MHC Restricted citotoxic T cell studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T cell restriction specificity, function and responsiveness. Adv Immunol, 27: 51-177, 1979.
9. NEPOM, B.S & NEPOM, G.T., - Polyglot and polymorphism – Na HLA update – Arthritis & Rheumatism 38 (12):1715-1721, 1995.
10. MARLIES K.A. DANKERS, DAVE L. ROELEN, NICO J.D. NAGELKERKE, PETER DE LANGE, GUIDO G. PERSIJIN, ILIAS I.N. DOXIADIS, AND FRANS H.J. CLAAS.- The HLA-DR Phenotype of the Responder is Predictive of Humoral Response Against HLA Class I Antigens.- Human Immunology 65,13-19. 2004.

11. OPELZ G; GRAVER, B.; MICKEY M.R.; TERASAKI, P.I.- Lymphocytotoxic antibody responses to transfusions in potential kidney transplant recipients.- Transplantation, 32(3): 177-183, 1981.
12. L.E.MORALES-BUENROSTRO,J.M.BUZO-ROMERO, C. DE LEO, M LOPEZ, V. M. ORTIZ-ARROYO,J.PEREZ-GARRIDO,C.HERRERA-GARCIA,J. GRANADOS, AND J. ALBERÚ.- Prevalence of HLA Antibodies and Its Impact on Graft Function in a Group of Kidney Transplant Recipients: A Cross-Sectional Study.- Transplantation Proceedings, 38, 899-902,2006.
13. D.SINGH, B.^a KIBERD, K.^a WEST, K. KAMAL,F. BALBONTIN, P.BELITSKY, AND J.LAWEN.-Importance of Peak PRA in Predicting the Kidney Transplant Survival in Highly Sensitized Patients.-Transplantation Proceedings, 35, 2395-2397.2003.
14. K.W.LEE, S.J.KIM, D.S.LEE, J.W. JOH, S.K.LEE, H.Y.OH.D. J. KIM, Y.G. KIM, W.S.HUH, W.I.OH, AND B.B. LEE.- Effect of Panel-Reactive Antibody Positivity on Graft Rejection Before or After Kidney Transplantation.-Transplantation Proceedings, 36, 2009-2010. 2004.
15. HOPKINS, K. A., The basic lymphocyte microcytotoxicity test. In: Zachary, A A ., Teresi, G T. Eds. The ASHI Laboratory Manual, 2^a ed. Lenexa, Ks The American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 195: 1990).
16. AMOST, D B.; BASHIR, H.; BOYLE, W. MAC QUEEN, J.M. TILIKAINEN, A Simple Microcytotoxicity Test.- Transplantation 1969, 7: 220.In: Zachary,A A; Klingman, L.; Thone, N.; et al.- Variations of the lymphocytotoxicity test- Transplantation, 60(5): 489-503, 1995
17. JOHNSON, AH.; ROSSEN, R.D., BUTLER, W. T. – Detection of alloantibodies using a sensitive antiglobulin microcytotoxicity test: identification of low levels of preformed antibodies in accelerated allograft rejection.- Tissue Antigens – 2:215-220, 1972.
18. GAROVOY M.R., RHEINSCHMIDT A.;BIGOS, M.;PERKINS, H., COLOMBR, B.; FEDUSKA, N.;SALVATIERRA, O;-Flow cytometry analysis: a high technology

- crossmatch technique facilitating transplantation.- Transplant. Proc. 15:1939-1943, 1983.
19. LIEBER,S.R.;GERBASE DE LIMA,M; PERSOLI,L.B.; PEDRO,F.; SETTA, J.H.; MONTANHA, W.& PESTANA, J.º.- Lymphocytotoxic antibodies in 1500 potencial first kidney transplant recipients.- Transplant. Proc. 24(6): 3072-3073,1992.
 20. L.KHODADADI, M. ADIB, AND A POURAZAR.- Immunoglobulin Class (IgG,IgM) Determination by Dithiothreitol in Sensitized Kidney Transplant Candidates.-) Transplant. Proc., 38, 2813-2815, 2006.
 21. ZACHARY, AA.; GRIFFIN, J.; LUCAS, D.P.; HART, J.M.LEFFELL,M.S.- Evaluation of HLA Antibodies wiht ter PRA-Stat test- Transplatation, 60(12): 1600-1606,1995.
 22. NEHLSSEN-CANNARELLA, S.L.; BUCKERT, L.; FAGOADO,O FOLZ, J.,GRINGLE,S.;HISEY,C.; SCHMITT,R.; ZAPPPIA.J.- Assessment of there methodos of evaluating solubre class I HLA molecules in cell culture supernatans and serum sample from the second international worshop on soluble human leukocyte antigens- Hum. Immunol. 40: 210-217, 1994.
 23. SUPON P,;CONSTANTINO D.; HAO P.; HAHN A,;CONTI DJ.AND Freed B.M.- Prevalence of donor-specific anti-HLA antibodies during episodes of renal allograft rejection.-Transplantation: 27; 71-(4): 577- 580. 2001.
 24. GEMA FERNÁNDEZ-FRESNEDO, JOSE MANUEL PASTOR,MARCOS LOPEZ-HOYOSA, JUAN CARLOS RUIZI, JUAN ANTONIO ZUBUMENDIU, JULIO GONZALEZ-COTORRUELO, EMILIO RODRIGO, ANGEL L.M. DE FRANCISCO AND MANUEL ARIAS.-Relationship of fonor-specific classI anti class-HLA antibodies detected by ELISA after kidney transplantation on the development of acute rejection and graft survival.- Nephrol Dial Transplant 18:990-995, 2003.
 25. PAUL I TERASAKI AND JUNCHAO CAI: Humoral Theory of transplantation: further evidence. Current Opinion in Immunology. 17:541-545, 2005.

26. CAI J, TERASAKI PI: Humoral theory of trasnplantation-Mechanism, prevention, and treatment. Hum Immunol. 66:334-342, 2005.
27. LORRAINE C RACUSEN, KIM SOLEZ, ROBERT B COLVIN, STEPHEN M BONSIB, MARIA C CASTRO, TITO CAVALLO, BYRON P CROKER, A JAKE DEMETRIS, CYNTHIA B DRACHENBERG, AGNES B FOGO, PETER FURNESS, LILLIAN W GABER, IAN W GIBSON, DENNIS GLOTZ, JULIO C GOLDBERG, JOSEPH GRANDE, PHILIP F HALLORAN, H E HANSEN, BARRY HARTLEY, PEKKA J HAYRY, CLAIRE M HILL, ERNESTO O HOFFMAN, LAWRENCE G HUNSICKER, ANNE S LINDBLAD, NIELS MARCUSSEN, MICHAEL J MIHATSCH, TIBOR NADASDY, PETER NICKERSON, T STEENOLSEN, JOHN C PAPADIMITRIOU, PARMJEET S RANDHAWA, DAVID C RAYNER, IAN ROBERTS, STEPHEN ROSE, DAVID RUSH, LUIS SALINAS-MADRIGAL, DANIEL R SALOMON, STALE SUND, EERO TASKINEN, KIRIL TRPKOV AND YUTAKA YAMAGUCHI.-The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. Kidney International 55, 713–723. 1999.
28. LOPEZ- HOYOS M., FERNANDEZ- FRESNEDO G., PASTOR IM., ARIAS M.- Anti HLA post- transplant antibodies. A new method of monitorization. Nefrology 24(Sup 4): 62-66. 2004.
29. WANG, G, TARSITANI,C, TAKEMURA,S,PEI,R,LIU,AN,LEE,JH,ELISA .- Detection of specific antibody to HLA Class I antigens in transplant patients with panel reative antibody(PRA) by a leucocyte antigen tray (LAT). In: Proceedings of the 12th International Histocompatibility Conference. Human Immunol. 47(1-2):133.1996.
30. WANG, G, TARSITANI, C, DENHAM, S, CHEN, M, LEE, J-H. A new micro- Elisa for anti-Class I and Class II antibody detection. Human Immunol. 59(1): 133, 1998.
31. COOK, DJ, TERASAKI, PI, IWAKI, Y, TERASHITA, GY, LAU, M. An approach to reducing early kidney transplant failure by flow cytometry crossmatching. Clin Transplant. 1:252, 1987.

32. KARRUPPAN, SS, OHLMAN, S, MOLLER, E. The occurrence of cytotoxic and non-complement fixing antibodies in the crossmatch serum of patients with early rejection episodes. *Transplantation* 54:839, 1992.
33. CHAPMAN, JR, TAYLOR, C, TING, A, MORRIS, PJ. Immunoglobulin class specificity of antibodies causing positive T cell crossmatches: relationships to renal transplant outcome. *Transplantation* 42: 608, 1986.
34. IWAKI, Y, LAU. M, TERASAKI, P. Successful transplantation across T warn-positive crossmatches due to IgM antibodies. *Clin. Transplant* 2:81.1988.
35. RUDY, T, OPELEZ, G. Ditrithreitol treatment of crossmatch sera in highly immunized transplant recipients. *Transplant. Proc.* 19:800, 1897.
36. KERMAN, RH, KIMBALL, PM, VAN BUREN, CT, LEWIS, RM, DE VERA,V,BOGHDAHSARIAN, V, HEYDARI, A, KAHAN, BD. AHG and DTE/AHG procedure identification of crossmatching- appropriate donor-recipient pairings that result in improved graft survival. *Transplantation* 51: 316, 1991.
37. KAO, KJ, SCORNIK, J, SMALL, S,J. Enzyme-Linked immunoassay for anti-HLA antibodies: an alternative to panel studies by lymphocytotoxicity. *Transplantation* 55: 192, 1993.
38. HAMBURGER, J.; CROSNIER, J.; BACH, J. - Results of kidney transplantation in man. In: HAMBURGER, J.; CROSNIER, J.; DORMONT, J; BACK, J.E. - Renal transplantation: theory and practice. Baltimore, Williams & Wilkins, 1972. p.203-62.
39. MERRIL, J.P.; MURRAY, J.E.; TAKACS, F.J.; HAGER, E.D.; WILSON, R.E.; DAMMIN, G.J. - Successful transplantation of kidney from a human cadaver. *JAMA*, 185:347-53, 1963.
40. MURRAY, J.E.; MERRILL, J.P.; HARRISSON, J.H. - Kidney transplantation between seven pairs of identical twins. *Ann. Surg.*, 148: 343-59, 1958.
41. SAYEGH, M.H.; WATSHINGER, B., CARPETER, C.B. Mechanism of T cell recognition of alloantigen. The role of peptides. *Transplantation*, Baltimore, v 57.p 1295-1302, 1994.

42. LARSEN, C.P., MORRIS, P.J.;AUSTYN, J. M. Migration of dendric leucocytes from cardiac allografts into hosp spleen. A novel pathway for inhibition of rejection . Journal of Experimental Medicine. Betesda v. 171,p. 307-314, 1990.
43. ZANE, H.D. Imunology. Theoretical & Practical concepts in laboratory medicine. Saunders, New York, p. 131-143, 2001.
44. PEETERS P, TERRY W, VANHOLDER R, LAMEIRE N: Delayed graft function in renal transplantation. Curr Opin Crit Care, 10:489-498, 2004.
45. SLAVCEV A, LACHA J, SAJDLOVA H, VITKO S, VALHOVA S, STRIZ I, IVASKOVA E., Ann Transplant.;9(3):44-7, 2004
46. LOPEZ-HOYOS M, FERNANDEZ-FRESNEDO G, PASTOR JM, ARIAS M,. Anti HLA post-transplant antibodies. A new method of monitorization. Nefrologia.;24 Suppl 4:62-6, 2004.
47. E.F.CAMPOS, H, TEDESCO SILVA, P.G. MACHADO, M. FRANCO, J.O. MEDINA-PESTANA AND M. GERBASE-DE LIMA. Post-transplant Anti-HLA Class II antibodies risk factor late kidney allograft failure. Am. J. Transplantation 6: 2316-2320, 2006.
48. FRANCESCA CARDARELLI, MANUEL PASCUAL, NINA TOLKOFF-RUBIN, FRANCIS L. DELMONICO, WAICHI WONG, DAVID A, SCHOENFELD, HUI ZHANG, A. BENEDIT COSIMI, AND SUSAN L. SAIDMAN. Prevalence and significance of anti-HLA and donor specific antibodies long-term after renal transplantation. Transplant International 18 532-530, 2005.
49. ARUNDHATI PANIGRAHI, NIVEDITA GUPTA, JAMSHAD A. SIDDIQUI, AHMAD MARGOUB, DIPANKAR BHOKMIK, SANDEEP GULERIA AND NARINDER K. MEHRA. Post Transplant Development of MICA and Anti-HLA antibodies is associated with acute rejection episodes and renal allograft loss. Human Immunologic 68, 362-367, 2007.

50. OPELZ G, WUJCIAK T, DÖHLER B, SCHERER S, MYTILINEOS J. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study, Rev Immunogenet.;1(3):334-42, 1999.
51. HARRISON CA, BASTAN R, PEIRCE MJ, MUNDAY MR, PEACHELL PT. Role of calcineurin in the regulation of human lung mast cell and basophil function by cyclosporine and FK506. Br J Pharmacol. eb;150(4):509-18. Epub 2007 Jan 2, 2007
52. DAUSSET, J.-HLA Complexe Majeur D'hitocompatinilité de L'Homme. Dausset J.& Pla, M. (ed), Flammarion Médecine Sciences.,589pp, 1989.
53. TERASAKI, PI, CECLA JM, CHO, Y TAKEMOTO, MICHEY MR. A report from the UNOS Scientific Renal Transplant Registry. Trasnplant. Proc.Feb 23(1Pt1):53-4,1999.
54. SALVATIERRA, O, AMEND W, VICENTI, F,POTTER D, IWAKI, OPELZ, G, Pretreatment with donor-specific blood transfusions in related recipients with high MLC. Transplant Proc;13:142-9, 198.
55. ANDERSON C, SICARD G, ETHEREDGE E. PRETREATMENT OF RENAL ALLOGRAFT RECIPIENTS WITH AZATHIOPRINE AND DONOR-SPECIFIC BLOOD PRODUCTS. SURGERY. 1982; 92: 315-321 / WHELCHER J, SHAW J, CURTISS J. Effect of pretransplant stored donor-specific blood transfusions on early renal allograft survival in one haplotype living related transplants. Transplantation.; 34: 326-8, 1982.
56. HIESSE C, LANG P. Transfusion protocols prior to renal transplantation: Questionnaire on current attitudes at frenchcenters. Transplant Proc.; 27: 2454-55, 1995
57. LIEBER SR; GERBASE-LIMA, M; PERSOLI LBL; PEDRO FILHO F; SETTA JH; MONTAGNA W. Lymphocytotoxic antibodies in 1500 potential first kidney transplant recipients. Transplantation Proceedings, , v. 24, p. 3072-3073, 1992
58. LIEBER SOFIA ROCHA, PERSOLI LIGIA BEATRIZ LOPES, MARQUES, SILVIA BARBOSA DUTRA, PELLEGRINO JR, J. Blood Transfusions and lymphocytotoxic antibodies in dialysis patients Revista Paulista de Medicina, vol 110(5): TM16, 1992

59. LIEBER SOFIA ROCHA, FANY VERONICA TICONA PEREZ, TABOSSI MARCIA REGINA, LIGIA BEATRIZ LOPEZ, SILVIA BARBOSA DUTRA MARQUES, MARILDA MAZZALI, GENTIL ALVES FILHO, CARMINO ANTONIO DE SOUZA. Effect of Panel-Reactive in Predicting Crossmatch Selection of Cadaveric Kidney Recipients. Transplantation Proceeding, 39, 429-431, 2007.
60. MARCELA DUARTE DE SILLOS ¹& ULYSSES FAGUNDES NETO, Figura do MHP, www.e-gastroped.com.br/jun05/ceciaca_antigen.htm. **(FIGURA 2)**
61. ADAM G. MCLEAN, DAVID HUGHES, KEN I. WELSH,. Patterns of Graft Infiltration and Cytokine Gene Expression During The First 10 days of Kidney Transplantaton. Translantation, 63 ; 374-380, 1997.
62. JAMES M. PATTISON; ALAN M. KRENSKY. New Insights Into Mechanism of Allograft Rejection. The American Journal of The Medical Sciences. V 313, p 257-263, 1997
63. JORGE KALIL, Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrolíticos", Editora Guanabara, Koogan – 2003
64. ROITT; BROSTOFF; Imunologia 4ª edição , 1997
65. RITA L. CARDONI, NORMA PRIGOSHIN, MONICA L. TAMBUTTI², JORGE R. FERRARIS. Citoquinas Reguladoras de la respuesta al trasplante renal alogénico, Medicina; 65: 54-62, 2005
66. ROBERT M.SADE.MD, Transplantation at 100 years: Alexis Carrel, Pioneer Surgeon. Ann Thorac Surg, Dec;8(60):2415-8, 2005
67. MEDAWAR PB, The novel lectures in Immunology. The Nobel Prize of Phisiology or Medicine, 1960.Immunological Tolerance.Scand J. Immunol.Apr,33(4):337-44,1991
68. MARCHAL G, DUHAMEL G, DAUSSET J, LIBESKIND. Apparence of a leuko-agglutinin during the couse of a case of Hodgkin'n disease. Semp Hop. Dec 10;30(78):4355-7,1954

69. MICKEY MR, LAU M, CARNAHAN B, CHO Y, Transplant Proc.,Feb;21(1 Pt 1):722-3, 1989
70. PERSIJN GG, VAN HOOFF JP, KALFF MW, LANSBERGEN Q, VAN ROOD JJ, Effect of blood transfusions and HLA matching on renal transplantation in the Netherlands, Transplant Proc. Mar;9(1):503-5., 1977
71. ZHOU YC, CECKA JM., Sensitization in renal transplantation, Clin Transpl. 1991;;313-23.
72. KERMAN RH, OROSZ CG, LORBER ML., Clinical relevance of anti-HLA antibodies pre and post transplant.,Am J Med Sci. 1997 May;313(5):275-8.
73. KAHAN BD., Cyclosporine.N Engl J Med. 1989 Dec 21;321(25):1725-38.
74. SAYEGH MH, WATSCHINGER B, CARPENTER CB., Mechanisms of T cell recognition of alloantigen. The role of peptides.Transplantation. 1994 May 15;57(9):1295-302.
75. LARSEN CP, AUSTYN JM, MORRIS PJ., The role of graft-derived dendritic leukocytes in the rejection of vascularized organ allografts. Recent findings on the migration and function of dendritic leukocytes after transplantation.Ann Surg. 1990 Sep;212(3):308-15; discussion 316-7.
76. HARRISON CA, BASTAN R, PEIRCE MJ, MUNDAY MR, PEACHELL PT., Role of calcineurin in the regulation of human lung mast cell and basophil function by cyclosporine and FK506.Br J Pharmacol. 2007 Feb;150(4):509-18.
77. CLAAS FH, WITVLIET MD, DUQUESNOY RJ, PERSIJN GG, DOXIADIS II., The acceptable mismatch program as a fast tool for highly sensitized patients awaiting a cadaveric kidney transplantation: short waiting time and excellent graft outcome.Transplantation. 2004 Jul 27;78(2):190-3
78. SINGH D, KIBERD BA, WEST KA, KAMAL K, BALBONTIN F, BELITSKY P, LAWEN J., Importance of peak PRA in predicting the kidney transplant survival in highly sensitized patients.Transplant Proc. 2003 Nov;35(7):2395-7.

79. CARDARELLI F, PASCUAL M, TOLKOFF-RUBIN N, DELMONICO FL, WONG W, SCHOENFELD DA, ZHANG H, COSIMI AB, SAIDMAN SL., Prevalence and significance of anti-HLA and donor-specific antibodies long-term after renal transplantation. *Transpl Int*. 2005 May;18(5):532-40.
80. PANIGRAHI A, DEKA R, BHOWMIK D, DASH SC, TIWARI SC, GULERIA S, MEHTA SN, MEHRA NK., Functional assessment of immune markers of graft rejection: a comprehensive study in live-related donor renal transplantation. *Clin Transplant*. 2006 Jan-Feb;20(1):85-90.
81. BARRY JM, CRAIG DH, FISCHER SM, FUCHS EF, LAWSON RK, BENNETT WM., An analysis of 100 primary cadaver kidney transplants. *J Urol*. 1980 Dec;124(6):783-6.
82. SOLHEIM BG, FLATMARK A, HALVORSEN S, JERVELL J, PAPE J, THORSBY E., The effect of blood transfusions on renal transplantation. Studies of 395 patients registered for transplantation with a first cadaveric kidney. *Tissue Antigens*. 1980 Nov;16(5):377-86.
83. SPEES EK, VAUGHN WK, NIBLACK G, WILLIAMS GM, AMOS DB, FILO RS, MCDONALD JC, MENDEZ-PICON G., The effects of blood transfusion on cadaver renal transplantation: a prospective study of the Southeastern Organ Procurement Foundation 1977-1980. *Transplant Proc*. 1981 Mar;13(1 Pt 1):155-60.
84. BETUEL H, TOURAINE JL, MALIK MC, BONNET MC, CARRIE J, DUBERNARD JM, TRAEGER J., Kidney transplantation in patients submitted to deliberate transfusions, to random transfusions, and to thoracic duct drainage. *Transplant Proc*. 1982 Jun;14(2):276-8.
85. KOVITHAVONGS T, SCHLAUT J, MARCHUK L, BETTCHER KB, PAZDERKA F, DOSSETOR JB., Beneficial effect of blood transfusion in HLA identical and haploidentical renal allografts. *Transplant Proc*. 1982 Dec;14(4):690-2.
86. MOORHEAD JF, CHAN MK, EL-MALIK F, MALIK S, RAFTERY M, BAILLOD RA, FERNANDO ON, VARGHESE Z., Blood transfusion for renal transplantation: benefits and risks. *Kidney Int Suppl*. 1983 May;(14):S-20-3

87. WOODRUFF MF, VAN ROOD JJ., Possible implications of the effect of blood transfusion on allograft survival. *Lancet*. 1983 May 28;1(8335):1201-3
88. PFAFF WW, FENNELL RS, HOWARD RJ, IRELAND JF, SCORNIK JC., Planned random donor blood transfusion in preparation for transplantation. Sensitization and graft survival. *Transplantation*. 1984 Dec;38(6):701-3.
1. McKENNA RM, TAKEMOTO SK, TERASAKI PI, Anti-HLA antibodies after solid org trasplantation. *Transplantation* 2000; 69:319-326.
2. KOZMA L, BOHATY I., [HLA class I antibody screening and typing in the sera of dialyzed patients with CDC and ELISA techniques: association with graft survival] *Orv Hetil*. 2007 Mar 25;148(12):553-8
3. HENE RJ, BOS MA, CLAAS FH., [The importance of HLA-matching before kidney transplantation: a recommendation of the Health Council of the Netherlands] *Ned Tijdschr Geneesk*. 2007 Jan 13;151(2):115-7
4. HIESSE C, BUSSON M, BUISSON C, FARAHMAND H, BIERLING P, BENBUNAN M, BEDROSSIAN J, AUBERT P, GLOTZ D, LOIRAT C, RONDEAU E, VIRON B, BLEUX H, LANG P., Multicenter trial of one HLA-DR-matched or mismatched blood transfusion prior to cadaveric renal transplantation. *Kidney Int*. 2001 Jul;60(1):341-9.
5. USTA M, DILEK K, ERSOY A, OZDEMIR B, MISTIK R, VURUSKAN H, GULLULU M, YAVUZ M, OKTAY B, YURTKURAN M., Prevalence of transfusion transmitted virus infection and its effect on renal graft survival in renal transplant recipients. *Scand J Urol Nephrol*. 2002;36(6):473-7.
6. LEZAIC V, JOVICIC S, SIMIC S, BLAGOJEVIC R, STOLIC I, SIMONOVIC R, DJUKANOVIC L., Donor-specific transfusion and renal allograft outcome. *Nephron*. 2002 Sep;92(1):246-7.
7. HUANG XE, FAN LP, LI LY, ZHAO M, XIA SS., Risk factors of acute rejection in sensitized kidney transplant recipients *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*. 2004 Oct;24(10):1188-91.

8. CANTAROVICH D, GIRAL-CLASSE M, HOURMANT M, DANTAL J, BLANCHO G, LERAT L, MOREAU A, SOULILLOU JP., Prevention of acute rejection with antithymocyte globulin, avoiding corticosteroids, and delaying cyclosporin after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2000 Oct;15(10):1673-6.
9. PAWLIK A, DOMANSKI L, ROZANSKI J, FLORCZAK M, DABROWSKA-ZAMOJCIN E, DUTKIEWICZ G, GAWRONSKA-SZKLARZ B., IL-2 and TNF-alpha promoter polymorphisms in patients with acute kidney graft rejection, *Transplant Proc*. 2005 Jun;37(5):2041-3.
10. MORRISSEY PE, REINERT S, YANGO A, GAUTAM A, MONACO A, GOHH R., Factors contributing to acute rejection in renal transplantation: the role of noncompliance. *Transplant Proc*. 2005 Jun;37(5):2044-7.
11. SURESHKUMAR KK, HUSSAIN SM, CARPENTER BJ, SANDRONI SE, MARCUS RJ., Antibody-mediated rejection following renal transplantation., *Expert Opin Pharmacother*. 2007 May;8(7):913-21.
12. LERUT E, KUYPERS DR, VERBEKEN E, CLEUTJENS J, VLAMINCK H, VANRENTERGHEM Y, VAN DAMME B., Acute rejection in non-compliant renal allograft recipients: a distinct morphology. *Clin Transplant*. 2007 May-Jun;21(3):344-51.
13. SLATINSKÁ J, HONSOVÁ E, LYEROVÁ L, SLAVCEV A, VIKLICKÝ O., [Acute humoral rejection of renal transplant], *Vnitr Lek*. 2007 Mar;53(3):223-5.
14. SUZUKI T, FUKUZAWA J, FURUYA S, YUZAWA K, AITA K, OHKOHCHI N, NAGATA M., Renal graft loss with plasma cell-rich acute rejection in cadaveric renal transplantation: a case report. *Clin Transplant*. 2005;19 Suppl 14:71-5.
15. GJERTSON DW., Impact of delayed graft function and acute rejection on kidney graft survival. *Clin Transpl*. 2000;:467-80.
16. MEIER-KRIESCHE HU, SCHOLD JD, SRINIVAS TR, KAPLAN B., Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant*. 2004 Mar;4(3):378-83.

16. MONTEIRO F, BUELOW R, MINEIRO C, RODRIGUES H, KALIL J., Identification of patients at high risk of graft loss by pre- and posttransplant monitoring of anti-HLA class I IgG antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. Transplantation. 1997 Feb 27;63(4):542-6.
17. SINGH D, KIBERD BA, WEST KA, KAMAL K, BALBONTIN F, BELITSKY P, LAWEN J., Importance of peak PRA in predicting the kidney transplant survival in highly sensitized patients. Transplant Proc. 2003 Nov;35(7):2395-7.
18. CAMPOS EF, TEDESCO-SILVA H, MACHADO PG, FRANCO M, MEDINA-PESTANA JO, GERBASE-DELIMA M., Post-transplant anti-HLA class II antibodies as risk factor for late kidney allograft failure. Am J Transplant. 2006 Oct;6(10):2316-20. Epub 2006 Aug 21.
19. KERMAN RH, SUSSKIND B, BUELOW R, REGAN J, POULETTY P, WILLIAMS J, GEROLAMI K, KERMAN DH, KATZ SM, VAN BUREN CT, KAHAN BD., Correlation of ELISA-detected IgG and IgA anti-HLA antibodies in pretransplant sera with renal allograft rejection. Transplantation. 1996, Jul 27;62(2):201-5.
20. SUMITRAN-HOLGERSSON S., HLA-specific alloantibodies and renal graft outcome. Nephrol Dial Transplant. 2001 May;16(5):897-904.
21. LIEBER SR, PEREZ FV, TABOSSI MR, PERSOLI LB, MARQUES SB, MAZZALI M, ALVES-FILHO G, DE SOUZA CA., Effect of panel-reactive antibody in predicting crossmatch selection of cadaveric kidney recipients. Transplant Proc. 2007 Mar;39(2):429-31.
22. GEORGESCU D, FERRARI-LACRAZ S, VILLARD J., Anti-HLA antibody detection and rejection in kidney transplantation: impact of the new technologies] Rev Med Suisse. 2007 Apr 25;3(108):1064-9. Review. French.
89. SLAVCEV A, LACHA J, SAJDLOVA H, VITKO S, VALHOVA S, STRIZ I, IVASKOVA E., Antibodies to HLA class II antigens as a risk factor for acute rejection of the allogeneic kidney. Ann Transplant. 2004;9(3):44-7.

9- ANEXOS

ANEXO 1



CEP, 02/08/07.
(Grupo III)

2ª VIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP
☎ (0_19) 3788-8936
FAX (0_19) 3788-8925
🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html
✉ cep@fcm.unicamp.br

PARECER PROJETO: N° 667/2004

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-HLA CLASSES I E II EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE RENAL”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Cármino Antonio de Souza

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: /12/2004

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 18/01/06

II - OBJETIVOS

Avaliar a correlação entre os níveis séricos de anticorpos anti-HLA classes I e II e a ocorrência de crises de rejeição aguda ou crônica ou perda do enxerto em receptores de transplante renal de doador cadáver ou aparentado não idêntico.

III - SUMÁRIO

Serão selecionados 20 pacientes receptores de rim de doador aparentado e 60 de doador cadáver. Os pacientes terão, durante o seguimento normal destes casos, colhidas amostras de sangue para dosagem de anticorpos anti-HLA classes I e II. Os pacientes serão seguidos por 18 meses, até a perda do enxerto ou até a morte. O projeto é metodologicamente correto.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto tem risco mínimo para os sujeitos da pesquisa, já que as amostras de sangue serão coletadas junto com os exames rotineiramente colhidos para acompanhamento de um transplantado renal. Há um orçamento e cronograma detalhados no projeto. O TCLE está claro e completo.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter

- 1 -

aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 18 de janeiro de 2005.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO 2

Resumo Informativo para pacientes participantes do estudo **Pesquisa de anticorpos anti-HLA classes I e II em pacientes submetidos ao** **transplante renal**

O Sistema HLA além de desempenhar papel relevante na resposta imunitária do hospedeiro original é, também, o mais importante sistema antigênico na determinação da sobrevivência de transplante de órgãos ou tecidos alogênicos, por evocarem processo de rejeição quando transferidos para um hospedeiro não compatível.

Já está bem estabelecida a importância dos anticorpos anti-HLA pré formados e adquiridos por via gestacional, transfusional ou por transplantes prévios na sobrevida do enxerto renal, ainda que estes anticorpos não tenham especificidade direta ao antígenos HLA do doador.

A atual disponibilidade de testes imunoenzimáticos semi-automatizado para a pesquisa e caracterização de anticorpos anti-HLA no soro de pacientes tem gerado debates relativo à relevância do seu desenvolvimento após o transplante e crises de rejeição ou perda do enxerto. Embora a rejeição crônica seja o evento mais comum ainda não está claro o papel dos componentes humorais e celulares da resposta imune dirigidas aos antígenos do doador e a maioria dos estudos analisam amostras de soro obtidas por ocasião das crises. A pesquisa seqüencial no período pós transplante imediato e ao longo do acompanhamento ambulatorial poderia servir como um instrumento laboratorial a mais para antever uma possível crise de rejeição e orientar o clínico na escolha de uma terapia imunossupressora mais adequada.

Este trabalho tem por objetivo avaliar os níveis séricos e as especificidades dos anticorpos anti-HLA em receptores de rim de doador aparentado HLA-haploidênticos ou de doador cadáver e avaliar o grau de influência destes níveis na etiologia e gravidade das crises de rejeição.

O trabalho incluirá pacientes que serão submetidos ao primeiro transplante renal realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas que concordarem com a participação neste estudo. As amostras serão coletadas no período pré-transplante (a mesma amostra utilizada para a prova cruzada) e no pós-transplante, com intervalos seqüências, de acordo com o acompanhamento ambulatorial até completar 12 meses de transplante ou até a perda do enxerto ou morte do paciente.

A pesquisa de anticorpos séricos será realizada por métodos imunoenzimáticos qualitativos empregando-se “kits” comerciais, disponíveis no mercado. A comparação do nível de reatividade contra painel (PRA) e das especificidades dos anticorpos entre pacientes que desenvolverem rejeição e aqueles que não desenvolverem será realizada por testes estatísticos de comparação de médias, medianas, análises uni- e multi-variadas e temporais, de acordo com a natureza dos dados. Com este estudo, espera-se obter um método prognóstico para a rejeição aguda ou crônica e compreender o papel destes anticorpos na fisiopatogenia da doença.

ANEXO 3

1.1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

1.2- “*Pesquisa de anticorpos anti-HLA classes I e II em pacientes submetidos ao transplante renal*”

Estando ciente e **de acordo** com o contido neste documento:

Eu, _____, após ter lido e entendido as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo com a pesquisadora _____, CONCORDO VOLUNTARIAMENTE, em participar do estudo.

_____ Data: ____/____/____

Assinatura (do participante) ou impressão datiloscópia

Eu, **Fany Verônica Ticona Perez**, pesquisadora deste projeto de pesquisa, declaro que prestei todas as informações aos responsáveis e comprometo-me a conduzir todas as atividades deste estudo de acordo com as normas da Resolução 196/96 CNS e complementares.

Campinas, ____ de _____ de _____.

Assinatura: _____

ANEXO 4

Tipagem dos receptores e doadores

Paciente	Receptor						Doador					
	A	A	B	B	DR	DR	A	A	B	B	DR	DR
A1	2	0	49	44	4	7	3	68	49	61	4	7
A2	29	31	0	44	4	7	3	68	49	61	4	7
A3	3	26	49	72	4	6	3	24	49	0	13	0
A4	3	69	0	1	1	11	24	25	51	53	1	11
A5	3	31	38	40	4	0	3	11	40	55	4	13
A6	33	30	14	53	1	16	2	33	7	14	1	15
A7	3	33	7	14	1	65	23	68	14	39	1	0
A8	2	68	39	53	8	13	23	33	44	53	4	8
A9	29	31	35	44	7	14	11	23	35	58	7	14
A10	1	0	44	3	13	0	24	26	7	44	3	4
A11	24	32	35	38	3	4	1	3	18	44	3	4
A12	23	33	42	45	3	7	2	31	51	4	4	7
A13	2	74	14	49	1	11	24	25	51	53	1	11
A14	26	30	51	45	1	7	2	29	44	53	1	7
A15	3	23	37	49	1	7	2	29	44	53	1	7
A16	24	33	40	44	4	13	3	68	18	40	13	0
A17	1	31	8	51	3	8	2	11	8	35	3	7
A18	1	2	7	38	11	15	2	33	7	14	1	15
A19	3	68	7	58	1	13	2	3	27	40	1	13
A20	2	0	39	50	8	13	2	24	39	5	7	0
A21	1	2	8	51	3	13	1	3	7	49	0	13
A22	2	29	45	58	7	13	2	24	39	5	7	0
A23	24	68	15	51	11	15	2	33	15	51	8	15
A24	1	2	42	57	15	13	2	11	49	51	7	15
A25	3	24	14	15	4	8	31	68	35	0	4	8
A26	23	74	45	35	1	13	1	11	35	57	1	13
B1	2	32	49	53	4	13	24	3	49	0	0	13
B2	1	2	8	53	8	15	3	30	44	49	8	15
B3	3	0	18	15	3	8	2	3	15	35	3	0
B4	2	26	57	0	1	3	2	3	15	35	3	0
B5	30	68	35	40	3	4	1	3	18	44	3	4
B6	2	68	50	51	3	4	2	0	16	50	3	7
B7	2	3	35	51	4	13	2	26	15	46	4	13
B8	3	30	15	42	8	11	2	26	15	46	4	13
B9	2	29	44	40	4	11	31	32	0	40	4	11
B10	2	68	7	45	4	15	2	24	7	44	3	4
B11	23	68	44	40	13	15	24	26	7	44	3	4
B12	24	68	35	40	4	15	3	11	40	55	4	13
B13	1	23	44	51	4	13	1	3	7	49	0	13
B14	2	3	7	40	10	13	3	68	18	40	13	0

ANEXO 5

Especificações dos receptores com presença de anticorpos anti-HLA

Paciente	A26	A25	A24
Data do transplante	6/8/2004	6/7/2004	19/4/2006
Tipagem	A23,74;B45,35 DR1,DR13	A3,24;B14,15 DR4,DR8	A1,2,B42,57,DR15,13
Idade	26	52	25
Sexo	F	F	F
Grupo ABO	O Rh(+)	A Rh(+)	O Rh(+)
Doença Base	Glomérulo Nefrite Crônica	Glomeruloesclerose	rejeição aguda-III
Sexo- Doador	F	F	F
Idade- Doador	35	55	40
Tipagem-doador	A1,11;B35,57	A31,68.B35, DR4,8	A2,11.B49,51.DR7,15
T isquemia (hrs)	17	9	6,5
Transfusão	5	16	12
Re-transplante	1	0	0
Prova Pre-Transplante	0	0	0
Prova Cruzada	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
% PRA Classe I	39	17	21
% PRA Classe II	0	75	8
LAT TM	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
LAT 1240 Classe I	B58,B7,A2,A69,B81	B8,B58,B57,B64,A2	B27,B60,B64,B7,B81
LAT 1240 Classe II	0	DR17,DR13,DR11,DR7,DR9,DR18, DR14,DR52,DR53,DR12,DQ4 DR51,DR10,DQ8,DQ6	DR13,DR17,DR52

ANEXO 6

PROCEDIMENTO DA TECNICA DO LAT ONE LAMBDA

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

A. Preparação do reagente 1. Reconstitua o controlo sérico liofilizado com **0,1 ou 0,2** ml de água estéril desionizada (como especificado no frasco) pelo menos 20 minutos antes do primeiro ensaio. Mantenha o reagente à temperatura ambiente e tape o frasco ocasionalmente até o anticorpo estar solubilizado. 2. Pouco antes do ensaio, dilua cada amostra de teste com o diluente de anticorpo (1:3 para LAT e 1:2 para LATM; no entanto, se o pré-rastreo tiver indicado um anticorpo forte, poderá ser necessário diluir ainda mais para atribuir a especificidade na LAT).

3. Pegue em 8 □l (por placa) de 10X controlo sérico reconstituído e dilua com o diluente de anticorpo.

4. Pegue em 10 ml (por placa) de 100X IgG anti-humano conjugado de AP e dilua com o diluente de anticorpo pouco antes do primeiro passo de lavagem.

5. Pegue em 5 ml (por placa) de 10X tampão de lavagem e dilua com 45 ml de água desionizada (o suficiente para 4 lavagens/placas).

6. Combine volumes iguais dos reagentes A e B de substrato de enzima (500 ml de cada por placa) pouco antes do segundo passo de lavagem. Tenha o cuidado de mudar as pontas das pipetas para evitar a contaminação cruzada das soluções *stock*.

B. Procedimento do teste

Consulte a tabela na página 1 para identificar as linhas onde deve adicionar o reagente. Consulte o Registo de Dados e a Folha de Trabalho para obter informações adicionais.

1. Adicione 10 ml da amostra de teste (diluída) ou do reagente de controlo de qualidade nos poços apropriados da LAT™.

***Nota:** Para evitar a contaminação cruzada de reagentes, mude as pontas da pipeta regularmente.*

2. Volte a colocar a tampa da placa e incube durante 1 hora entre 20 e 25°C (Opcional: Incube em plataforma giratória a baixa velocidade).

3. Remova o diluente e o soro de teste ou de controlo dos poços com um movimento súbito das placas. Coloque a placa invertida sobre folhas de papel para ensopar. Nos poços deve permanecer aproximadamente um lambda (1 ml) de líquido. Mantenha as placas invertidas ou cobertas até à adição do próximo reagente. Não deixe as placas secarem.
 4. Adicione 15 a 20 ml de 1X tampão de lavagem com um pipetador de seis canais ou um frasco reservatório/dispensador ou deite tampão nas placas para encher todos os poços. Rode suavemente e verta o tampão em excesso. Em seguida, retire o tampão de lavagem dos poços como explicado em cima. Repita a lavagem e remoção do tampão.
 5. Dispense 10 ml do conjugado de AP diluído a cada poço. Elimine o restante reagente diluído.
 6. Volte a colocar a tampa da placa e incube durante 40 minutos entre 20 e 25°C (Opcional: Incube em plataforma giratória a baixa velocidade).
 7. Remova o conjugado de AP dos poços, como indicado no passo 3. Não deixe as placas secarem.
 8. Adicione e remova duas vezes o tampão de lavagem, tal como indicado no passo 4. Nos poços deve permanecer aproximadamente um lambda (1 ml) de líquido.
 9. Dispense 10 ml de substrato de enzima em cada poço da LAT™. Elimine o restante reagente.
 10. Volte a colocar a tampa da placa e incube a 37°C durante 10 a 15 minutos protegido da luz. (Opcional: Incube em plataforma giratória a baixa velocidade).
- Nota: Não permita que a reacção continue por mais do que 15 minutos, a não ser que seja cuidadosamente monitorizada. Os poços de controlo positivo devem ficar azuis-escuros e os poços negativos devem ficar transparentes. É importante parar o desenvolvimento da cor antes de surgir um fundo não específico.
11. Pare a reacção adicionando 5 ml de 1X tampão de paragem a cada poço da placa LAT™. Volte a colocar a tampa da placa.
- Aguarde 15 minutos para os reagentes entrarem em equilíbrio.
12. Leia os resultados ao fim de 1 hora com um leitor ELISA adaptado para o formato de placas Terasaki. Retire a tampa para a leitura da placa. As placas (com tampas) podem ser guardadas entre 2 e 5°C durante um máximo de 3 dias após a paragem das reacções e podem ser lidas novamente, se for necessário confirmar o padrão da reacção. No entanto, os

valores D.O. diminuirão ligeiramente durante o armazenamento e podem perder-se as reacções fracas.

***Nota:** Se pNPP for substituído por BCIP como substrato colorimétrico, o tempo de incubação (passo 10 do **Procedimento de teste**) deve ser de 30 minutos a 37 °C.*

ANEXO 7

Tipagem dos pacientes e receptores. Nro de Compartilhamento de antígenos anti-HLA

Paciente	Receptor						Doador						Compartilhamento	
Grupo A	A	A	B	B	DR	DR	A	A	B	B	DR	DR	Match	Missmatch
A1	2	32	49	53	4	13	24	3	49	0	0	13	2	4
A2	1	2	8	53	8	15	3	30	44	49	8	15	1	5
A3	3	0	18	15	3	8	2	3	15	35	3	0	3	3
A4	2	26	57	0	1	3	2	3	15	35	3	0	2	4
A5	2	0	49	44	4	7	3	68	49	61	4	7	1	5
A6	29	31	0	44	4	7	3	68	49	61	4	7	1	5
A7	3	26	49	72	4	6	3	24	49	0	13	0	2	4
A8	3	69	0	1	1	11	24	25	51	53	1	11	2	4
A9	3	31	38	40	4	0	3	11	40	55	4	13	3	3
A10	33	30	14	53	1	16	2	33	7	14	1	15	3	3
A11	3	33	7	14	1	65	23	68	14	39	1	0	2	4
A12	2	68	39	53	8	13	23	33	44	53	4	8	2	4
A13	29	31	35	44	7	14	11	23	35	58	7	14	3	3
A14	30	68	35	40	3	4	1	3	18	44	3	4	2	4
A15	2	68	50	51	3	4	2	0	16	50	3	7	2	4
A16	2	3	35	51	4	13	2	26	15	46	4	13	3	3
A17	3	30	15	42	8	11	2	26	15	46	4	13	1	5
A18	2	29	44	40	4	11	31	32	0	40	4	11	3	3
A19	1	0	44	3	13	0	24	26	7	44	3	4	1	5
A20	2	68	7	45	4	15	2	24	7	44	3	4	3	3
A21	23	68	44	40	13	15	24	26	7	44	3	4	1	5
A22	24	68	35	40	4	15	3	11	40	55	4	13	2	4
A23	1	23	44	51	4	13	1	3	7	49	0	13	2	4
A24	24	32	35	38	3	4	1	3	18	44	3	4	2	4
A25	2	3	7	40	10	13	3	68	18	40	13	0	2	4
A26	23	33	42	45	3	7	2	31	51	4	4	7	1	5

Paciente	Receptor						Doador						Compartilhamento	
GrupoB	A	A	B	B	DR	DR	A	A	B	B	DR	DR	Match	Missmatch
B1	2	74	14	49	1	11	24	25	51	53	1	11	2	4
B2	26	30	51	45	1	7	2	29	44	53	1	7	2	4
B3	3	23	37	49	1	7	2	29	44	53	1	7	2	4
B4	24	33	40	44	4	13	3	68	18	40	13	0	2	4
B5	1	31	8	51	3	8	2	11	8	35	3	7	2	4
B6	1	2	7	38	11	15	2	33	7	14	1	15	3	3
B7	3	68	7	58	1	13	2	3	27	40	1	13	3	3
B8	2	0	39	50	8	13	2	24	39	5	7	0	2	4
B9	1	2	8	51	3	13	1	3	7	49	0	13	2	4
B10	2	29	45	58	7	13	2	24	39	5	7	0	2	4
B11	24	68	15	51	11	15	2	33	15	51	8	15	3	3
B12	1	2	42	57	15	13	2	11	49	51	7	15	2	4
B13	3	24	14	15	4	8	31	68	35	0	4	8	2	4
B14	23	74	45	35	1	13	1	11	35	57	1	13	3	3

ANEXO 8

Discrição histológica dos pacientes de acordo com a Classificação Banff 97, seguimento e evolução dos paciente do grupo A

Paciente	Biopsia	Seguimento(m)
A1	III+NTA	12
A2	NTA	12
A3	NTA	12
A4	Borderline+ II	12
A5	NTA+ Ib+IIa	12
A6	NTA+I	12
A7	NTA+ I	12
A8	IA+ NTA	12
A9	NTA	12
A10	NTA	12
A11	IIA+ polioma	12
A12	não	12
A13	IIA+NTA	12
A14	Nefropatia Polioma	12
A15	IIA	12
A16	IA+NTA	12
A17	NTA	6
A18	Borderline	6
A19	IIA+NTA	6
A20	Borderline+NTA	6
A21	Borderline	6
A22	IA+II	6
A23	IIA+NTA	6
A24	RA III	12
A25	Necrose Cortical+Necrose	3
A26	Não	12



Effect of Panel-Reactive Antibody in Predicting Crossmatch Selection of Cadaveric Kidney Recipients

S.R. Lieber, F.V.T. Perez, M.R. Tabossi, L.B.L. Persoli, S.B.D. Marques, M. Mazzali, G. Alves-Filho, and C.A. de Souza

ABSTRACT

Aim. The influence of panel-reactive antibody level (%PRA) on crossmatch results was evaluated among 866 patients on the waiting list for cadaveric renal allografting from January 2001 to August 2005. We evaluated the results for 124 potential donors for a kidney, including 2008 crossmatches. Four hundred eighteen patients were tested against only 1 donor.

Methods. Serum samples were screened for anti-HLA antibodies using immunoglobulin (Ig)G enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) PRA kit and the %PRA of the most reactive sample (peak) was used for patient stratification, according to sensitization level. Crossmatches were performed on fresh donor T lymphocytes from peripheral lymph nodes, using classical and anti-human-globulin enhanced complement-dependent cytotoxicity (CDC-T) methods. The tests were performed using peak and current patient sera before and after dithiothreitol treatment. The crossmatch was assumed to be negative when no reactivity was observed in all tests.

Results. The incidences of positive crossmatch were as follows: 72.3%, 14.6%, and 7.2%, among patients with PRA >50%, PRA ≤50%, and PRA = 0%, respectively. A negative crossmatch was observed in 6.5% (4 of 62) of the tests among 100% PRA patients.

Conclusion. Although %PRA level reflects the HLA sensitization of the patient, IgG ELISA PRA and CDC-T crossmatch may not reflect the same antibodies, and both results must be considered in a transplantation decision.

From Campinas State University, Hematology and Hemotherapy Center (S.R.L., F.V.T.P., M.R.T., L.B.L.P., S.B.D.M., and C.A.S.), and Department of Medical Clinic (M.M., G.A.F., and C.A.S.), Campinas State University, Campinas, São Paulo, Brazil.

Address reprint requests to Sofia Rocha Lieber, Laboratório de Histocompatibilidade, HEMOCENTRO, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Rua Carlos Chagas 480, Caixa Postal 6198, Campinas, São Paulo, 13081-970, Brazil. E-mail: slieber@osite.com.br

© 2007 by Elsevier Inc. All rights reserved.
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

0041-1345/07/\$—see front matter
doi:10.1016/j.transproceed.2007.01.045

Transplantation Proceedings, 39, 429–431 (2007)

429

THE treatment of choice in end-stage renal disease is kidney transplantation and HLA presensitization is an important barrier. Many patients have anti-HLA antibodies due to previous pregnancies, transfusions, or transplantations. The use of recombinant erythropoietin has contributed to reduce the transfusion need and, consequently, prevented this type of alloantigen sensitization.¹ However, patients with broadly reactive antibodies tend to remain on the waiting list for a longer time and when they have undergone transplantation; display a higher risk for graft loss.^{2,3}

To define allo-immunization status, sera from patients are tested against a panel of HLA antigens. Originally, panel-reactive antibody (PRA) was performed using NIH or anti-human enhanced complement-dependent cytotoxicity (CDC) or using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on fresh or frozen lymphocytes prepared locally.^{4,5} Afterwards, new techniques were developed based on highly sensitive methods of ELISA-PRA and flow cytometry-PRA.⁶⁻⁸ Nowadays commercial kits are available as a panel of purified HLA antigens absorbed onto plates or beads. The kits can define the percent PRA (%PRA) and class I and II HLA antibodies specificities, making the monitoring of patients during waiting time for a donor less laborious.

Specific allo-antibodies against donor cells are usually determined before transplantation by CDC methods, using fresh donor T cells with a current serum sample from the patient. However, the antibody level can decrease and not be detected in a current serum. Therefore, the crossmatch must also be performed with the peak PRA serum and the finding of specific antibodies may reflect specific immunological memory, which is relevant to graft survival.^{9,10}

This study evaluated the influence of PRA level in chronic renal disease patients on crossmatch results against cadaveric donor cells.

PATIENTS AND METHODS

%PRA was routinely performed on sera from 866 patients (60.7% male) on the waiting list for a cadaveric kidney transplant. In relation to ABO erythrocyte typing from patients, 34.5% were A, 11.0% were B, 2.5% were AB, and 52.0% were O groups. The serum samples were collected between January 2001 and August 2005 and the %PRA value of the most reactive sample (peak sample) was used for comparisons. The %PRA were determined using an ELISA using the LAT-M kit (One Lambda Inc., Canoga Park, Calif, United States), consisting of 96-well microtiter plates covered with purified solubilized HLA antigens, to detect immunoglobulin (Ig)G anti-HLA class I or II antibodies (IgG-ELISA-PRA).

Crossmatches were performed using complement-dependent cytotoxicity on fresh donor T lymphocytes from peripheral lymph nodes, using the NIH-classical (CDC) and the anti-human-globulin enhanced (AHG-CDC) methods. Those tests used peak and current patient sera without or with

treatment by dithiothreitol, an IgM-reducing agent. The crossmatch was assumed to be negative when no reactivity was observed in all tests. In the period, 124 potential cadaveric kidney donors were available, we evaluated a total of 2008 crossmatches. Four hundred eighteen patients (48.3%) were tested against only 1 donor, and 10 (1.2%) against 10 to 30 donors. Those frequencies were dependent on waiting list time and on the patient's ABO group.

RESULTS

The distributions of patients according to %PRA level and negative crossmatch incidences are shown in Table 1. As expected, the negative crossmatch incidence decreased as the %PRA increased. The percentage of patients defined as moderate sensitization (peak PRA, 1%–50%) was 50.9% and that of those defined as highly sensitized (peak PRA >50%) was 11.3%. The highly sensitized patients tended to remain on the waiting list for longer times and had been tested against a greater number of cadaveric donors. Actually 0.5% of sera with PRA ≤50% and 6.1% of those with PRA >50% were tested against 10 or more donors ($P < .0001$).

Although %PRA level revealed HLA sensitization, a negative IgG-ELISA-PRA does not assure a negative CDC or AHG-CDC crossmatch. In fact, 7.2% (42 of 582) of positive crossmatches occurred among PRA-negative patients. In 19 cases, the positive crossmatch was due to IgM antibodies as revealed using DTT treatment of the serum and not detected using the IgG-ELISA-PRA method. In contrast, 6.5% (4 of 62) of negative crossmatches occurred among 100% PRA patients.

DISCUSSION

PRA has been associated with early rejection of a kidney graft from a cadaveric donor. Its determination has been a routine index of sensitization to HLA antigens among recipient candidates. It has been demonstrated that individuals with high PRA levels show poor kidney graft outcomes, despite the absence of specific anti-donor antibodies using CDC crossmatch methods. Some patients show a decreased PRA level in the current serum sample, thus the peak PRA

Table 1. Influence of %PRA From Patients With Chronic Renal Failure on Crossmatch Results Against Cadaveric Kidney Donors

%PRA	0	1–10	11–25	26–50	51–75	76–100	Total
Patients							
N ¹	327	281	84	76	49	49	866
%	37.8	32.4	9.7	8.8	5.7	5.7	
Total crossmatch							
N ²	582	663	214	220	144	185	2008
Negative crossmatch							
%	92.8	86.3	81.3	67.3	43.1	15.7	75.9

Abbreviations: N¹, number of patients defined according to %PRA of the most reactive serum sample; and N², number of crossmatch realized in each group of patients.

is important for kidney transplant survival. Sensitized patients with peak PRA >50% who have a decrease in PRA to <26% are at lower risk of graft loss than those with a persistently high PRA.¹⁰ Nevertheless, a positive crossmatch, with the peak PRA serum and a negative crossmatch with a current serum sample may indicate specific immunologic memory to donor antigens. For this reason, in the present study, this kind of result defined a patient as not able to undergo transplantation. In fact, low levels of preformed alloantibodies detected using flow cytometry and not using CDC crossmatches are associated with worse graft function in the first year after kidney transplantation.¹¹

Comparisons of PRA results using CDC and ELISA have been shown to display significant correlations.^{5,6,12,13} The CDC-negative/ELISA-positive discrepancies are attributed to the fact that commercial IgG-ELISA-PRA kits, using purified HLA antigens, detect class I- and class II-specific antibodies, whereas CDC-PRA method usually are done with fresh T cells and detect only class I antibodies. Anti-HLA class II antibodies represent a risk factor for the development of acute immunological complications during the first year after transplantation.¹⁴ So, the specificity of class II antibodies from a potential recipient, defined using ELISA-PRA, represents an alternative to a B-cell crossmatch. ELISA methods can also detect noncytotoxic antibodies as noncomplement-binding IgG2 and IgG4 subclasses against HLA antigens, which are frequent in highly immunized patients¹⁵ and may explain some crossmatch-negative results, which were observed in this study, among the 100%PRA patients (4 of 62). The main CDC-positive/ELISA-negative discrepancies due to IgM antibodies are not revealed using an IgG-specific ELISA. The CDC due to IgM or IgG antibodies can be easily discriminated using dithiothreitol serum treatment. However, without an autologous crossmatch, it is not possible to define the presence of dangerous specific anti-donor IgM antibodies. Autoantibodies are usually IgM subclass crossreacting with allogeneic cells. They are the result of autoimmune processes and are not associated with graft rejection. The relevance of allospecific IgM in pretransplantation sera remains controversial. Although it could represent the beginning of an anti-HLA donor response, the graft survival in renal transplantation seems not to be negatively influenced by its presence. The strength of an IgM antibody response may be regulated in part by genes of the HLA-DR region.¹⁶ CDC methods can also detect non-HLA antibodies, which may be associated with chronic graft loss.¹⁷ In the present study, only 19 of 42 CDC crossmatch-positive reactions were explained by IgM antibodies in PRA-negative patients; the 23 remaining cases could be due to non-HLA antibodies.

In conclusion, % IgG-ELISA-PRA of a peak serum sample from a chronic renal disease patient defines the HLA sensitization. Crossmatches using peak and current sera are useful to detect old and new specific immunological

responses to donor antigens. PRA and crossmatch may not reflect the same antibodies. Considering the importance of cytotoxic and noncytotoxic antibodies on graft survival, the results of both tests must be carefully analyzed to make a transplantation decision.

REFERENCES

1. Lietz K, Lao M, Paczek L, et al: The impact of pretransplant erythropoietin therapy on late outcomes of renal transplantation. *Ann Transplant* 8:17, 2003
2. Opelz G, Wujciak T, Dohler B, et al: HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Rev Immunogenet* 1:344, 1999
3. Arias M. Impact of the delayed graft function in hypersensitized kidney transplant patients. *Transplant Proc* 35:1655, 2003
4. Zachary AA, Klingman L, Thome N, et al: Variations of the lymphocytotoxicity test. An evaluation of sensitivity and specificity. *Transplantation* 60:498, 1995
5. Lieber SR, Beck ST, Persoli LB, et al: Standardization of cellular immunoenzyme assay for anti-HLA class I antibodies evaluation: comparison with complement-dependent cytotoxicity methods. *Transplant Proc* 31:2989, 1999
6. Worthington JE, Thomas AA, Dyer PA, et al: Detection of HLA-specific antibodies by PRA-STAT and their association with transplant outcome. *Transplantation* 65:121, 1998
7. Pei R, Wang G, Tarsitani C, et al: Simultaneous HLA Class I and Class II antibodies screening with flow cytometry. *Hum Immunol* 59:313, 1998
8. Gibney EM, Cagle LR, Freed B, et al: Detection of donor-specific antibodies using HLA-coated microspheres: another tool for kidney transplant risk stratification. *Nephrol Dial Transplant* 21:2625, 2006
9. Speiser DE, Jeannot M: Renal transplantation to sensitized patients: decreased graft survival probability associated with a positive historical crossmatch. *Transpl Immunol* 3:330, 1995
10. Singh D, Kiberd BA, West KA, et al: Importance of peak PRA in predicting the kidney transplant survival in highly sensitized patients. *Transplant Proc* 35:2395, 2003
11. Michelon T, Schroeder R, Fagundes I, et al: Clinical relevance of low levels of preformed alloantibodies detected by flow cytometry in the first year post-kidney transplantation. *Transplant Proc* 37:2750, 2005
12. Schonemann C, Groth J, Leverenz S, et al: HLA class I and class II antibodies: monitoring before and after kidney transplantation and their clinical relevance. *Transplantation* 65:1519, 1998
13. Uboldi de Capei M, Pratico L, Curtioni ES: Comparison of different techniques for detection of anti-HLA antibodies in sera from patients awaiting kidney transplantation. *Eur J Immunogenet* 29:379, 2002
14. Slavcev A, Lacha J, Honsova E, et al: Clinical relevance of antibodies to HLA antigens undetectable by the standard complement-dependent cytotoxicity test. *Ann Transplant* 9:44, 2004
15. Arnold ML, Zacher T, Dechant M, et al: Detection and specification of noncomplement binding anti-HLA alloantibodies. *Hum Immunol* 65:1288, 2004
16. Bryan CF, Martinez J, Muruve N, et al: IgM antibodies identified by a DTT-ameliorated positive crossmatch do not influence renal graft outcome but the strength of the IgM lymphocytotoxicity is associated with DR phenotype. *Clin Transplant* 15:28, 2001
17. Opelz G: Collaborative Transplant Study. Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. *Lancet* 365:1570, 2005