

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

**ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DA PROVA CRUZADA POR
CITOMETRIA DE FLUXO NO TRANSPLANTE RENAL:
DETERMINAÇÃO DE PONTOS DE CORTE E IMPACTOS CLÍNICOS**

Priscila de Moraes Ramos

Porto Alegre, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

**ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DA PROVA CRUZADA POR
CITOMETRIA DE FLUXO NO TRANSPLANTE RENAL:
DETERMINAÇÃO DE PONTOS DE CORTE E IMPACTOS CLÍNICOS**

Priscila de Moraes Ramos

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Job Jobim
Coorientador: Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Ciências Cirúrgicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Ramos, Priscila de Moraes
ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DA PROVA CRUZADA POR
CITOMETRIA DE FLUXO NO TRANSPLANTE RENAL:
DETERMINAÇÃO DE PONTOS DE CORTE E IMPACTOS CLÍNICOS
/ Priscila de Moraes Ramos. -- 2018.
106 f.
Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Job Jobim.

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Imunogenética. 2. Histocompatibilidade. 3.
Prova cruzada . 4. Citometria de fluxo. I. Jobim,
Prof. Dr. Luiz Fernando Job, orient. II. Manfro,
Prof. Dr. Roberto Ceratti, coorient. III. Título.

Agradecimentos

Meu mais humilde e sincero obrigada:

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

Ao Professor Dr. Roberto Ceratti Manfro, pela coorientação, sugestões e oportunidade de trabalhar com seus pacientes.

Ao Dr. Riad Abdel Hadi, pela obtenção dos resultados referente aos pacientes, sugestões e disposição.

À Iara dos Santos Fagundes, por ter acreditado em mim e ter participado ativamente de todas as etapas deste trabalho.

À Jaqueline de Moraes Cardone, pelas inúmeras contribuições, sugestões e ensinamentos que me fizeram crescer.

À Beatriz Chamun Gil, pela nossa amizade, cumplicidade e ensinamentos desde o início.

À todas as demais colegas do Serviço de Imunologia pelos ensinamentos, palavras de carinho e incentivo.

Ao PPG em Ciências Cirúrgicas pela oportunidade de crescimento profissional.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao GPPG, em especial, à Vania Naomi Hirakata e a Aline Castello Branco Mancuso pelo auxílio nas análises estatísticas desde trabalho.

Ao meu marido André, por ter sido minha base em todos os momentos desta etapa.

Aos meus pais, Nelson e Rosemeri, e meu irmão Anderson, por sempre acreditarem em mim.

A todos demais familiares e amigos pelas palavras de carinho e incentivo.

Dedico este trabalho a minha mãe,
Rosemeri, sempre em meu coração
e ao André, meu amor.

Resumo

Introdução: Testes de histocompatibilidade são indispensáveis para viabilizar o transplante renal. A prova cruzada por citotoxicidade dependente de complemento (CDC) tem sido a técnica padrão para avaliar risco imunológico pré-transplante, no entanto, a prova cruzada por citometria de fluxo (FCXM) possui benefícios adicionais, como maior sensibilidade e análise semi-quantitativa através do *Median Channel Shift* (MCS). **Objetivo:** Definir pontos de corte de MCS baseado em correlação inter-técnicas e desfechos clínicos pós-transplante. **Método:** Estudo retrospectivo com pacientes candidatos a transplante renal no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, entre janeiro/2016-agosto/2017. Foram avaliadas 1705 provas cruzadas e 221 pacientes submetidos ao transplante. **Resultados:** A FCXM, relacionada ao CDC, apresentou sensibilidade=87%(FCXM-T) e 90%(FCXM-B), e VPN=98% para ambos. FCXM-B apresentou especificidade=43%, relacionada aos casos CDC-/FCXMB+. FCXM-T e -B detectaram 53% e 76% dos casos de DSA \geq 5001 (*Donor Specific Antibody*). MCS apresentou desempenho satisfatório em detectar CDC+ (AUC/IC): MCST=0,909(0,886-0,933) e MCSB=0,775(0,724-0,826). Pontos de corte de MCST=245 e MCSB=282 apresentaram melhor predição de CDC+. Não houve diferença na função do enxerto de pacientes transplantados com FCXM+. Apenas 30% das FCXM+ estiveram diretamente relacionadas com DSA pré-tx. No entanto, episódios de rejeição foram mais frequentes no grupo FCXM+vs.FCXM- (95%vs.86%, p=0,04). **Conclusão:** É possível calibrar o MCS baseado no CDC+, no entanto, significa um risco em termos da não detecção de anticorpos de baixo título. A FCXM+, em curto prazo, não deve ser por si só um fator impeditivo para o transplante. A análise conjunta do MCS e DSA parece ser uma boa ferramenta de seleção dos receptores renais.

Palavras-chave: Prova cruzada. Citometria de fluxo. *Median channel shift*. Anticorpos anti-HLA. Transplante renal.

Abstract

Introduction: Histocompatibility tests are indispensable for enable the renal transplantation. Crossmatching tests for complement dependent cytotoxicity (CDC) has been a standard technique for assess pre-transplant immunological risk, however, the flow cytometry crossmatching test (FCXM) has additional benefits, such as increased sensitivity and semi-quantitative analysis through the Median Channel Shift (MCS). **Objective:** Define MCS cutoff values based on inter-technical correlation and post-transplant clinical outcomes. **Methods:** A retrospective study with renal transplant candidates at the Hospital de Clínicas of Porto Alegre, between January/2016-August/2017. A total of 1705 crossmatching and 221 patients submitted to transplantation were evaluated. **Results:** The FCXM, related to CDC, resulted in sensitivity=87% (FCXM-T) and 90% (FCXM-B), and NPV=98%, for both. FCXM-B resulted in specificity=43%, related to cases CDC-/FCXMB+. FCXM-T and -B detected 53% and 76% of cases of DSA \geq 5001 (*Donor Specific Antibody*). The MCS showed satisfactory performance in detecting CDC + (AUC/IC): MCST=0.909(0.886-0.933) and MCSB=0.775(0.724-0.826). Cutoff values of MCST=245 and MCSB=282 showed better prediction of CDC+. There was no difference in the graft function of patients transplanted with FCXM+. Only 30% of FCXM + were directly related to pre-tx DSA. However, rejection episodes were more frequent in the group FCXM+vs.FCXM- (95%vs.86%, p=0,04). **Conclusion:** it is possible to calibrate MCS based on CDC +, however, that means a risk in terms as to the non-detection of low-titre antibodies. The FCXM+, in the short term, should not be by itself an impediment to transplantation. Joint analysis of MCS and DSA seems to be a good tool for selection of renal receptors.

Keywords: Crossmatch. Flow cytometry. Median channel shift. Anti-HLA antibodies. Kidney transplantation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 O Complexo Principal de Histocompatibilidade	16
2.1.1 Molécula HLA de Classe I	17
2.1.2 Molécula HLA de Classe II	18
2.2 Imunologia de Transplante	20
2.2.1 Reconhecimento de Aloantígenos.....	20
2.2.2 Rejeição de Aloenxertos.....	22
2.2.3 Disfunção Inicial do Enxerto	24
2.3 Avaliação e Seleção Imunológica.....	24
2.3.1 Tipagem ABO	25
2.3.2 Tipificação HLA	26
2.3.3 Prova cruzada por Citotoxicidade Dependente de Complemento	28
2.3.4 Avaliação de Reatividade Contra Painel	30
2.3.5 Prova cruzada por Citometria de Fluxo	34
3 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	39
4 OBJETIVO.....	43
4.1 Geral.....	43
4.2 Específicos	43
5. ARTIGOS ORIGINAIS.....	44
5.1 Artigo 1 (versão inglês): Accuracy of the median channel shift in the flow cytometry for predicting complement dependent cytotoxicity crossmatching in kidney transplant candidates	44
5.2 Artigo 1 (versão português): Acurácia diagnóstica do Median Channel Shift para predição de provas cruzadas pré-transplante renal por citotoxicidade dependente de complemento	65
5.3 Artigo 2 Relevância clínica da prova cruzada por citometria de fluxo positiva no transplante renal.....	86
6. ANEXOS	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABO: sistema de grupos sanguíneos

AGH: antiglobulina humana

APCs: células apresentadoras de antígenos

ASHI: *American Society for Histocompatibility and Immunogenetics*

C4d: subproduto do componente C4 do complemento

CD19: marcador de superfície do linfócito B

CD3: marcador de superfície do linfócito T

CD4: célula T restrita pelo MHC classe II

CD8: célula T restrita pelo MHC classe I

CDC: citotoxicidade dependente de complemento

DIE: disfunção inicial do enxerto

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNase: desoxirribonuclease

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

DTT: ditioneitol

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

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

FITC: fluorocromo fluoresceína

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

IgG: imunoglobulina de classe G

IgM: imunoglobulina de classe M

IMGT: *international immunogenetics project*

MCF: mediana do canal de fluorescência (*Median Channel Fluorescence*)

MCS: desvio de canal (*Median Channel Shift*)

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

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

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

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

PE: fluorocromo Ficoeritrina

PerCP: *Peridinin-chlorophyll proteins*

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

RBT: Registro Brasileiro de Transplante

SA: antígeno único (*Single Antigen*)

SAPE: ficoeritrina conjugada com streptavidina

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

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

UV: luz ultravioleta

VXM: prova cruzada virtual (*virtual crossmatch*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Molécula HLA de Classe I	17
Figura 2. Molécula HLA de Classe II	18
Figura 3. Número de antígenos e alelos nomeados por ano a partir de 1987 até 2017	19
Figura 4. Reconhecimento direto e indireto de aloantígenos	21
Figura 5. Leitura da prova cruzada por citotoxicidade dependente de complemento.....	29
Figura 6. Análise de PRA no software HLA Fusion	32
Figura 7. Resultados da prova cruzada por citometria de fluxo.....	35

1 INTRODUÇÃO

O transplante de órgãos e tecidos vem sendo uma importante terapia para diversos pacientes no Brasil e no mundo, proporcionando melhor qualidade de vida aos pacientes que necessitam dessa intervenção.¹

Dados do Registro Brasileiro de Transplantes (RBT) mostraram que o Brasil é o segundo país no mundo em número absoluto de transplantes renais. Em 2017 foram realizados 5.929 transplantes (1.136 com doador vivo e 4.793 com doador falecido), destes, 586 (9,9%) foram realizados no Rio Grande do Sul (28 com doador vivo e 558 com doador falecido).²

Atualmente o Brasil possui 21.059 pacientes em lista de espera para transplante renal, sendo que 938 (4,4%) encontram-se no Rio Grande do Sul.²

O transplante renal é considerado um tratamento bem estabelecido, principalmente devido à evolução dos conhecimentos em histocompatibilidade, aos avanços na preservação de órgãos, ao uso de drogas imunossupressoras mais efetivas e ao melhor monitoramento do paciente pré e pós-transplante.^{3, 4} Entretanto, algumas questões permanecem problemáticas, entre elas, a resposta imune do receptor contra o enxerto implantado.^{4, 5}

A rejeição é uma importante causa de perda de órgãos transplantados, e é classificada de acordo com o mecanismo imunológico envolvido. A rejeição celular é mediada por células T e a rejeição humoral é mediada por anticorpos, podendo os dois mecanismos coexistir.⁶⁻⁸

O envolvimento de anticorpos pré-formados do receptor dirigidos aos antígenos HLA (*Human Leucocyte Antigens*) do órgão transplantado estão, diretamente, envolvidos com desfechos desfavoráveis no transplante.⁹⁻¹²

A sensibilização a antígenos HLA pode ocorrer através de transfusões sanguíneas, gestações ou transplantes prévios. Portanto, a condição imunológica dos pacientes deve ser avaliada periodicamente a fim de monitorar a produção e o título desses anticorpos.¹²

Por esta razão, existiu um grande avanço no desenvolvimento de testes para detecção de anticorpos desde que Patel e Terasaki relataram em 1969 a relevância da prova cruzada pré-transplante nos resultados pós-transplante.¹³ Desde então, o ensaio de microlinfocitotoxicidade (CDC-citotoxicidade dependente de complemento) que detecta anticorpos fixadores do complemento tem sido a técnica padrão para avaliar a presença de anticorpos anti-HLA pré-transplante. A prova cruzada por CDC T positiva é considerada contraindicação formal ao transplante.^{11, 14-17}

Em 1983 a prova cruzada por citometria de fluxo (FCXM, do inglês flow cytometry crossmatch) começou a ser utilizada.¹⁸ Essa nova metodologia melhorou a sensibilidade da pesquisa de anticorpos anti-doador já que permite a detecção de baixos títulos de aloanticorpos circulantes em pacientes que tiveram prova cruzada por CDC negativa. Adicionalmente, esta menos propensa a subjetividade do que a avaliação de morte celular como ocorre no CDC e pode detectar anticorpos isotipo IgG não fixadores do complemento.^{11, 14, 19}

A relevância clínica dos anticorpos detectados pela FCXM, mas não por CDC, ainda não está bem definida.^{16, 17} O manual de boas práticas laboratoriais da *American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI)* aponta que os pacientes com CDC negativo e FCXM positivo ficam na 'zona cinza'

quanto à decisão clínica, apresentando baixo risco de rejeição hiperaguda, mas risco maior de rejeição aguda.¹⁹

Em parte, a falta de consenso sobre a importância dos anticorpos anti-HLA doador específico pré-transplante detectados pela FCXM, pode ser explicada pela inexistência de protocolos padronizados para a realização e interpretação da técnica, resultando em grande variabilidade interlaboratorial.²⁰

A FCXM (protocolo Halifax modificado²⁰) utilizada neste estudo consiste, em síntese, na incubação de células do doador (tratadas com pronase 0,0235 U/mL) com o soro do receptor e soros controles, seguida de adição do mix de reação, composto pelos seguintes reagentes fluorescentes: anti-IgG, anti-CD3 e anti-CD19. Em cada soro testado, obtém-se a mediana do canal da fluorescência (MCF) anti- IgG FITC, considerando uma escala de 1024 canais de detecção.

Para a expressão qualitativa dos resultados, é necessário calcular o ponto de corte do teste que consiste na média da MCF do soro controle negativo acrescido a um valor da MCF que corresponde à variação deste soro controle negativo em 50 células, determinado previamente. Soros de pacientes com valor maior ou igual ao ponto de corte são considerados positivos.

Além dos resultados qualitativos, a FCXM permite o cálculo de outro parâmetro, o MCS (do inglês, *median channel shift*), o qual é calculado a partir da subtração da MCF do paciente com a média da MCF do soro controle negativo; este índice possibilita uma análise semi-quantitativa.

Entretanto, os pontos de corte de MCS que expressem relevância clínica não estão bem definidos, estando sujeitos ao “*Center Effect*”, ou seja, valores que podem ser um sinal de alto risco imunológico em um centro transplantador,

podem não ser em outro. Portanto, é de suma importância que cada laboratório e equipe transplantadora definam os seus valores.¹⁹

Uma alternativa para a determinação de pontos de corte dos valores de MCS é a realização de estudos de correlação intertécnicas (FCXM versus CDC versus *Single Antigen* (SA)) com posterior validação em desfechos clínicos.

Sendo assim, este estudo tem como objetivo definir e avaliar pontos de corte de MCS que se correlacionem com as características dos pacientes transplantados renais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, estabelecendo assim, uma interpretação adequada dos resultados de FCXM e os impactos clínicos no transplante renal.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O Complexo Principal de Histocompatibilidade

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, *major histocompatibility complex*) é um complexo de genes altamente polimórficos localizados no braço curto do cromossomo 6. Essa nomenclatura diz respeito à importância que os produtos de seus genes têm na histocompatibilidade.²¹

A descoberta do MHC ocorreu nos anos de 1940 quando George Snell e colaboradores observaram que os produtos deste loco genético ocasionavam rejeição imediata de transplante entre linhagens de camundongos endogâmicos.³

O MHC está presente em todos os mamíferos, em humanos, é chamado HLA, por serem descritos primeiramente em leucócitos. As moléculas HLA são glicoproteínas de superfície células, as de maior importância na histocompatibilidade são as moléculas HLA: de classe I, expressas em quase todas as células nucleadas, e as de classe II, encontradas somente em células dendríticas, nos linfócitos B, nos macrófagos e em poucos outros tipos celulares.²²

A herança dos genes HLA é haplotípica, cada indivíduo herda e transmite, em conjunto, alelos em bloco por cromossomo. Considerando que o indivíduo herda dois haplótipos (um de origem materna, outro de origem paterna), cada indivíduo pode ter até dois alelos diferentes para cada especificidade HLA.³

A função fisiológica das moléculas de MHC é a apresentação de peptídeos às células T, fazendo o controle das respostas imunológicas à antígenos proteicos.³

Além da importância nos transplantes, o sistema HLA é amplamente avaliado em estudos de associação de alguns genes com determinadas doenças e em rastreamento populacionais.

2.1.1 Molécula HLA de Classe I

As moléculas HLA de classe I são compostas de duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente: uma pesada (cadeia α) codificada pelo MHC e uma leve (cadeia β_2 -microglobulina) (Figura 1).

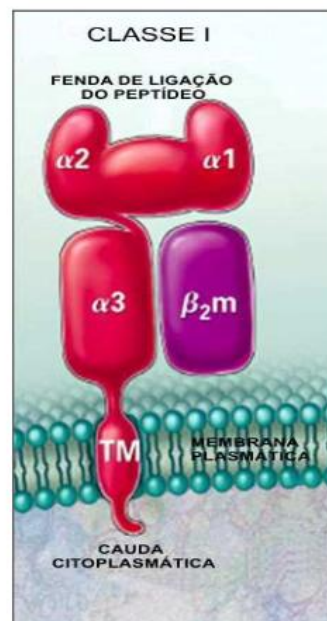


Figura 1. Molécula HLA de Classe I. Fonte: Cerruto (1997)

A cadeia α tem três principais regiões: Primeiro, os seguimentos aminoterminais (domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$), essa região é a mais polimórfica da molécula, a conformação destes domínios formam uma fenda ao qual permite a

ligação de peptídeos contendo de 8 a 11 aminoácidos. Segundo, o domínio $\alpha 3$ que permanece constante em todas as moléculas de classe I, essa região serve de ligação para o CD8 do linfócito T, no terminal deste seguimento se encontra a região transmembrana pelo qual a molécula é ancorada na membrana celular. Terceiro, a cadeia β_2 -microglobulina, que se associa com a cadeia α e auxilia a manter a conformação apropriada da molécula, igualmente a região $\alpha 3$, é estruturalmente constante em todas as moléculas da classe I.^{3, 22}

Os genes do MHC de classe I são principalmente HLA-A, HLA-B e HLA-C, mas também HLA-E, HLA-F e HLA-G com distribuição tecidual mais restrita e com menos importância na histocompatibilidade.

2.1.2 Molécula HLA de Classe II

As moléculas HLA de classe II são compostas de duas cadeias polipeptídicas uma α e uma β ligadas de forma não covalente, ambas as cadeias são codificadas pelo MHC (Figura 2).

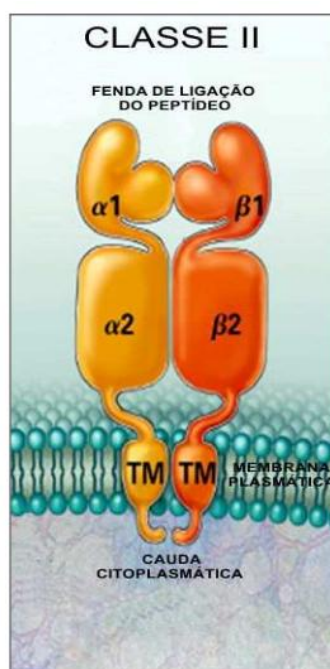


Figura 2. Molécula HLA de Classe II. Fonte: Cerruto (1997)

As cadeias α e β apresentam três principais regiões: Primeiro, os seguimentos aminoterminais (domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$), a interação destes domínios formam uma fenda de ligação de peptídeos com tamanho suficiente para ligar antígenos com 30 aminoácidos ou mais. Segundo, os seguimentos $\alpha 2$ e $\beta 2$ não polimórficos onde o domínio $\beta 2$ é o local de ligação para o CD4 do linfócito T. E no terminal dos seguimento $\alpha 2$ e $\beta 2$ encontra-se a região transmembrana pelo qual a molécula é ancorada na membrana celular.^{3, 22}

Os genes do MHC de classe II são principalmente HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP, e mais raramente alguns genes da cadeia DR β , como DR $\beta 51$, DR $\beta 52$ e DR $\beta 53$.

Os genes HLA de classe I e II são altamente polimórficos. Segundo o IMGT/HLA Database (International ImMunoGeneTics Project) atualmente são conhecidos 16.755 sequências de alelos, 12.351 de Classe I e 4.404 de Classe II (Figura 3).²³

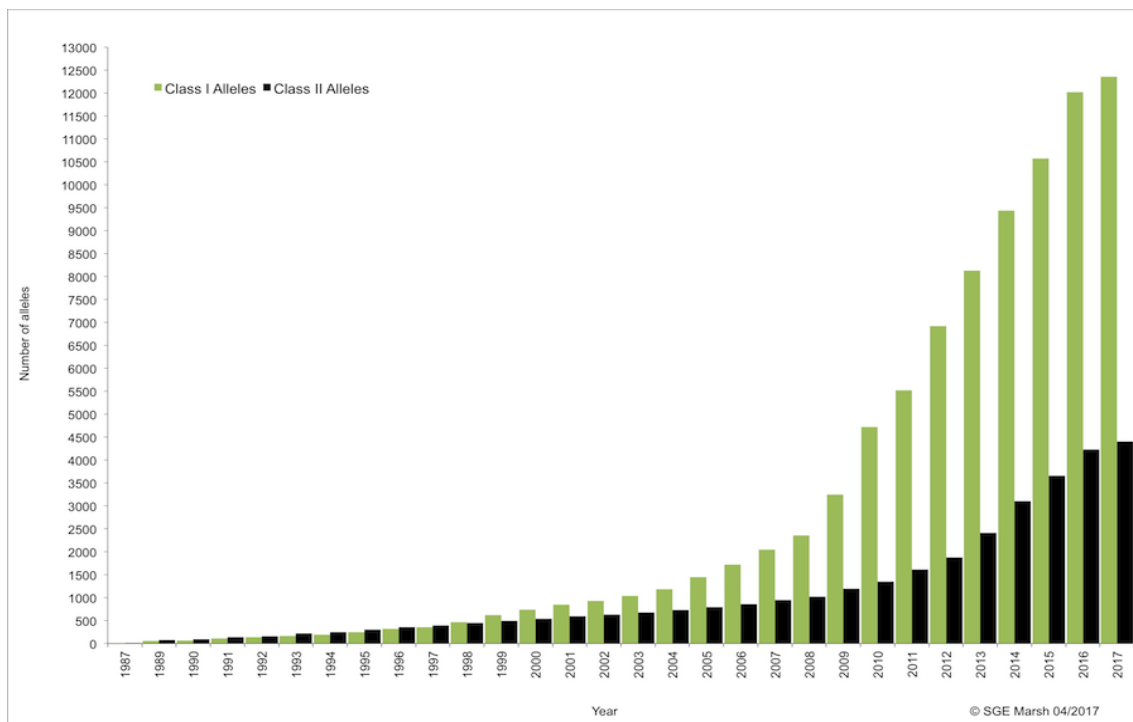


Figura 3. Número de antígenos e alelos nomeados por ano a partir de 1987 até 2017. Fonte: IMGT/HLA, (2017).

2.2 Imunologia de Transplante

A imunologia de transplante se faz importante, pois a rejeição imunológica ainda é uma das maiores barreiras nos transplantes. O monitoramento constante dos anticorpos alorreativos nos candidatos a transplante renal é fundamental para viabilizar o procedimento.

Existem diferentes tipos de transplantes denominados de acordo com o tipo de doador: transplante autólogo ao qual o enxerto é transplantado do indivíduo para si mesmo; transplante singênico onde o enxerto é transplantado entre indivíduos geneticamente idênticos; transplante alogênico em que o enxerto é transplantado entre indivíduos geneticamente diferentes da mesma espécie e o xenoenxerto, onde o enxerto é transplantado entre indivíduos de espécies distintas.^{3, 21, 22}

Em imunologia de transplante denomina-se aloantígeno as moléculas reconhecidas como estranhas ao organismo e alorreativos os anticorpos e linfócitos que reagem contra os aloantígenos. Sendo os aloantígenos responsáveis por desencadear as respostas imunes celulares e humorais, causando a rejeição do enxerto.

2.2.1 Reconhecimento de Aloantígenos

A agressão ao transplante é desencadeada por linfócitos T do indivíduo transplantado capazes de reconhecer moléculas HLA do doador. Assim, os linfócitos T são fundamentais no desencadeamento da rejeição, por sua capacidade de alorreconhecimento.

Esse reconhecimento pode ocorrer por duas diferentes vias: a vida direta onde as células T circulantes do receptor fazem o reconhecimento das células

apresentadoras de antígenos (APCs) do enxerto; e a via indireta onde as APCs do receptor migram para o órgão transplantado, processam moléculas HLA alogênicas e apresentam seus fragmentos peptídicos para os linfócitos T. As vias direta e indireta de alorreconhecimento não são excludentes, podendo ocorrer simultaneamente no processo de rejeição (Figura 4).^{3, 22, 24}

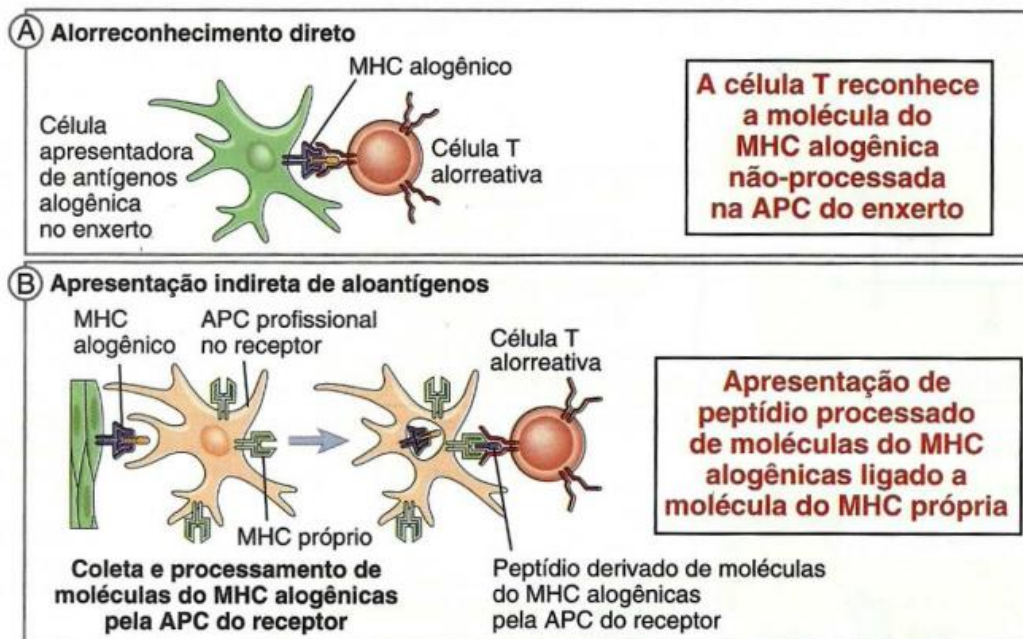


Figura 4. Reconhecimento direto e indireto de aloantígenos. Fonte: Abbas (2006)

Células T alorreativas no receptor podem ser ativadas por ambas as vias, migrando para o enxerto e causando rejeição. Células T CD4+ auxiliares alorreativas diferenciam-se em células efetoras produtoras de citocinas causando lesão no enxerto. Células T CD8+ alorreativas ativadas pela via direta diferenciam-se em citotóxicas e destroem células nucleadas no enxerto que expressam as moléculas alogênicas HLA de classe I.

As células T CD8+ citotóxicas que são geradas pela via indireta são restritas ao HLA próprio, portanto não podem destruir diretamente as células estranhas no enxerto. Dessa forma, quando células T alorreativas são

estimuladas pela via indireta, o principal mecanismo de rejeição é, provavelmente, uma reação mediada por células T CD4+ efectoras que infiltram o enxerto e reconhecem aloantígenos do doador sendo exibidos por APCs do receptor que também infiltraram o enxerto.³

Após o reconhecimento inicial, os linfócitos T CD4+ auxiliares liberam sinais que estimulam os linfócitos B a produzirem os anticorpos. Uma vez ativados, os linfócitos B se diferenciam em células secretoras de anticorpos, algumas podem continuar produzindo anticorpos por longos períodos, e outras se tornam células de memória, caracterizando a resposta imune humoral.^{3, 22}

2.2.2 Rejeição de Aloenxertos

A rejeição de aloenxertos é classificada de acordo com alterações histopatológicas, pela presença de alguns indicadores de ativação do sistema imune (presença de DSA, *donor single antigen* e depósito da fração C4d do complemento) e no tempo decorrido pós-transplante.^{3, 21}

No transplante renal o diagnóstico histopatológico baseia-se na classificação de Banff, proposta em 1991 por um grupo de patologistas renais, nefrologistas e cirurgiões de transplante. Eles desenvolveram uma padronização internacional de nomenclatura e critérios para o diagnóstico histológico da rejeição do enxerto renal que vem sendo revisada periodicamente.²⁵ Dessa forma, atualmente as rejeições são classificadas como agudas ou crônicas, podendo ser mediada por anticorpos ou por células T.²⁶

2.2.2.1 Rejeição Aguda

A rejeição aguda é um processo de lesão vascular e parenquimatosa que se inicia nas primeiras semanas pós-transplante. A rejeição aguda mediada por células T é caracterizada pelo acúmulo de células mononucleadas no interstício, acompanhado por inflamação nos túbulos e artérias renais. As células (T CD4+ e CD8+) infiltram o espaço intersticial ao redor dos túbulos e causam destruição direta das células do enxerto ou produzem citocinas que recrutam e ativam células inflamatórias, causando lesão no enxerto. ^{21, 25, 26}

A rejeição aguda mediada por anticorpos ocorre em decorrência da existência prévia ou do desenvolvimento de aloanticorpos contra antígenos do doador. São características histopatológicas a presença de C4d e agressão aguda no tecido transplantado. ^{21, 25, 26}

A pesquisa da fração de C4d depositado em capilares peritubulares é um sinal de ativação da cascata do complemento, devido à ligação antígeno-anticorpo. Esta ferramenta diagnóstica é fundamental para a diferenciação da rejeição mediada predominante por células da mediada por anticorpos, entretanto, em muitos episódios de rejeição, os componentes humorais e celulares podem ocorrer simultaneamente. ²¹

2.2.2.2 Rejeição Crônica

A rejeição crônica ocorre, em geral, tardiamente ao transplante, no entanto pode ocorrer após poucos meses após a intervenção. Na rejeição crônica mediada por células as evidências histopatológicas são: espessamento da camada íntima arterial e presença de fibrose, com infiltrado de células mononucleadas e formação de uma neoíntima. ^{21, 26}

Na rejeição crônica mediada por anticorpos observa-se a presença de depósitos de C4d, DSA e evidência de agressão crônica do tecido, com a presença de duplo contorno nos capilares glomerulares, multiplicação dos capilares peritubulares, além de espessamento da íntima arterial, atrofia tubular e fibrose intersticial.^{21, 26}

2.2.3 Disfunção Inicial do Enxerto

A disfunção inicial do enxerto (DIE) é um evento comumente identificado em transplante renal com doador falecido. É caracterizada, em geral, pela necessidade de diálise na primeira semana pós-transplante.³⁵ Entretanto, as definições de DIE apresentam uma grande variação, fato que interfere diretamente na aferição da incidência da doença, que varia entre 20-40%. No Brasil esse número parece ser ainda maior, conforme relatado por Azevedo e colaboradores a incidência pode variar entre 42% a 81%.³⁶

Diversos fatores de risco estão relacionados com a DIE, entre eles: tempo de isquemia fria e anastomose, idade e histórico de hipertensão do doador e idade, doença de base, hipertensão e status imunológico do receptor.³⁷

A ocorrência de DIE está associada com pior sobrevida do enxerto, além disso, estudos têm demonstrado que na vigência de DIE ocorre um aumento na probabilidade de episódios de rejeição aguda.³⁵⁻³⁷

2.3 Avaliação e Seleção Imunológica

Diversos testes laboratoriais são rotineiramente empregados no pré e pós-transplante para reduzir o risco de rejeição do órgão transplantado. Estes

incluem a tipagem sanguínea ABO, a tipagem HLA (em doadores e receptores), a detecção de anticorpos pré-formados nos receptores e as provas cruzadas entre receptor e doador. Essas metodologias permitem o monitoramento da condição imunológica dos pacientes e auxiliam nas tomadas de decisão no pré e pós-transplante.

2.3.1 Tipagem ABO

A determinação do grupo sanguíneo ABO no doador e no receptor é o primeiro exame a ser realizado, pois incompatibilidades ABO (quando não há o preparo adequado do receptor) causam rejeição hiperaguda mediada por isoaglutininas anti-A ou anti-B.

A tipagem sanguínea ABO é realizada misturando as hemácias do paciente com soros padronizados que contenham anticorpos anti-A ou anti-B, se o paciente expressar qualquer um desses antígenos sanguíneos, o soro específico para aquele antígeno irá aglutinar as hemácias.

Incompatibilidades ABO era considerada uma barreira à realização do transplante, no entanto, atualmente transplante renal ABO incompatível têm sido explorado como forma alternativa de aumentar o pool de doadores. Este avanço tem sido possível em função do desenvolvimento de novos protocolos para o uso de drogas imunossupressoras e métodos de dessensibilização pré e pós-transplante.³⁸

2.3.2 Tipificação HLA

A tipificação HLA no transplante renal é utilizada para selecionar os possíveis receptores na lista de espera. Quanto maior a semelhança entre o HLA do doador e do receptor, melhor sucedido será o transplante: apresentando sobrevida aumentada e menor chance de formação de anticorpos contra antígenos HLA do doador.

Em caso de transplante renal com doador falecido, a tipificação ocorre concomitantemente à retirada dos órgãos, após a finalização do teste, o resultado é enviado para a Central de Transplantes do estado que por sua vez gera uma relação de pacientes em lista de espera que são selecionados, seguindo diversos critérios pré-estabelecidos pelo Ministério da Saúde e enviada ao Serviço de Imunologia para dar seguimento aos testes de compatibilidade.

A tipagem HLA foi realizada, por muitos anos, pelos testes sorológicos baseados em coleções padronizadas de soros de múltiplos indivíduos previamente sensibilizados para diferentes antígenos HLA ou por anticorpos monoclonais anti-HLA. Esta técnica possibilitava a identificação do haplótipo HLA. Atualmente, a reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) substituiu o método sorológico permitindo a identificação dos genes HLA (alelos).

Para obter a tipificação HLA dos doadores em nosso centro transplantador emprega-se a metodologia PCR-SSP (*PCR - Sequence Specific Primers*) e para os receptores PCR-SSO (*PCR- Sequence Specific Oligonucleotide*), em ambos os métodos temos a identificação dos grupos alélicos para os locus HLA-A, -B, -C, -DRB1 e -DQB1.

Na tipificação HLA por PCR-SSP utiliza-se uma sequência específica de primers (iniciadores da replicação de DNA).²⁷ Primeiramente é realizada uma reação de PCR em termociclador, para a amplificação do DNA alvo (alelos HLA). Após, é realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1% com uma voltagem de 200v durante 20 minutos. Na sequência, o gel é visualizado em um transiluminador UV. A observação de quais alelos foram amplificados se dá por coloração com brometo de etídeo. A interpretação dos resultados baseia-se na presença ou ausência de fragmento específico de DNA amplificado, definindo a tipificação HLA do paciente.

A tipificação HLA por PCR-SSO é realizada através da metodologia Luminex utilizando sondas de oligonucleotídeos com sequências específicas ligadas a microesferas codificadas fluorescentemente para identificação de alelos HLA em amostras de DNA.^{28, 29}

Inicialmente, o DNA alvo é amplificado por PCR utilizando primer loco específico. O produto da PCR é desnaturado e neutralizado para manter-se como uma fita simples. Após, é realizada uma hibridização do DNA alvo com sondas complementares conjugadas com as microesferas. A seguir é adicionada uma substância fluorescente (SAPE – Ficoeritrina conjugada com Streptavidina) que se ligará por afinidade com o amplicon que se ligou a sonda. Na sequência, é realizada a aquisição dos dados no Luminex, onde cada microesfera é detectada por um laser (vermelho) e a fluorescência do SAPE é detectada por outro laser (verde).^{28, 29}

Os dados são inseridos no Software HLA Fusion (One Lambda©), analisados e a tipificação HLA do paciente é determinada.

Em casos de doador falecido, o grau de compatibilidade HLA é referido em termos de número de incompatibilidades (*mismatches*) HLA. Define-se incompatibilidade como a presença de um antígeno no doador ausente no receptor, considerando os locos HLA em análise.

2.3.3 Prova cruzada por Citotoxicidade Dependente de Complemento

A prova cruzada por citotoxicidade dependente de complemento (CDC) tem sido a metodologia clássica utilizada para detectar anticorpos pré-formados no receptor contra os antígenos HLA do doador.^{3,4} Desde que Patel e Terasaki relataram em 1969 a relevância da prova cruzada pré-transplante nos resultados pós-transplante esta técnica tem sido utilizada como padrão por diversos centros transplantadores.^{11, 14 -17}

A prova cruzada por CDC consiste na reação antígeno-anticorpo entre os linfócitos do doador e o soro do receptor. Após a incubação de soro e célula, é adicionado complemento de coelho e corante (Brometo de Etídeo + Laranja de Acridina) que permite diferenciar as células mortas (coradas) e as células vivas.

Se houver anticorpos no soro do receptor, irá ocorrer a reação com os antígenos HLA nas células do doador, fixação do complemento e lise celular, em sequência o corante irá penetrar nas células lisadas, gerando uma visualização em cor laranja enquanto as células não lisadas serão visualizadas da cor verde.

A visualização destas reações é realizada em microscópio invertido de fluorescência com contraste de fase e é baseada na porcentagem de células mortas em comparação a um controle negativo (soro sem anticorpos HLA). A

interpretação dos resultados da leitura é realizada em escore de 1 a 8, sendo: escore 1=prova cruzada negativa (<10% de células mortas), escore 2=prova cruzada fracamente positiva (de 11% a 20% de células lisadas), escore 4=prova cruzada positiva (de 21% a 50% de células lisadas), escore 6=prova cruzada positiva (de 51% a 80% de células lisadas), escore 8=prova cruzada fortemente positiva (de 81% a 100% de células lisadas) (Figura 5).

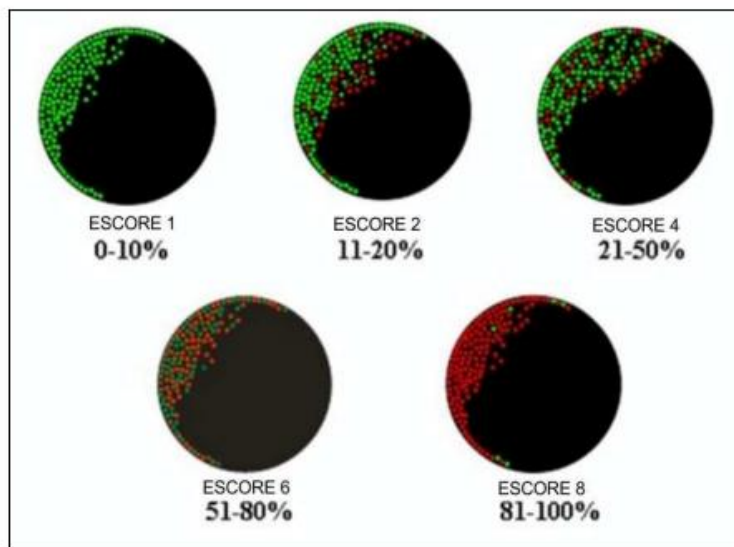


Figura 5. Leitura da prova cruzada por citotoxicidade dependente de complemento. Fonte: Gil (2013).

O teste CDC detecta anticorpos contra antígenos de classe I e de classe II, podendo ser do isotipo IgG e IgM. Para caracterizá-los, utiliza-se o agente redutor ditiotreitól (DTT) que destrói as pontes dissulfeto das moléculas de IgM, inativando-as, possibilitando a identificação da reatividade devido aos anticorpos IgG, IgM ou ambos.^{4, 10, 12}

Outro adicional do teste é o uso da antiglobulina humana (AGH), que é um anticorpo secundário que se fixa aos anticorpos do paciente aderidos aos linfócitos do doador tornando a reação mais sensível.^{21, 22}

Apesar de ser um teste referência, algumas desvantagens merecem atenção no momento da interpretação dos resultados: por ter como alvo os

linfócitos, outras moléculas irrelevantes (não HLA) podem ser detectadas, ou seja, é um teste inespecífico; auto anticorpos, imunocomplexos e alótipos de imunoglobulinas interferem neste ensaio; adicionalmente por ser um teste baseado na ativação de complemento, IgG2 de baixa avidéz e IgG4 não fixador de complemento não são detectadas.^{3, 22, 30}

Por essa razão a introdução de outros ensaios mais sensíveis e específicos, como o SA e a FCXM, foram introduzidos e ganham cada vez mais espaço e atenção na avaliação pré transplante.³⁰

2.3.4 Avaliação de Reatividade Contra Painel

O teste de reatividade contra painel (PRA - *Panel Reactive Antibody*) indica o grau de sensibilização aos antígenos HLA do receptor em relação à população de possíveis doadores, sendo expresso como um valor porcentual, podendo variar de 0% a 100%.

Historicamente, essa avaliação era feita pela técnica de CDC, onde utilizava-se um painel de linfócitos com especificidades HLA previamente definidas, soro do paciente, complemento de coelho e corate, seguida da leitura por microscopia.

Mais recentemente, com o objetivo de aumentar a sensibilidade e, principalmente, de propiciar a definição da especificidade dos anticorpos detectados, foram introduzidas metodologias de fase sólida como ELISA e LUMINEX.^{39, 40, 46}

No método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) são utilizadas placas comerciais com diferentes especificidades de antígenos HLA adsorvidos aos orifícios. Nesta placa é adicionado o soro do paciente, o anticorpo

conjugado e o corante, a leitura é feita em espectrofotômetro e a presença/ausência de ligação antígeno-anticorpo é identificada pela coloração: cor=presença de anticorpos, sem cor=ausência de anticorpos.^{28, 29}

O tecnologia Luminex é atualmente, o método mais usado para detecção de anticorpos anti-HLA, é altamente sensível e específico, tendo a capacidade de identificar anticorpos em baixos títulos. Existem três diferentes tipos de ensaios que utilizam essa metodologia: o Mixed, o PRA e o SA.^{39, 40}

Na triagem Labscreen®Mixed microesferas multicoloridas são revestidas com um “pool” de antígenos HLA de classe I e II, o resultado é apenas qualitativo e inespecífico para HLA classe I, HLA classe II e MIC-A.³⁹

No Labscreen®PRA cada microesfera é revestida com um fenótipo HLA, sendo possível determinar a especificidade HLA, mas não precisamente devido à presença de mais de um antígeno por microesfera.³⁹

No SA as microesferas são revestidas com apenas um antígeno HLA, permitindo uma definição precisa da especificidade dos anticorpos anti-HLA e em qual concentração eles são encontrados no soro de um receptor.³⁹

Nos três tipos de ensaio, o soro do paciente é inicialmente incubado com as microesferas, para que ocorra a reação antígeno-anticorpo. Posteriormente, é realizada marcação da reação com IgG de cabra anti-humano conjugado com Ficoeritrina (PE), seguida da aquisição dos dados no Luminex que utiliza um laser vermelho que reconhece a cor de cada microesfera e um laser verde que determina o resultado de acordo com a intensidade de fluorescência emitida pela PE presente na superfície de cada microesfera.³⁹

A análise dos dados é realizada no software HLA Fusion. Em nosso centro transplantador considera-se positivo, anticorpos com a média da intensidade de fluorescência (MFI) da reação maior do que 1000 (Figura 6).

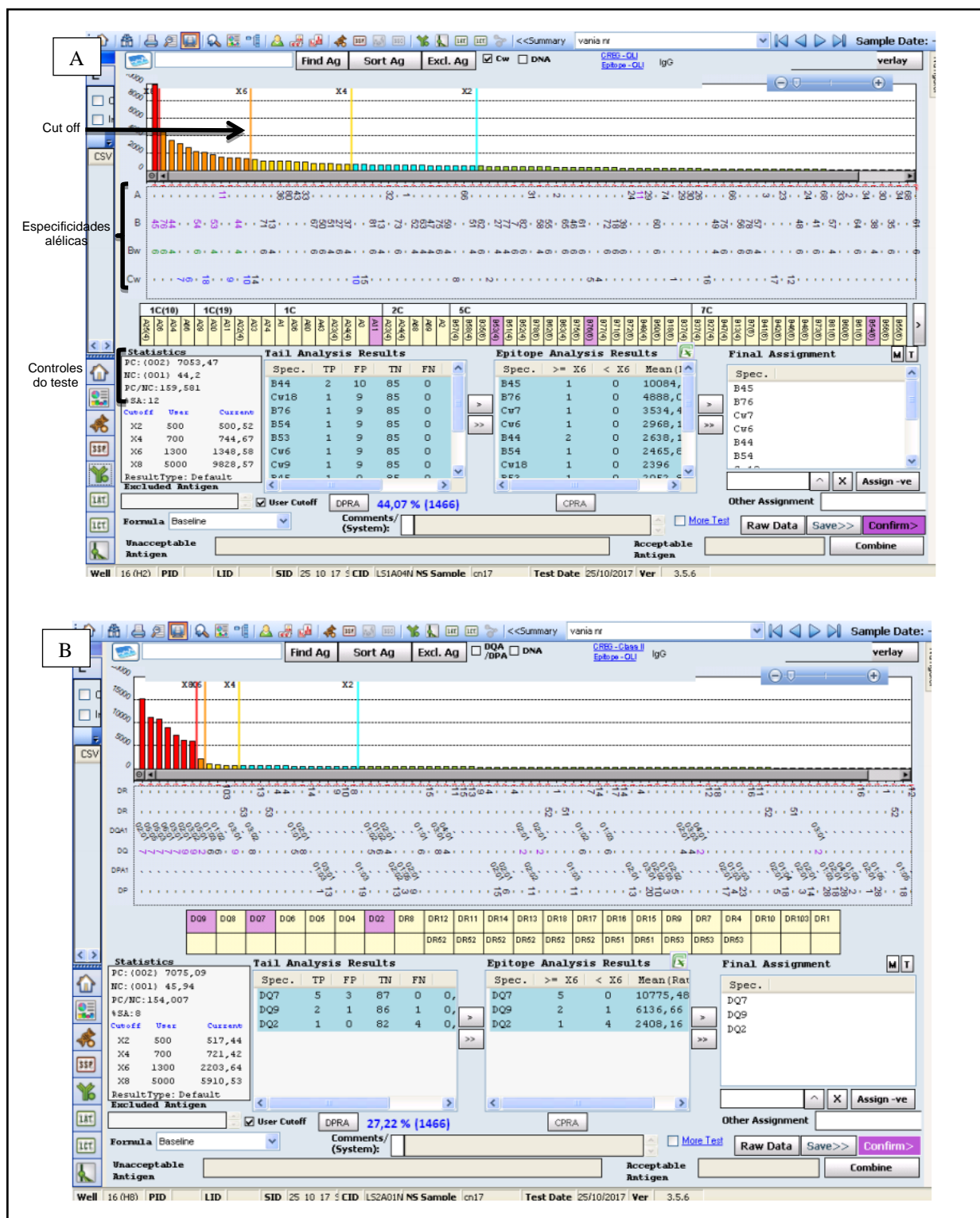


Figura 6. Análise de PRA no software HLA Fusion. (A) Análise anticorpos de classe I. (B) Análise de anticorpos de classe II. Fonte: Serviço de Imunologia (HCPA).

Nos últimos anos, o SA vem sendo utilizado para detecção do DSA. Define-se DSA quando antígenos HLA do doador são comparados com os anticorpos anti-HLA do receptor.

Ao longo dos anos diversos estudos demonstram pior sobrevida em pacientes com DSA no pré e pós-transplante, por isso essa análise vem sendo realizada rotineiramente a fim de prever os resultados das provas cruzadas por FCXM e CDC, denominada prova cruzada virtual (VXM).^{11, 41-43}

Apesar de todos os aspectos positivos que esta moderna tecnologia proporciona, o teste SA possui algumas limitações que merecem atenção no momento da interpretação combinada com os testes de célula: a concentração dos antígenos HLA na superfície das *beads* podem variar e não representam a quantidade de antígenos presentes nos tecidos do organismo humano; os anticorpos detectados pelo SA não são específicos contra a molécula HLA do doador por se tratarem de antígenos HLA purificados sintéticos; pode haver ligação inespecífica ou não haver ligação antígeno-anticorpo já que as moléculas podem sofrer distorção na conformação durante o processo de ligação às *beads*; alguns antígenos HLA (menos frequentes) podem não estar contemplados no painel de *beads*, não sendo detectados na VXM.^{44, 45}

A detecção de DSA utilizando microesferas é uma excelente ferramenta para fornecer uma medida de risco imunológico pré-transplante e diretrizes pós-transplante, permitindo um melhor acompanhamento e monitorização dos pacientes e a estratificação dos pacientes em grupos de risco (sensibilização), no entanto, a significância clínica de níveis muito baixos de DSA detectáveis somente pela tecnologia Luminex é um desafio na alocação de órgãos.⁴⁶

2.3.5 Prova cruzada por Citometria de Fluxo

Originalmente descrita por Garovoy em 1983, a FCXM vem ganhando cada vez mais espaço no monitoramento pré-transplante para demonstrar anticorpos circulantes em níveis reduzidos não detectáveis pelo teste CDC¹⁸.

Para a execução da FCXM (protocolo Halifax modificado²⁰) primeiramente deve ser realizada a perfusão de linfócitos totais do doador, essas células podem ser obtidas a partir de linfonodos, baço ou sangue total. Após obtenção, as células devem passar por um processo de ajuste de concentração (entre 5×10^6 à 10×10^6), tratamento com pronase (0,0235U/mL) e DNase (11.000U/mL). Posteriormente, estas células do doador são incubadas com os soros dos possíveis receptores.

Após incubação, são adicionados anticorpos monoclonais conjugados a moléculas fluorescentes, dirigidos contra marcadores de membrana de células T (CD3 PE) e células B (CD19 PerCP), um anticorpo secundário, também marcado por uma molécula fluorescente, IgG FITC, é adicionado para detectar o isotipo do anticorpo.

A aquisição das amostras deve ser realizada em citômetro de fluxo e a análise dos dados em *software* específico. No Serviço de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre utiliza-se, o citômetro de fluxo FACS Canto II, software FACS Diva e a escala de resolução de 1024 pontos para aquisição das amostras.

Os resultados são apresentados na forma de histograma, no qual a intensidade de fluorescência está representada no eixo horizontal (x), e a porcentagem de células com fluorescência positiva, no eixo vertical (y) (Figura 7).

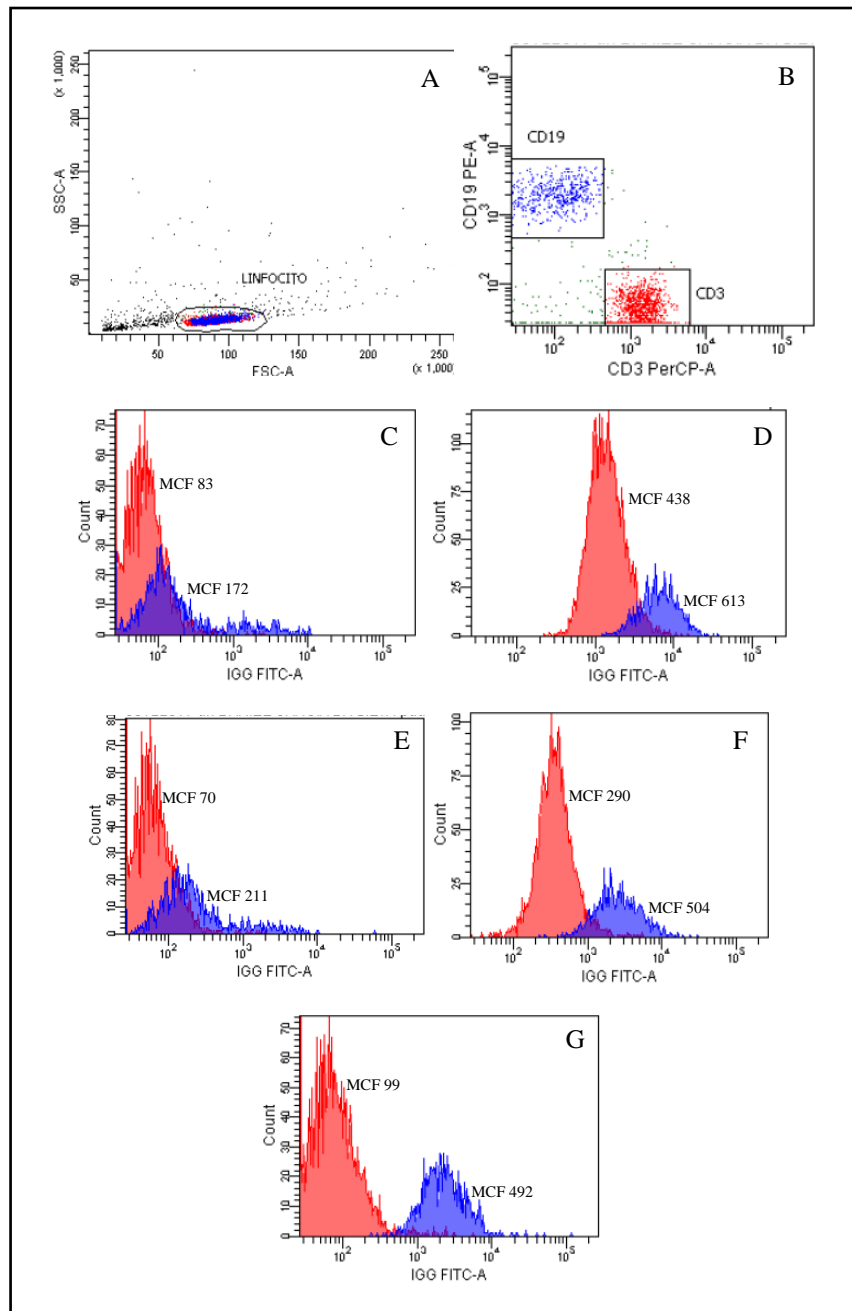


Figura 7. Resultados da prova cruzada por citometria de fluxo. (A) seleção da subpopulação linfocitária (B) seleção dos eventos CD3+ e CD19+ (C) células incubadas com soro controle negativo (D) células incubadas com soro controle positivo (E) células incubadas com soro de paciente com resultado T e B negativo (F) células incubadas com soro de paciente com resultado T e B positivo (G) células incubadas com soro de paciente com resultado T negativo e B positivo. Fonte: Serviço de Imunologia (HCPA).

Em cada soro testado, obtém-se a MCF anti-IgG FITC. Para a expressão qualitativa dos resultados, é necessário calcular o ponto de corte da reação que consiste na média da MCF do soro controle negativo da reação acrescido a um valor da MCF que corresponde à variação do soro controle negativo em 50

células, determinado previamente. Soros de pacientes com valor maior ou igual ao ponto de corte são considerados positivos.

Além da expressão qualitativa dos resultados, a FCXM permite calcular o MCS que é um parâmetro semi-quantitativo calculado a partir da subtração da MCF do paciente com a MCF do soro controle negativo.

A FCXM é um método que não depende de fixação de complemento, é menos subjetiva do que a avaliação da morte celular nos testes dependentes de complemento, já que utiliza um anticorpo secundário fluorescente para fornecer uma medida numérica dos anticorpos ligados à superfície dos linfócitos, outra vantagem da FCXM é a avaliação independente e simultânea da prova cruzada contra os linfócitos T e B, além de ser mais rápida e econômica do que o método CDC. A desvantagem é que por ser muito sensível, a relevância clínica da sua positividade ainda é um ponto de discussão na literatura.^{11, 14, 19}

A maioria das publicações apresenta melhor sobrevida do enxerto e do paciente transplantado com FCXM negativa, entretanto, a positividade a fim de excluir receptores pode ser uma desvantagem, para isso a interpretação do nível de positividade (resultado de MCS) e a avaliação combinada com a pesquisa de anticorpos pelos ensaios de fase sólida pode melhorar a interpretação de FCXM positiva, favorecendo principalmente pacientes hipersensibilizados, que comumente possuem CDC negativo e FCXM positiva.

31, 32

A falta de uniformidade da técnica e da padronização de pontos de corte da FCXM, além de gerar grande variabilidade interlaboratorial, são fatores que

dificultam o entendimento da relevância clínica e da comparação entre diferentes estudos.

Quanto à uniformidade da técnica, em 2012 iniciou-se um movimento que vem apresentando resultados promissores, na ocasião, Liwski e colaboradores²⁰ testaram a eficiência de um protocolo padronizado para a FCXM, denominado protocolo Halifax.

Essa padronização incluiu 13 laboratórios participantes do Controle de Qualidade Canadense. Em um primeiro momento, os laboratórios foram convidados a realizar as FCXM em soros e células conhecidos utilizando o protocolo laboratorial estabelecido em cada centro. O autor conclui que a quantidade de células e volume de soro foram os principais fatores relacionados à variabilidade interlaboratorial. No segundo momento, os laboratórios realizaram FCXM utilizando o protocolo otimizado padronizado pelo grupo do autor, nesta fase, os autores observaram significativa melhora na consistência dos resultados entre os laboratórios.

A referida padronização incluiu ajustes na quantidade de célula, volume de soro, tempos reduzidos de incubações e lavagens, e a utilização de reagentes comuns como pronase, DNase e anti-IgG FITC. Os autores concluíram que o protocolo padronizado e otimizado proposto, permite a identificação do risco imunológico pré-transplante de uma maneira mais precisa e possibilita, por consequência, a distribuição de órgãos de maneira mais equitativa.

Quanto à padronização de pontos de corte, na literatura não há uma evidência clara de como estabelecer e aplicar pontos de corte para a FCXM. São utilizados valores de positividade de MCS entre >40 para células T e >60

para células B; ³³ até valores de ≥ 150 e ≥ 250 para células T e B, respectivamente.³⁴ O manual da ASHI sugere valores aproximados de $>40-60$ para células T e $>100-120$ para células B.¹⁹ Ambos os estudos citados consideram uma escala de 1024 canais de detecção.

No entanto, um fator importante na determinação de pontos de corte, é o fato de que os valores da FCXM apresentam “*Center Effect*”, ou seja, valores que podem ser um sinal de alto risco imunológico em um centro transplantador, podem não ser em outro. Portanto, é importância que cada laboratório e equipe transplantadora definam os seus valores, a fim de estabelecer uma interpretação adequada dos resultados e dos impactos clínicos da FCXM no transplante renal.²⁰

3 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. TOMAS, Z. W.; PIOTR, S. A trial of objective comparison of quality of life between chronic renal failure patients treated with hemodialysis and renal transplantation. *Ann Transplant.* 2003; 8: 47-53.
2. Registro Brasileiro de Transplantes. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado. Ano XXIII Nº 4. 2017. Disponível em: <<http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2017/rbt-imprensa-leitura-compressed.pdf>>. Acesso em: MAR/2018.
3. ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular.* 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
4. CAI, J.; TERASAKI, P. I. Human Leukocyte Antigen Antibodies for Monitoring Transplant Patients. *Surgery Today.* 2005; 35: 605-612.
5. ABOU EL FETTOUH, H.; COOK, E.; BISHAY, S.; et al. Association between a positive flow cytometry crossmatch and the development of chronic rejection in primary renal transplantation. *Urology.* 2000; 56 (3): 369-372.
6. BILLEN, E.; VOORTER, C.; CHRISTIAANS, M. et al. Luminex donor-specific crossmatches. *Tissue Antigens.* 2008; 71: 507-513.
7. British Society for Histocompatibility & Immunogenetics and British Transplantation Society. Guidelines for the detection and characterisation of clinically relevant antibodies in allotransplantation. Version 3.0. 2014.
8. TORESAN, R.; MANFRO, R. C.; PROENÇA, M.; et al. Association Between the Presence of Anti-HLA Antibodies With Acute Rejection and Chronic Allograft Nephropathy in the First Year After Kidney Transplantation. *Transplantation Proceedings.* 2008; 40: 718-719.
9. HOSHINO, J.; EVERLY, M. J.; KANEKU, H.; et al. Impact of the Presence and Duration of Donor-Specific Antibodies on Renal Function. *Transplantation Proceedings.* 2014; 46: 75-80.
10. ENG, H. S.; BENNETT, G.; TSIPELAS, E.; et al. Anti-HLA Donor-Specific Antibodies Detected in Positive B-Cell Crossmatches by LuminexR Predict Late Graft Loss. *American Journal of Transplantation.* 2008; 8: 2335–2342.
11. TERASAKI, P. I.; OZAWA, M. Predicting Kidney Graft Failure by HLA Antibodies: a Prospective Trial. *American Journal of Transplantation.* 2004; 4: 438–443.
12. NEUMANN, J.; FILHO, M. A.; DURO, V. et al. *Transplante de órgãos e tecidos.* São Paulo: Sarvier, 1997.

13. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch in kidney transplantation. *New England Journal of Medicine*. 1969; 280: 735-739.
14. LOBASHEVSKY, A. L. Methodological aspects of anti-human leukocyte antigen antibody analysis in solid organ transplantation. *World Journal of Transplantation*. 2014; 4(3): 153-167.
15. PATEL, A. M.; PANCOSKA, C.; MULGAONKAR, S.; et al. Renal transplantation in patients with pre-transplant donor-specific antibodies and negative flow cytometry crossmatches. *American Journal of Transplantation*. 2007; 7: 2371–2377.
16. KUPATAWINTU, P.; TATAWATORN, A.; PREMASATHIAN, N.; et al. Association between flow cytometric crossmatching and graft survival in Thai cadaveric-donor kidney transplantation. *Asian Pacific Journal Allergy Immunology*. 2016; 34:86-93.
17. O'ROURKE, R. W.; OSORIO, R. W.; FREISE, C. E.; et al. Flow cytometry crossmatching as a predictor of acute rejection in sensitized recipients of cadaveric renal transplants. *Clinical Transplantation*. 2000; 14: 167–173.
18. LEE, P. P.; GAROVOY, M. R. Flow Cytometry Crossmatching: The First 10 Years. *Transplantation Reviews*. 1994; 8: 1-14.
19. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. ASHI Laboratory Manual. 4 ed. v.1. 2000.
20. LIWSKI, R. S.; POCHINCO, D.; TINCKAM, K.; et al. Going With The Flow, Canadian Crossmatch Standardization. *Human Immunology*. 2012; 73: 28.
21. MANFRO, R. C.; NORONHA I. L.; PACHECO, A.; et al. Manual do Transplante Renal. 2 ed. São Paulo: Manole, 2014.
22. KINDT, T. J.; GOLDSBY, A. R.; OSBORNE, B. A.; et al. Kuby Immunology. 6 ed. New York: W.H. Freeman, 2007.
23. Immuno Polymorphism Database. IDP-IMGT/HLA Estatistics. Disponível em: <<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>>. Acesso em 15 de julho de 2017.
24. PHILLIPS, B. L. & CALLAGHAN, C. The immunology of organ transplantation. *Surgery*. 2007.
25. KATSUMA, A.; YAMAKAWA, T.; NAKADA, Y.; et al. Histopathological findings in transplanted kidneys. *Renal Replacement Therapy*. 2017. 3: 6.
26. HAAS, M.; SIS, B.; RACUSEN, L.; et al. Banff 2013 meeting report: Inclusion of C4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *American Journal of Transplantation*. 2014; 14: 272–283.

27. BUNCE, M.; O'NEILL, C.; BARNARDO, M.; et al. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens*. 1995; 46: 355-367.
28. ONE LAMBDA[®], CANOGA PARK, CA. LABScreen[®] Single Antigen. Material de apoio suporte técnico científico. Disponível em: <<http://www.onelambda.com>>. Acesso em 22 de outubro de 2017.
29. BIOMETRIX DIAGNÓSTICA. LABScreen[®] Single Antigen. Material de apoio suporte técnico científico. Disponível em: <<http://www.biometrix.com.br>>. Acesso em 22 de outubro de 2017.
30. HAQUE, W. M. M. & ROHIM, M. A. Cross-matches in T ransplantation: Each is Complementary to Other. *Birdem Med Journal*. 2016; 6(2): 118-126.
31. SÜSAL, C. & OPELZ, G. Options for Immunologic Support of Renal Transplantation Through the HLA and Immunology Laboratories. *American Journal of Transplantation*. 2007; 7: 1450–1456.
32. DELGADO, J. C. & ECKELS, D. D. Positive B-cell only flow cytometric crossmatch: Implications for renal transplantation. *Experimental and Molecular Pathology*. 2008; 85: 59–63.
33. 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. *Transplantation Proceedings*. 2005; 37: 2750-2752.
34. ELLIS, T. M.; SCHILLER, J. J.; ROZA, A. M.; et al. Diagnostic accuracy of solid phase HLA antibody assays for prediction of crossmatch strength. *Human Immunology*. 2012; 73: 706-710.
35. Mallon, D. H.; SUMMERS, D. M.; BRADLEY, J. A.; et al. Defining Delayed Graft Function after Renal Transplantation: Simplest Is Best. *Transplantation*. 2013; 96(10): 885-889.
36. Azevedo, L. S.; CASTRO, M. C. R.; MONTEIRO DE CARVALHO, D. B.; et al. Incidence of Delayed Graft Function in Cadaveric Kidney Transplants in Brazil: A Multicenter Analysis. *Transplantation Proceedings*. 2005; 37(6): 2746-2747.
37. OJO, A. O.; WOLFE, R. A.; HELD, P. J.; PORT, F. K.; et al. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation*. 1997; 63(7): 968-974.
38. KO, E. J.; YU, J. H.; YANG, C. W.; et al. Clinical outcomes of ABO- and HLA-incompatible kidney transplantation: A nationwide cohort study. *Transplant International*. 2017.

39. PICASCIA, A.; INFANTE, T.; NAPOLI, C. Luminex and antibody detection in kidney transplantation. *Clinical Exp. Nephrology*. 2012; 16: 373-381.
40. TAIT, B. Solid phase assays for HLA antibody detection in clinical transplantation. *Current Opinion in Immunology*. 2009; 21: 573-577.
41. HOSHINO, J.; EVERLY, M. J.; KANEKU, H.; et al. Impact of the presence and duration of donor-specific antibodies on renal function. *Transplant Proceedings*. 2014; 46: 75-80.
42. MORRIS, G. P.; PHELAN, D. L.; JENDRISAK, M. D.; et al. Virtual crossmatch by identification of donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies by solid-phase immunoassay: A 30-month analysis in living donor kidney transplantation. *Human Immunology*. 2010; 71: 268–273.
43. LOCKE, A. F.; ZHANG, Q.; REED, E. F.; et al. OR7 The UCLA virtual crossmatch exchange. *Abstr/Human Immunology*. 2016; 77: 7.
44. SULLIVAN, H. C.; LIWSKI, R. S.; BRAY, R. A.; et al. The Road to HLA antibody evaluation: Do not rely on MFI. *American Journal of Transplantation*. 2017; 17(6): 1455-1461.
45. JUCAUD, V.; RAVINDRANATH, M. H.; TERASAKI, P. I. Conformational Variants of the Individual HLA-I Antigens on Luminex Single Antigen Beads Used in Monitoring HLA Antibodies. *Transplantation*. 2017; 101: 764-777.
46. GIL, B. C.; KULZER, A. S. S.; MORAES, P.; et al. Comparative analysis of two methods to detect donor-specific anti-HLA antibodies after kidney transplant. *Transplant Immunology*. 2018.

4 OBJETIVO

4.1 Geral

O presente estudo tem como objetivo definir pontos de corte de MCS baseado em correlação inter-técnicas e desfechos clínicos pós-transplante renal para o uso semi-quantitativo da FCXM.

4.2 Específicos

- Verificar as características diagnósticas da FCXM em relação ao CDC.
- Analisar a relevância clínica da FCXM no transplante renal.
- Avaliar a sobrevida do enxerto e do pacientes em um ano.
- Analisar incidência de rejeição humoral e celular.

5. ARTIGOS ORIGINAIS

5.1 Artigo 1 (versão inglês)

Accuracy of the median channel shift in the flow cytometry for predicting complement dependent cytotoxicity crossmatching in kidney transplant candidates

Priscila de Moraes^{1,3}, Iara Fagundes¹, Jacqueline Moraes Cardone¹, Beatriz Chamun Gil¹, Adriane Stefani Silva Kulzer¹, Riad Abdel Hadi², Roberto Ceratti Manfro^{2,4}, Luiz Fernando Jobim^{1,3}

¹ Immunology Service - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

² Nephrology Service - Hospital de Clinicas de Porto Alegre

³ Postgraduate program in Medicine: Surgery Sciences - UFRGS

⁴ Postgraduate program in Medicine: Medical Sciences - UFRGS

Communication with author: Immunology Service - Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, 2350 - 90035903, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, tel +555133598020, priscila.moraes92@gmail.com.

Conflict of Interest: none

Abbreviations: CDC, complement-dependent cytotoxicity; FCXM, flow cytometric crossmatch; MCS, median channel shift; SA, single antigen; DSA, donor specific antibodies; HLA, human leukocyte antigen; MFI, mean fluorescence intensity; DTT, dithiothreitol; AGH, anti-human globulin; AUC, area on the ROC curve; PCR-SSP, polymerase chain reaction - sequence specific primer; CI, confidence interval; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

ABSTRACT

Crossmatching either by complement-dependent cytotoxicity (CDC) and/or by flow cytometry (FCXM) are routinely used for assessing anti-HLA donor antibodies before kidney transplantation. FCXM has demonstrated greater sensitivity and many transplant centers have opted for its use without the concomitant CDC assay. The objective of this study was to evaluate the accuracy of the median channel shift (MCS) in the FCXM in predicting the CDC assay results. A total of 1516 T cell FCXM and 1408 B cell FCXM were studied in deceased donors lymphocytes between January/2016 and March/2017. The high detection rate of CDC+ results by FCXM+ resulted in 87% (FCXM-T) and 90% (FCXM-B) sensitivity, and 98% negative predictive value, for both. The low specificity of FCXM B (43%) is attributed to cases of CDC-/FCXMB+. FCXM T and B were able to detect 53% and 76% of cases with donor specific antibodies of classes I and II with intensity of fluorescence ≥ 5001 . The MCS differentiated CDC+ (Md, P25 and P75) results: MCS-T 390 (245-469) and MCS-B 282 (180-350). Through ROC curve analysis (AUC), the MCS showed satisfactory performance in detecting CDC+: MCS-T 0.909 (0.886-0.933) and MCS-B 0.775 (0.724-0.826). Considering the accuracy and sensitivity evaluation, the MCS-T 245 and MCS-B 282 cutoffs showed a better prediction of CDC+. This study showed that it is possible to calibrate MCS based on CDC+ with accuracy greater than 90%, however, that leads to a risk in terms of non-detection of low-titer anti-HLA antibodies.

Keywords: flow cytometry; median channel shift; kidney transplantation.

1. INTRODUCTION

The complement-dependent cytotoxicity crossmatch (CDC) is still the gold standard technique for the pre-transplant evaluation of anti-donor antibodies in kidney transplantation its positivity contraindicates transplantation due to its strong association with hyperacute rejection (1–3).

The flow cytometry crossmatch (FCXM) is also widely used for the evaluation of the pre-transplant immunological risk with an admittedly higher analytical sensitivity (3–5). As it is an automated technique, the definition of FCXM results is less prone to subjectivity than the assessment of cell death, as it occurs in CDC and presents good association with other tests such as solid phase assays (2,5,6). The shorter technical execution time of the FCXM allows agility in the process of choosing the kidney recipient and consequently reduction of the cold ischemia time. In addition, not running CDC and FCXM crossmatches in the same evaluation reduces the number of tests and use of patient's sera. For these reasons, in the last decade many transplant centers, especially in North America, have chosen to replace the CDC relying only in the FCXM. However, this strategy bring out difficulties in interpreting the positive results, that are more frequent than in the CDC assays, but that do not necessarily contraindicate the transplantation (2,5,7).

Studies evaluating CDC versus Single Antigen (SA) and FCXM versus Single Antigen in the context of virtual crossmatch are available in the literature, however studies evaluating the CDC versus FCXM are scarce.

To our knowledge, only one study used the results of the CDC to define MCS cutoffs in the liver transplant scenario (8).

Therefore, we have evaluated the accuracy of the relationship between CDC and FCXM using the FCXM's median channel shift (MCS) measurement to predict CDC results.

2. MATERIALS AND METHODS

Study population

This is a retrospective study involving deceased donor kidney transplantation candidates at the Immunology Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A total of 1705 crossmatches were tested in sera from 418 patients with different anti-HLA (human leukocyte antigen) antibodies levels against 237 donors lymphocytes, from January 2016 to March 2017. All sera were tested by FCXM, CDC and SA assays as described bellow.

Complement-Dependent Cytotoxicity crossmatch

CDC crossmatch was performed between donor T and B lymphocytes and recipient sera with and without dithiothreitol (DTT), according to guidelines of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (2). CDC T had its sensitivity increased by the addition of Anti-Human Globulin (AGH). The reaction was visualized in an inverted phase microscope, and in the presence of $\geq 20\%$ cell death the test was considered positive.

Out of the 1705 crossmatches CDC studied, 93 (5.4%) results were excluded from the analysis due to technical reading impossibility. For the purpose of this study, the following groups were analyzed: CDC T-/B- (n = 1312), CDC T+/B+ (n= 204) and only CDC T-/B+ (n= 96).

Flow cytometric crossmatch

FCXM was performed by using a modified Halifax (9) protocol (pronase concentration 0.0235U/mL). 50 µl of serum from the recipient and 25 µL of donor lymphocyte suspension ($125 - 250 \times 10^3$ cells) were incubated for 15 minutes at room temperature. After 4 washes, the reaction mixture composed of anti-CD3/PerCP (BD Bioscience, clone SK7, catalog 340663), anti-CD19/PE (Beckman Coulter, clone J3-119, ref. A07769) and Fragment F(ab')₂ anti-IgG human conjugated to FITC produced in goat (Immuno Jackson Research, reference 109-096-098) was added. After the final wash, the samples were acquired at FACS Canto II (BD Biosciences) and for data analyses, the BD FACS Diva™ software (BD Biosciences) was used in the 1024 channel scale. By prior standardization of the laboratory, T and B cytometric crossmatch was considered positive when MCS ≥ 63 and ≥ 112 FITC anti-IgG fluorescence channels, respectively. In total, 1516 anti-T lymphocytes FCXM and 1408 anti-B lymphocytes FCXM were analyzed.

Anti-HLA antibody screening

Detection of anti-HLA class I and class II IgG antibodies was performed using the LabScreen Single Antigen kit (One Lambda®) according to the manufacturer's instructions. Samples were acquired in a

Fluoroanalyzer Luminex®. Data analysis was performed using HLA Fusion 3.0 software (One Lambda®). Anti-HLA antibodies were considered present when the mean fluorescence intensity (MFI) was equal or greater than 1000.

The presence or absence of anti-HLA class I or II donor specific antibodies (DSA) was defined by the comparison of the antibodies specificity identified through SA and the HLA genotypes class I (A, B, C) and class II (DR, DQ) determined by polymerase chain reaction - sequence specific primer (PCR-SSP) in 1338 crossmatches; 367 crossmatches were not included in this analysis due to the lack of donor typing for the HLA-C and HLA-DQ loci. Additionally, when present, DSA were classified according to MFI level of ≤ 5000 and ≥ 5001 .

Statistical analyzes

CDC were used as the gold-standard for the diagnostic evaluation of the FCXM. The values of sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and accuracy as well as the relations among techniques were evaluated by using contingency tables and expressed as number of observations, percentages and 95% confidence intervals (CI). The comparison between the MCS medians of the groups CDC versus FCXM was performed by the Kruskal-Wallis test and the multiple comparisons by Dunn test with Bonferroni adjustment. To evaluate the MCS ability to predict CDC results, ROC curve analysis was built and the cutoff indication with the highest balance between sensitivity and specificity was verified by the Youden index. The confidence intervals were calculated in the WinPepi software version 11.65 and all other analyzes

were carried out in the Social Package Statistical Sciences version 18.0. The statistical significance was established at a p level <0.05 .

Ethical aspects

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre under the number 160357.

3. RESULTS

1. Diagnostic characteristics of FCXM in relation to CDC

In order to compare the positivity frequency of anti-HLA antibody detection tests as well as to determine the diagnostic characteristics of FCXM in relation to CDC, the groups CDC negative and CDC positive (T+/B+ and T-/B+) were compared with the FCXM negative and FCXM positive groups (T and B), as shown in Table 1. The frequency of positive crossmatches by CDC and FCXM anti-T lymphocytes was 13% and 28% and anti-B lymphocytes was 7% and 60%, respectively. The sensitivity of FCXM T and B was 87% and 90%, resulting in 98% NPV for both. FCXM T detected a higher number of positive results compared to CDC (17% versus 13%) and the same was observed in FCXM B (54% versus 7%), which resulted in low PPV. Among the 1312 CDC B negative crossmatches, 754 (57%) resulted positive by FCXM B accounting the low specificity observed (43%).

2. Relationship of CDC and FCXM with presence of DSA

In order to evaluate the high prevalence of CDC-/FCXM+ cases, we analyzed the association between presence and absence of DSA and the combinations of CDC and FCXM results (Tables 2 and 3). The absence of DSA class I was associated to 91.3% of the negative crossmatches for both techniques; on the other hand, 53% of cases with DSA class I ≥ 5001 were detected only by FCXM T.

Regarding the associations with DSA class II, it was observed that absence of DSA was equally prevalent between the CDC-/FCXM- and CDC-/FCXM+ groups (398/825). However, once a DSA class II was present, CDC-/FCXM+ was able to identify more cases of DSA than the CDC+/FCXM+ groups (180/263 versus 31/263).

3. Characterization of CDC/FCXM groups in relation to MCS

Because of the higher analytical sensitivity of FCXM, the median values, P25 and P75 of the MCS T and B that characterize the positive CDC were determined (Table 4). The CDC+/FCXM+ and CDC-/FCXM+ groups had statistically different MCS medians for both T and B tests (MCS T: 390 and 162; MCS B: 282 and 179). The MCS median of the CDC+/FCXM- and CDC-/FCXM- groups were not statistically different for both T and B tests.

4. Relationship between MCS and CDC values by ROC curve analysis

ROC curve analysis was performed in order to better evaluate the performance of MCS value to predict the CDC results.

As shown in the Figure 1 the cutoff point with highest youden index was a MCS of 63 channels (AUC: 0.909 (0.886-0.933)) for the T cell FCXM and 238 (AUC: 0.775 (0.724-0.826)) for the B cell FCXM.

In addition, different cutoffs were tested based on the MCS distribution of the CDC+/FCXM+ group (Table 4) and the respective diagnostic parameters are shown in Table 5. The cutoffs for MCS T= 245 and MCS B=282 were the points that showed higher accuracy without considerably impairing sensibility (Table 5).

4. DISCUSSION

Historically, the practice of kidney transplantation was based on the condition of a negative CDC crossmatch. Over time, it was observed that even the transplants performed in such condition could also evolve with unfavorable immunologic outcomes due to the presence of donor anti-HLA antibodies (1). Therefore, higher sensitivity tests for detection of anti-HLA antibodies became necessary to decrease the incidence of antibody-mediated rejections. Nowadays, in a large part of transplant centers, solid organ allocation invariably involves solid phase assays, which represents a paradigm shift as to the importance of traditional CDC assay (10–12). In that context, FCXM is a test that detects complement-fixing and non-complement-fixing antibodies and carries advantages such as increased sensitivity, automation, quicker results and lower cost. In contrast, the difficulties in the technical standardization and the high background due to antibody binding to B lymphocytes surface are limitations of the test (3). Therefore, the objective of this study was to evaluate of the MCS approach

to predict CDC results, aiming at the exclusive use of FCXM as a pre kidney transplant test.

The higher antibody detection capacity of FCXM compared to CDC was evident in this study by comparing the prevalence of positive results by FCXM and CDC. Regarding the diagnostic characteristics, the high detection rate of CDC+ results by FCXM+ resulted in good sensitivity values and, consequently, excellent NPV.

On the other hand, it was observed that 2% of the negative FCXM turned out to be CDC+. The positivity only detected by the CDC is documented in the literature and may be attributed to the susceptibility of lymphocytes from the deceased donor to rabbit complement due to time of donor lymphocyte harvest up to the timing of the crossmatching (13). Alternatively it can be caused by auto-anti-HLA antibodies IgM or IgM-anti-non-HLA antibodies, which are considered of low risk (2,14,15). Importantly, non-HLA antibodies directed at specific tissue auto-antigens expressed in endothelial and epithelial cells would not explain the CDC only positivity, since such targets are not expressed on the surface of lymphocytes (5). In addition, kidney transplantation performed in the presence of CDC AGH positive crossmatch with a negative FCXM and in the absence of DSA have been reported (14,16). Graff et al. analyzed the data reported by the United Network for Organ Sharing (UNOS) between 1995 and 2009, evaluating 24-hour, 1-year and 5-year grafts survival with living and deceased donors who presented CDC+/FCXM-. In comparison with a CDC-/FCXM- group no reduction in graft survival was observed suggesting the irrelevance of only CDC positive tests in this setting (14).

The occurrence of positive crossmatches exclusively by FCXM, resulted in low specificity and PPV. The exclusive positivity in FCXM B is widely documented in the literature, however, its clinical relevance is still controversial (7,17–21). The high background of FCXM B can be due to the binding of immunoglobulins to IgG Fc receptors expressed on the surface of B lymphocytes (22), this partly accounts for the low predictive capacity of CDC B positive found in this study. In order to clarify the high prevalence of FCXM T and B positive and CDC negative, an analysis of these results was performed with an evaluation of presence of DSA. The presence of DSA I was more associated with FCXM T tests than with CDC T+/B+, likewise the presence of DSA class II that was associated with cases of FCXM B compared to results of CDC B. In support, higher frequency of fluorescence levels of DSA classes I and II (≥ 5001) were present in FCXM T and B as compared with CDC T and B. Therefore, it seems plausible that FCXM is the safest cell test for pre-transplantation evaluation due to its sensitivity that is closer to the solid phase assays. On the other hand, we observed that the high rate of FCXM B positive in the absence of DSA class II impaired the specificity of FCXM B in relation to the CDC. Factors that may have contributed to this result include the absence of DP typing, the limitations of SA and the absence of epitope analysis (11).

MCS analysis allowed the distinction of CDC+/FCXM+ and CDC-/FCXM+ groups with little overlap in terms of T and B channel deviations (21 and 58 channels). Interestingly, the median of MCS in the CDC+/FCXM-group was not significantly different from the MCS in the CDC-/FCXM-group. In addition, the low prevalence of this result, together with the

absence of DSA classes I and II reinforces the notion that CDC positivity, in this scenario, is associated with IgM antibodies.

The ROC curve showed that the MCS presented a satisfactory performance for the prediction of CDC results, especially for FCXM T, which presented better prediction values than FCXM B. The MCS T and B points with the best balance between sensitivity and specificity were 63 and 238 channels, respectively, resulting in good accuracy values (81% and 83%). However, according to the characteristics of the CDC+/FCXM+ group (Table 4) other MCS cutoffs were tested. It was possible to observe that the MCS accuracy increases according to the cutoff value tested, increasing FCXM specificity, but with a consequent sensitivity reduction, which can be explained by the choice of a gold standard of lower analytical sensitivity. Therefore, it is possible to predict positive CDC results in terms of MCS with accuracy greater than 90%, however, this poses a risk in terms of non-detection of low titer antibodies, as evidenced by the association between FCXM and DSA. Taking this fact into account, MCS T and B values of 245 and 282, respectively, presented satisfactory diagnostic characteristics for prediction of CDC+.

Some limitations apply to this study, the results could have been strengthened by correlating the defined MCS values with post-transplant clinical data. However, only a fraction of the crossmatches resulted in transplants. Additionally, the analysis of DSA by epitopes could help elucidate the results.

In conclusion, the exclusive use of FCXM as a cell test for pre transplantation evaluation of anti-donor antibodies is feasible given the

safety in terms of predicting CDC negative results and by assessing the risk of a preformed DSA. The NPV=98% evidenced in this study demonstrates that the results of negative FCXM are truly negative when the permissible risk for transplantability is CDC-. Therefore, for this condition, FCXM's replacement of CDC becomes applicable and safe. Despite the low relationship with CDC B+, FCXM B it seems to be the most adequate test for DSA II evaluation. The semi-quantitative use of MCS T ≥ 245 and MCS B ≥ 282 for prediction of CDC positive results was demonstrated. Further studies detailing the relationship with SA are necessary to confirm the MCS values proposed in this study.

References

1. Patel R, Terasaki PI. Significance of the Positive Crossmatch Test in Kidney Transplantation. *New England Journal of Medicine*. 1969; 280: 735-739.
2. Land GA, Strothman RM, Blanck CE, et al. ASHI Laboratory Manual. *American Society for Histocompatibility and Immunogenetics*. 2000.
3. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pre-Transplant Assessment of Donor-Reactive, HLA-Specific Antibodies in Renal Transplantation: Contraindication vs. Risk. *American Journal of Transplantation*. 2003; 3:1488-1500.
4. Garovoy MR, Rheinschmidt MA, Bigos M, et al. Flow cytometry analysis: a high technology crossmatch technique facilitating transplantation. *Transplantation Proceedings*. 1983; 15: 1939-1944.
5. Tait BD, Süsal C, Gebel HM, et al. Consensus Guidelines on the Testing and Clinical Management Issues Associated With HLA and Non-HLA Antibodies in Transplantation. *Transplantation*. 2013; 95: 19-47.
6. Peräsaari JP, Jaatinen T, Merenmies J. Donor-specific HLA antibodies in predicting crossmatch outcome: Comparison of three different laboratory techniques. *Transplant Immunology*. 2018; 48: 23-28.
7. Eng HS, Bennett G, Tsiopelas E et al. Anti-HLA donor-specific antibodies detected in positive B-cell crossmatches by Luminex® predict late graft loss. *American Journal of Transplantation*. 2008; 8: 2335-2342.
8. Leonard GR, Shike H, Uemura T, et al. Liver transplantation with a strongly positive crossmatch: Case study and literature review. *Liver Transplantation*. 2013; 19: 1001-1010.
9. Liwski RS, Greenshields AL, Conrad DM, et al. Rapid optimized flow cytometric crossmatch (FCXM) assays: The Halifax and Halifaster protocols. *Human Immunology*. 2018; 79:23-38.
10. Locke AF, Zhang Q, Reed EF, et al. OR7 The UCLA virtual crossmatch exchange. *Human Immunology*. 2016; 77: 1-39.
11. Jani V, Ingulli E, Mekeel K, et al. Root cause analysis of limitations of virtual crossmatch for kidney allocation to highly-sensitized patients. *Human Immunology*. 2017; 78: 72-79.
12. Piazza A, Ozzella G, Poggi E, et al. Virtual Crossmatch in Kidney Transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2014; 46(7): 2195-2198.
13. Vaidya S, Partlow D, Susskind B, et al. Prediction of Crossmatch Outcome of Highly Sensitized Patients by Single and/or Multiple Antigen Bead Luminex Assay. *Transplantation*. 2006; 82 (11): 1524-1528.
14. Graff RJ, Xiao H, Duffy B, et al. Transplantation with Positive Complement-Dependent Microcytotoxicity Crossmatch in Contemporary Kidney Transplantation: Practice Patterns and Associated Outcomes. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2012; 23: 234-245.
15. Süsal C, Opelz G. Options for immunologic support of renal transplantation through the HLA and immunology laboratories. *American Journal of Transplantation* 2007; 7: 1450-1456.
16. Kute VB, Vanikar A V, Gumber MR, et al. Kidney transplantation with positive complement-dependent lymphocytotoxicity crossmatch with negative flow crossmatching and Luminex donor-specific antibodies. *Renal Failure*. 2013; 35(7): 1027-1030.

17. Le Bas-Bernardet SE, Hourmant M, Valentin N, et al. Identification of the antibodies involved in b-cell crossmatch positivity in renal transplantation. *Transplantation*. 2003; 75(4): 477-482.
18. Bryan CF, Wakefield M, Reese JC, et al. Renal graft survival is not influenced by a positive flow B-cell crossmatch. *Clinical Transplantation*. 2007; 21: 72-79.
19. Mahoney RJ, Taranto S, Edwards E. B-cell crossmatching and kidney allograft outcome in 9031 United States transplant recipients. *Human Immunology*. 2002; 63:324-335.
20. Graff RJ, Xiao H, Schnitzler MA, et al. The role of positive flow cytometry crossmatch in late renal allograft loss. *Human Immunology*. 2009; 70(7): 502-505.
21. Scornik JC, Clapp W, Patton PR, et al. Outcome of kidney transplants in patients known to be flow cytometry crossmatch positive. *Transplantation*. 2001; 71(8): 1098-1102.
22. Apithy M-J, Desoutter J, Gicquel A, et al. Pronase treatment improves flow cytometry crossmatching results. *HLA*. 2017;90:157-164.

Table 1. Frequencies and diagnostic characteristics of FCXM in relation to CDC.

	N total	CDC+/ FCXM+	CDC+/ FCXM -	CDC-/ FCXM +	CDC-/ FCXM -	Sensitivity/ Specificity (%)	PPV/ NPV (%)	Accuracy (%)
FCXM T	1516	178	26	254	1058	87/81	41/98	81
FCXM B	1408	86	10	754	558	90/43	10/98	46

CDC were used as gold-standard.

Complement-dependent cytotoxicity; FCXM, flow cytometric crossmatch; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

Table 2: Presence of Class I DSA in the CDC/FCXM groups

	DSA I		
	without DSA	DSA I ≤5000	DSA I ≥5001
CDC-/FCXM-			
n	758	56	11
%	91,3	31,3	5,9
(95% CI)	(89-93)	(25-38)	(3-10)
CDC-/FCXM+			
n	32	71	98
%	3,9	39,7	53,0
(95% CI)	(3-5)	(32-47)	(45-60)
CDC+/FCXM-			
n	17	3	0
%	2,0	1,7	
(95% CI)	(1-3)	(1-5)	
CDC+/FCXM+			
n	23	49	76
%	2,8	27,4	41,1
(95% CI)	(2-4)	(21-34)	(34-48)
Total	830	179	185

CDC, Complement-dependent cytotoxicity; FCXM, flow cytometric crossmatch; DSA, specific donor antibodies; CI, confidence interval.

Table 3: Presence of Class II DSA in CDC/FCXM groups

	DSA II		
	without DSA	DSA II ≤5000	DSA II ≥5001
CDC-/FCXM-			
n	398	43	7
%	48,2	31,6	5,5
(95% CI)	(45-52)	(24-40)	(2-11)
CDC-/FCXM+			
n	398	83	97
%	48,2	61,0	76,4
(95% CI)	(45-52)	(52-69)	(68-83)
CDC+/FCXM-			
n	6	1	1
%	0,7	0,7	0,8
(95% CI)	(0-2)	(0-4)	(0-4)
CDC+/FCXM+			
n	23	9	22
%	2,8	6,6	17,3
(95% CI)	(2-4)	(3-12)	(11-25)
Total	825	136	127

CDC, Complement-dependent cytotoxicity; FCXM, flow cytometric crossmatch; DSA, specific donor antibodies; CI, confidence interval.

Table 4: MCS value in CDC/FCXM groups

	CDC+/FCXM +	CDC+/FCXM-	CDC-/FCXM+	CDC-/FCXM-	p-value
MCS T					
N	178	26	254	1058	
Md (P25-P75)	390 ^a (245-469)	23 ^b (0,25-38)	162 ^a (105-266)	1 ^b (-9-11)	<0.001
MCS B					
N	86	10	754	558	
Md (P25-P75)	282 ^c (180-350)	66 ^d (43-88)	179 ^c (141-238)	61 ^d (35-87)	<0.001

^a the comparison of the medians between the CDC+/FCXM+ and CDC-/FCXM+ groups ($p= 0.02$); ^b comparison of medians between the CDC+/FCXM- and CDC-/FCXM- ($p= 0.06$) groups; ^c and comparison of the medians between the CDC+/FCXM+ and CDC-/FCXM+ groups ($p <0.001$); ^d comparing the medians between the CDC+/FCXM- and CDC-/FCXM- ($p= 1.00$) groups.

CDC, complement-dependent cytotoxicity; FCXM, flow cytometric crossmatch; MCS, Median Channel Shift; Md, median; P, percentile.

Table 5: MCS cutoffs tested by ROC curve

	n	Sensitivity (%)	Specificity (%)	NPV (%)	PPV (%)	Accuracy (%)
MCS T	1516					
63		87	81	98	41	81
162		70	90	95	53	87
245		66	94	95	63	90
390		45	99	92	84	91
MCS B	1408					
112		90	42	98	10	46
238		58	85	96	22	83
282		47	92	96	30	89
350		22	98	95	40	92

MCS, Median Channel Shift; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

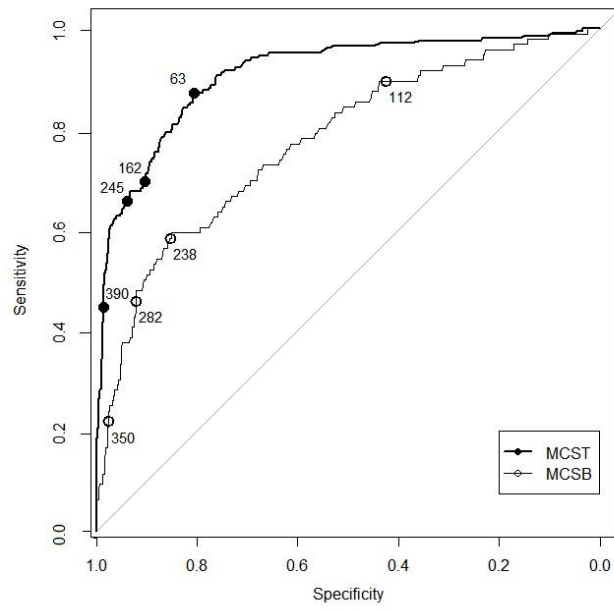


Figure 1. ROC curve analysis between MCS and CDC. MCS T vs. CDC T (n=1516) present AUC=0,909 and MCS B vs. CDC B (n=1408) present AUC=0,775.

5.2 Artigo 1 (versão português)

Acurácia diagnóstica do Median Channel Shift para predição de provas cruzadas pré-transplante renal por citotoxicidade dependente de complemento

Priscila de Moraes^{1,3}, Iara Fagundes¹, Jacqueline Cardone¹, Beatriz Chamun Gil¹, Adriane Stefani Silva Kulzer¹, Riad Abdel Hadi², Roberto Ceratti Manfro^{2,4}, Luiz Fernando Jobim^{1,3}

¹ Serviço de Imunologia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

² Serviço de Nefrologia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

³ Programa de pós-graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas - UFRGS

⁴ Programa de pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas – UFRGS

Comunicação com autor: Serviço de Imunologia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, 2350 - 90035903, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, tel +555133598020, priscila.moraes92@gmail.com.

Conflito de interesse: nenhum

Abreviações: CDC, citotoxicidade dependente de complemento; FCXM, prova cruzada por citometria de fluxo; MCS, *median channel shift*; SA, *single antigen*; DSA, anticorpos doador específico; HLA, *human leukocyte antigen*; MFI, média de intensidade de fluorescência; DTT, ditiotreitól; AGH, *anti-human globulin*; AUC, área sobre a curva ROC; PCR-SSP, *polymerase chain reaction - sequence specific primer*; IC, intervalo de confiança; VPP, valor preditivo positivo; VPN, valor preditivo negativo.

RESUMO

As provas cruzadas por citotoxicidade dependente de complemento (CDC) e/ou por citometria de fluxo (FCXM) são testes rotineiramente utilizados para avaliação do risco imunológico pré-transplante renal. A FCXM possui sensibilidade maior e muitos centros têm optado pelo seu uso exclusivo. O objetivo do estudo foi avaliar a acurácia do *median channel shift* (MCS) da FCXM em prever resultados de CDC. Um total de 1516 células T e 1408 células B foram estudadas em linfócitos de doadores falecidos entre janeiro/2016 e março/2017. A alta taxa de detecção de resultados CDC+ pela FCXM+ resultou em sensibilidade de 87% (FCXM-T) e 90% (FCXM-B), e VPN de 98%, para ambos. A baixa especificidade da FCXM B (43%) foi atribuída aos casos de CDC-/FCXMB+. As FCXM -T e B foram capazes de detectar 53% e 76% dos casos de DSAI e II com intensidade de fluorescência ≥ 5001 . O MCS diferenciou os resultados de CDC+ (Md, P25 e P75): MCS-T 390 (245-469) e MCS-B 282 (180-350). Através de análise de curva ROC (AUC) o MCS apresentou desempenho satisfatório em detectar CDC+: MCST 0,909 (0,886-0,933) e MCSB 0,775 (0,724-0,826). Considerando a avaliação da acurácia e da sensibilidade, os pontos de corte de MCS-T 245 e MCS-B 282 apresentaram melhor predição de CDC+. Este estudo evidenciou que é possível calibrar o MCS baseado no CDC+ com acurácia superior a 90%, no entanto, isso significa um risco em termos da não detecção de anticorpos de baixo título.

PALAVRAS-CHAVE: Citometria de fluxo; *median channel shift*; transplante renal.

1 INTRODUÇÃO

A prova cruzada por citotoxicidade dependente de complemento (CDC) é ainda a técnica padrão-ouro na avaliação imunológica pré-transplante renal e sua positividade contraindica o transplante devido sua forte associação com rejeição hiperaguda (1–3).

A prova cruzada por citometria de fluxo (FCXM) também é amplamente utilizada para a avaliação do risco imunológico pré-transplante, porém com sensibilidade analítica reconhecidamente maior (3–5). Por ser uma técnica automatizada, a definição dos resultados da FCXM está menos propensa a subjetividade do que a avaliação de morte celular como ocorre no CDC e apresenta boa associação com outros testes como os ensaios de fase sólida (2,5,6). Com o menor tempo de execução técnica, os benefícios decorrentes da utilização somente da FCXM estendem-se a maior agilidade no processo de escolha do receptor renal e consequente redução do tempo de isquemia fria. Além disso, a não execução de ambas as técnicas na mesma avaliação reduz o número de testes e o uso de soro do paciente. Por estes motivos, alguns centros transplantadores, em especial na América do Norte, optaram por substituir o CDC confiando apenas na FCXM. No entanto, essa estratégia traz dificuldades na interpretação dos resultados positivos que são mais frequentes que no CDC, mas que não necessariamente contraindicam o transplante (2,5,7).

Estudos avaliando CDC versus Single Antigen (SA) e FCXM versus SA no contexto de crossmatch virtual estão disponíveis na literatura, no entanto estudos avaliando CDC versus FCXM são escassos. Para nosso

conhecimento, apenas um estudo utilizou os resultados do CDC para definir pontos de corte de MCS no cenário de transplante de fígado (8).

Portanto, avaliamos a acurácia da relação entre CDC e FCXM, utilizando o *median channel shift* (MCS) da FCXM para predizer resultados de CDC.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

População de estudo

Foi realizado um estudo retrospectivo com pacientes candidatos a transplante renal com doador falecido no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foram avaliadas 1705 provas cruzadas em soros de 418 pacientes com diferentes níveis de sensibilização anti-HLA (*human leukocyte antigen*) e linfócitos de 237 doadores, no período de janeiro de 2016 a março de 2017. Todos os soros foram testados por FCXM, CDC e SA.

Prova Cruzada por Citotoxicidade Dependente de Complemento (CDC)

A prova cruzada por CDC foi realizada entre linfócitos T e B dos doadores e os soros dos receptores com e sem tratamento com *ditiotreitól* (DTT), de acordo com *guidelines* da *American Society for Histocompatibility and Immunogenetics* (2). A prova cruzada CDC T teve a sensibilidade aumentada pela adição de *Anti-Human Globulin* (AGH). A reação foi visualizada em microscópio de fase invertido e na presença de morte celular $\geq 20\%$, o teste foi considerado positivo.

Do total de 1705 provas cruzadas por CDC estudadas, 93 (5,4%) resultados foram excluídos da análise devido à impossibilidade técnica de leitura. Para o propósito deste estudo os seguintes grupos foram

analisados: CDC T-/B- (n = 1312), CDC T+/B+ (n= 204) e somente CDC T-/B+ (n= 96).

Prova cruzada por citometria de fluxo

A FCXM foi realizada a partir do protocolo Halifax (concentração da pronase 0,0235U/mL) (9). Foram incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente, 50 µL de soro do receptor e 25 µL da suspensão de linfócitos do doador (125 - 250 x 10³ células). Após 4 lavagens, adicionou-se o mix de reação composto por anti-CD3/PerCP (BD Bioscience, clone SK7, catálogo 340663), anti-CD19/PE (Beckman Coulter, clone J3-119 , referência A07769) e Fragmento F(ab')₂ anti-IgG humano conjugado a FITC produzido em cabra (Immuno Jackson Research, referência 109-096-098). Após as lavagens finais, a aquisição das amostras foi realizada no FACS Canto II (BD Biosciences) e para análise dos dados utilizou-se o software BD FACS Diva™ (BD Biosciences) na escala de 1024 canais. Por padronização prévia do laboratório, a prova cruzada por citometria T e B foi considerada positiva quando MCS ≥63 e ≥112 canais de fluorescência anti-IgG FITC, respectivamente. No total, 1516 FCXM contra linfócitos T e 1408 FCXM contra linfócitos B foram analisados.

Pesquisa de anticorpos anti-HLA

A detecção de anticorpos IgG anti-HLA de classe I e classe II foi realizada utilizando o kit LabScreen Single Antigen (One Lambda®) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram adquiridas no equipamento Fluoroanalyzer Lifematch (Tepnel Lifecodes®). A análise dos dados foi realizada no software HLA Fusion 3.0 (One Lambda®). A presença de

anticorpos anti-HLA foi considerada positiva quando a média de intensidade de fluorescência (MFI) foi maior ou igual a 1000.

A presença ou ausência de anticorpos doador específico (DSA) anti-HLA I e II foi definida de acordo com a comparação da especificidade dos anticorpos identificados através do SA e do genótipo HLA classe I (A, B, C) e classe II (DR, DQ) determinado por *polymerase chain reaction - sequence specific primer* (PCR-SSP) em 1338 provas cruzadas; não foram incluídos nesta análise 367 provas cruzadas pois os doadores não possuíam tipagem para os locos HLA-C e -DQ. Adicionalmente, quando presentes, os DSA foram classificados de acordo com o nível de MFI em ≤ 5000 e ≥ 5001 .

Análises estatísticas

O CDC foi utilizado como padrão-ouro para a avaliação diagnóstica da FCXM. Os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia, bem como as relações entre as técnicas foram avaliados por meio de tabelas de contingência e expressos como número de observações, percentual e intervalo de confiança (IC) de 95%. A comparação entre as medianas de MCS dos grupos CDC versus FCXM foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e as comparações múltiplas por teste Dunn com ajuste de Bonferroni. Para avaliar a capacidade do MCS em prever resultados de CDC foi utilizado análise de curva ROC e a indicação do ponto de corte com maior equilíbrio entre sensibilidade e especificidade foi verificada pelo índice de Youden. Os intervalos de confiança foram calculados no software WinPepi versão 11.65 e as demais análises foram realizadas no *Social Package Statistical Sciences* versão 18.0. A significância estatística estabelecida para todas as análises foi $p < 0.05$.

Aspectos éticos

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 160357.

3 RESULTADOS

1. Características Diagnósticas da FCXM em relação ao CDC

Com o objetivo de comparar a frequência de positividade dos testes de detecção de anticorpos anti-HLA bem como determinar as características diagnósticas da FCXM em relação ao CDC, os grupos CDC negativo e CDC positivo (T+/B+ e T-/B+) foram comparados com os grupos FCXM negativo e FCXM positivo (T e B), conforme mostrado na Tabela 1. A prevalência de provas cruzadas positivas por CDC e FCXM contra linfócitos T foi de 13% e 28% e contra linfócitos B foi de 7% e 60%, respectivamente. A sensibilidade da FCXM T e B foi de 87% e 90%, resultando em VPN de 98% para ambas. A FCXM T detectou maior número de resultados positivos em comparação com o CDC (17% versus 13%) e o mesmo foi observado na FCXM B (54% versus 7%), o que resultou em baixos VPP. Entre as 1312 provas cruzadas CDC B negativo, 754 (57%) apresentaram FCXM B positivo resultando na baixa especificidade observada (43%).

2. Relação de CDC e FCXM com a presença de DSAs

Com o objetivo de avaliar a alta prevalência de casos CDC-/FCXM+, analisou-se a associação entre presença/ausência de DSA e as diferentes combinações de resultados CDC e FCXM (Tabelas 2 e 3). A ausência de DSA classe I associou-se a 91,3% das provas cruzadas negativas para ambas as

técnicas; por outro lado, 53% dos casos com DSA $I \geq 5001$ foram detectados apenas pela FCXM T.

Em relação às associações com DSA classe II, observou-se que ausência de DSA foi igualmente prevalente entre os grupos CDC-/FCXM- e CDC-/FCXM+ (398/825). No entanto, uma vez detectado a presença de DSA classe II, CDC-/FCXM+ foi capaz de identificar mais casos de DSA do que os grupos CDC+/FCXM+ (180/263 versus 31/263).

3. Caracterização dos grupos CDC/FCXM em relação ao MCS

Devido a maior sensibilidade analítica da FCXM foram determinados os valores de mediana, P25 e P75 do MCS T e B que caracterizem o CDC positivo (Tabela 4). Os grupos CDC+/FCXM+ e CDC-/FCXM+ apresentaram medianas de MCS estatisticamente diferentes para ambos os testes T e B (MCS T: 390 e 162; MCS B: 282 e 179). A mediana do MCS dos grupos CDC+/FCXM- e CDC-/FCXM- não foram estatisticamente diferentes para ambos os testes T e B.

4. Relação entre valores de MCS e CDC por análises de curva ROC

A fim de avaliar o desempenho do MCS em prever resultados de CDC, foi realizada análise de curva ROC. O ponto de corte com índice de Youden mais alto foi MCS T= 63 canais (AUC: 0,909 (0,886-0,933) para FCXM-T e MCS B= 238 canais (AUC: 0.775 (0.724-0.826)) para FCXM-B (Figura 1).

Adicionalmente, foram testados diferentes pontos de corte baseados na distribuição do MCS do grupo CDC+/FCXM+ (Tabela 4) e as características diagnósticas estão mostradas na Tabela 5. Os pontos de corte para MCS T=245 e MCS B= 282 foram os pontos que apresentaram maior acurácia sem prejudicar consideravelmente a sensibilidade (tabela5).

4 DISCUSSÃO

Historicamente, a prática do transplante renal foi pautada na premissa de que provas cruzadas CDC negativas permitiam o procedimento. Com o decorrer do tempo observou-se que mesmo os transplantes realizados nesta condição também podiam evoluir com desfechos desfavoráveis, devido à presença de anticorpos anti-HLA (1). Desta forma, testes de maior sensibilidade para detecção de anticorpos anti-HLA tornaram-se necessários para diminuir a incidência das rejeições mediadas por anticorpos. Atualmente, em grande parte dos centros de transplantes, a alocação de órgãos sólidos invariavelmente envolve os resultados dos ensaios de fase sólida, o que representa uma mudança de paradigma quanto à importância do CDC (10-12). Neste contexto, a FCXM é um teste que detecta anticorpos fixadores e não fixadores do complemento, além de apresentar vantagens como maior sensibilidade, automatização, rapidez na liberação de resultados e baixo custo. Em contrapartida a dificuldade na padronização técnica e o elevado background devido à ligação dos anticorpos nos linfócitos B são limitações do teste(3). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi de prever os resultados CDC a partir do MCS, visando à utilização exclusiva da FCXM como teste de célula pré-transplante renal.

A maior capacidade de detecção de anticorpos da FCXM em relação ao CDC ficou evidente neste estudo e pode ser observada comparando-se a prevalência dos resultados positivo por FCXM e CDC. Em relação às características diagnósticas, a alta taxa de detecção dos resultados CDC+ pela FCXM+ resultou em bons valores de sensibilidade e, conseqüentemente, excelente VPN.

Por outro lado, observou-se que, dos resultados de FCXM T negativo, em 2% o CDC foi positivo. A positividade apenas detectada pelo CDC é documentada na literatura e pode ser atribuída a susceptibilidade dos linfócitos do doador renal falecido ao complemento do coelho decorrente do tempo da coleta dos linfócitos do doador e até o início da prova cruzada (13) ou causada por auto-anticorpos-HLA IgM ou IgM anti-não-HLA que são considerados de baixo risco (2,14,15). É importante ressaltar que anticorpos não-HLA dirigidos a auto-antígenos teciduais específicos expressos em células endoteliais e epiteliais não explicariam a positividade exclusiva do CDC, pois tais alvos não são expressos na superfície dos linfócitos (5). Além disso, alguns autores têm relatado que o transplante renal pode ser realizado diante de prova cruzada CDC AGH positivo desde que a FCXM seja negativa e na ausência de DSA (14, 16). Graff et al. analisaram os dados reportados ao *United Network for Organ Sharing* (UNOS) no período de 1995 a 2009, avaliando a sobrevida em 24 horas, 1 e 5 anos de transplantados com doadores vivos e falecidos que apresentaram prova cruzada CDC+/FCXM-. Este grupo, quando comparado ao CDC-/FCXM-, não apresentou redução na sobrevida do enxerto, corroborando a irrelevância de provas cruzadas exclusivamente CDC positivas (14).

A ocorrência de provas cruzadas positivas exclusivamente por FCXM resultou em baixa especificidade e VPP. A positividade exclusiva na FCXM B é amplamente documentada na literatura; no entanto a sua relevância clínica é controversa (7, 17-21). Conhecidamente, o elevado background da FCXM B pode ocorrer devido a ligação de imunoglobulinas nos receptores Fc de IgG expressos na superfície dos linfócitos B (22) o que justifica, em parte, a baixa capacidade de predição de CDC B positivo encontrada neste estudo. Com o

objetivo de esclarecer a alta prevalência de FCXM T e B positiva e CDC negativo, foi realizada uma análise conjunta destes resultados com a presença de DSA. A presença de DSA I esteve mais associada a testes FCXM T do que ao CDC T+/B+ assim como a presença de DSA II associada aos casos de FCXM B em comparação aos resultados de CDC B. Da mesma forma, maior frequência de níveis de fluorescência de DSA I e II (≥ 5001) foram detectados pela FCXM T e B em comparação aos resultados CDC T e B. Portanto, parece plausível que o FCXM seja o teste celular mais seguro para avaliação pré-transplante, devido à sua sensibilidade que está mais próxima dos ensaios de fase sólida. Por outro lado, observamos que a alta taxa de FCXM B positivos na ausência de DSA II prejudicou a especificidade da FCXM B em relação a CDC. Fatores que podem ter contribuído para este resultado incluem a ausência de tipificação DP, as limitações do SA e a ausência da análise de epítomos (11).

A análise do MCS permitiu distinguir os grupos CDC+/FCXM+ e CDC-/FCXM+ com pouca sobreposição em termos de desvios de canais T e B, (21 e 58 canais). Interessantemente, a mediana do MCS no grupo CDC+/FCXM- não foi significativamente diferente no grupo CDC-/FCXM-. Adicionalmente, a baixa prevalência deste resultado aliada a ausência de DSA I e II reforça a ideia de que esta positividade do CDC, neste cenário, está associada a anticorpos IgM.

A curva ROC demonstrou que o MCS apresenta desempenho satisfatório para a predição de resultados CDC, especialmente para FCXM T que apresentou melhores valores de predição do que a FCXM B. Os pontos de MCS T e B com maior equilíbrio entre sensibilidade e especificidade foram 63 e 238 canais, respectivamente, resultando em bons valores de acurácia (81% e

83%). No entanto, de acordo com as características do grupo CDC+/FCXM+ (tabela 4) outros pontos de corte de MCS foram testados. Foi possível observar que a acurácia do MCS aumenta conforme o valor do ponto de corte testado, beneficiando a especificidade da FCXM, porém com conseqüente redução da sensibilidade o que pode ser explicado pela escolha de um padrão-ouro de menor sensibilidade analítica. Portanto, é possível prever resultados de CDC em termos de MCS com acurácia superior a 90%, no entanto, isso significa um risco em termos da não detecção de anticorpos de baixo título, como comprovado pela associação entre FCXM e DSA. Levando em consideração este fato, os valores de MCS T e B de 245 e 282, respectivamente, apresentaram características diagnósticas satisfatórias para predição do CDC+.

Algumas limitações se aplicam a este estudo, os resultados poderiam ter sido fortalecidos pela correlação dos valores de MCS definidos com dados clínicos pós-transplante. No entanto, apenas uma fração das provas cruzadas resultou em transplantes. Além disso, a análise de DSA por epítomos poderia ajudar a elucidar os resultados.

Em conclusão o uso exclusivo da FCXM como teste de célula para a avaliação de anticorpos anti-doador pré-transplante é viável dada a segurança em termos de predição de resultados CDC negativo e pela avaliação do risco de um DSA pré- formado. O VPN = 98% evidenciado neste estudo demonstra que os resultados de FCXM negativo são verdadeiramente negativos quando o risco permissível de transplantabilidade é CDC-. Portanto, para essa condição, a substituição do CDC pela FCXM se torna aplicável e segura. Apesar da baixa relação com o CDC B+, a FCXM B parece-nos o teste mais adequado para

avaliação do DSA II. O uso semi-quantitativo do MCS T ≥ 245 e MCS B ≥ 282 para predição de resultados CDC positivo foi demonstrado. Estudos posteriores avaliando detalhadamente a relação com o SA são necessários para confirmar os valores de MCS propostos neste estudo.

Referências bibliográficas

1. Patel R, Terasaki PI. Significance of the Positive Crossmatch Test in Kidney Transplantation. *New England Journal of Medicine*. 1969; 280: 735-739.
2. Land GA, Strothman RM, Blanck CE, et al. ASHI Laboratory Manual. *American Society for Histocompatibility and Immunogenetics*. 2000.
3. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pre-Transplant Assessment of Donor-Reactive, HLA-Specific Antibodies in Renal Transplantation: Contraindication vs. Risk. *American Journal of Transplantation*. 2003; 3:1488-1500.
4. Garovoy MR, Rheinschmidt MA, Bigos M, et al. Flow cytometry analysis: a high technology crossmatch technique facilitating transplantation. *Transplantation Proceedings*. 1983; 15: 1939-1944.
5. Tait BD, Süsal C, Gebel HM, et al. Consensus Guidelines on the Testing and Clinical Management Issues Associated With HLA and Non-HLA Antibodies in Transplantation. *Transplantation*. 2013; 95: 19-47.
6. Peräsaari JP, Jaatinen T, Merenmies J. Donor-specific HLA antibodies in predicting crossmatch outcome: Comparison of three different laboratory techniques. *Transplant Immunology*. 2018; 48: 23-28.
7. Eng HS, Bennett G, Tsiopelas E et al. Anti-HLA donor-specific antibodies detected in positive B-cell crossmatches by Luminex® predict late graft loss. *American Journal of Transplantation*. 2008; 8: 2335-2342.
8. Leonard GR, Shike H, Uemura T, et al. Liver transplantation with a strongly positive crossmatch: Case study and literature review. *Liver Transplantation*. 2013; 19: 1001-1010.
9. Liwski RS, Greenshields AL, Conrad DM, et al. Rapid optimized flow cytometric crossmatch (FCXM) assays: The Halifax and Halifaster protocols. *Human Immunology*. 2018; 79:23-38.
10. Locke AF, Zhang Q, Reed EF, et al. OR7 The UCLA virtual crossmatch exchange. *Human Immunology*. 2016; 77: 1-39.
11. Jani V, Ingulli E, Mekeel K, et al. Root cause analysis of limitations of virtual crossmatch for kidney allocation to highly-sensitized patients. *Human Immunology*. 2017; 78: 72-79.
12. Piazza A, Ozzella G, Poggi E, et al. Virtual Crossmatch in Kidney Transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2014; 46(7): 2195-2198.
13. Vaidya S, Partlow D, Susskind B, et al. Prediction of Crossmatch Outcome of Highly Sensitized Patients by Single and/or Multiple Antigen Bead Luminex Assay. *Transplantation*. 2006; 82 (11): 1524-1528.
14. Graff RJ, Xiao H, Duffy B, et al. Transplantation with Positive Complement-Dependent Microcytotoxicity Crossmatch in Contemporary Kidney Transplantation: Practice Patterns and Associated Outcomes. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2012; 23: 234-245.
15. Süsal C, Opelz G. Options for immunologic support of renal transplantation through the HLA and immunology laboratories. *American Journal of Transplantation* 2007; 7: 1450-1456.
16. Kute VB, Vanikar A V, Gumber MR, et al. Kidney transplantation with positive complement-dependent lymphocytotoxicity crossmatch with negative flow crossmatching and Luminex donor-specific antibodies. *Renal Failure*. 2013; 35(7): 1027-1030.

17. Le Bas-Bernardet SE, Hourmant M, Valentin N, et al. Identification of the antibodies involved in b-cell crossmatch positivity in renal transplantation. *Transplantation*. 2003; 75(4): 477-482.
18. Bryan CF, Wakefield M, Reese JC, et al. Renal graft survival is not influenced by a positive flow B-cell crossmatch. *Clinical Transplantation*. 2007; 21: 72-79.
19. Mahoney RJ, Taranto S, Edwards E. B-cell crossmatching and kidney allograft outcome in 9031 United States transplant recipients. *Human Immunology*. 2002; 63:324-335.
20. Graff RJ, Xiao H, Schnitzler MA, et al. The role of positive flow cytometry crossmatch in late renal allograft loss. *Human Immunology*. 2009; 70(7): 502-505.
21. Scornik JC, Clapp W, Patton PR, et al. Outcome of kidney transplants in patients known to be flow cytometry crossmatch positive. *Transplantation*. 2001; 71(8): 1098-1102.
22. Apithy M-J, Desoutter J, Gicquel A, et al. Pronase treatment improves flow cytometry crossmatching results. *HLA*. 2017;90:157-164.

Tabela 1. Frequências e características diagnósticas da FCXM em relação ao CDC

	N total	CDC+/ FCXM+	CDC+/ FCXM -	CDC-/ FCXM +	CDC-/ FCXM -	Sensibilidade/ Especificidade (%)	VPP/ VPN (%)	Acurácia (%)
FCXM T	1516	178	26	254	1058	87/81	41/98	81
FCXM B	1408	86	10	754	558	90/43	10/98	46

CDC, citotoxicidade dependente de Complemento; FCXM, prova cruzada por citometria de fluxo; VPP, valor preditivo positivo; VPN, valor preditivo negativo.

Tabela 2: Presença de DSA Classe I nos grupos CDC/FCXM

	DSA I		
	Sem DSA	DSA I ≤5000	DSA I ≥5001
CDC-/FCXM-			
n	758	56	11
%	91,3	31,3	5,9
(IC95%)	(89-93)	(25-38)	(3-10)
CDC-/FCXM+			
n	32	71	98
%	3,9	39,7	53,0
(IC95%)	(3-5)	(32-47)	(45-60)
CDC+/FCXM-			
n	17	3	0
%	2,0	1,7	0
(IC95%)	(1-3)	(1-5)	
CDC+/FCXM+			
n	23	49	76
%	2,8	27,4	41,1
(IC95%)	(2-4)	(21-34)	(34-48)
Total	830	179	185

CDC, citotoxicidade dependente de Complemento; FCXM, prova cruzada por citometria de fluxo; DSA, anticorpos doador específicos; IC, intervalo de confiança.

Tabela 3: Presença de DSA Classe II nos grupos CDC/FCXM

	Sem DSA	DSA II	
		DSA II ≤5000	DSA II ≥5001
CDC-/FCXM-			
n	398	43	7
%	48,2	31,6	5,5
(IC95%)	(45-52)	(24-40)	(2-11)
CDC-/FCXM+			
n	398	83	97
%	48,2	61,0	76,4
(IC95%)	(45-52)	(52-69)	(68-83)
CDC+/FCXM-			
n	6	1	1
%	0,7	0,7	0,8
(IC95%)	(0-2)	(0-4)	(0-4)
CDC+/FCXM+			
n	23	9	22
%	2,8	6,6	17,3
(IC95%)	(2-4)	(3-12)	(11-25)
Total	825	136	127

CDC, citotoxicidade dependente de Complemento; FCXM, prova cruzada por citometria de fluxo; DSA, anticorpos doador específicos; IC, intervalo de confiança.

Tabela 4: Valor de MCS nos grupos CDC/FCXM

	CDC+/FCXM +	CDC+/FCXM-	CDC-/FCXM+	CDC-/FCXM-	Valor de p
MCS T					
n	178	26	254	1058	<0.001
Md (P25-P75)	390 ^a (245-469)	23 ^b (0,25-38)	162 ^a (105-266)	1 ^b (-9-11)	
MCS B					
n	86	10	754	558	<0.001
Md (P25-P75)	282 ^c (180-350)	66 ^d (43-88)	179 ^c (141-238)	61 ^d (35-87)	

^a comparação das medianas entre os grupos CDC+/FCXM+ e CDC-/FCXM+ (p=0.02); ^b comparação das medianas entre os grupos CDC+/FCXM- e CDC-/FCXM- (p=0.06); ^c comparação das medianas entre os grupos CDC+/FCXM+ e CDC-/FCXM+ (p<0.001); ^d comparação das medianas entre os grupos CDC+/FCXM- e CDC-/FCXM- (p=1.00).

CDC, citotoxicidade dependente de complemento; FCXM, prova cruzada por citometria de fluxo; MCS, Median Channel Shift; Md, mediana; P, percentil.

Tabela 5: Pontos de corte de MCS testados por Curva ROC

	n	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPN (%)	VPP (%)	Acurácia (%)
MCS T	1516					
63		87	81	98	41	81
162		70	90	95	53	87
245		66	94	95	63	90
390		45	99	92	84	91
MCS B	1408					
112		90	42	98	10	46
238		58	85	96	22	83
282		47	92	96	30	89
350		22	98	95	40	92

FCXM, prova cruzada por citometria de fluxo; S, sensibilidade; E, especificidade; VPP, valor preditivo positivo; VPN, valor preditivo negativo; A, acurácia.

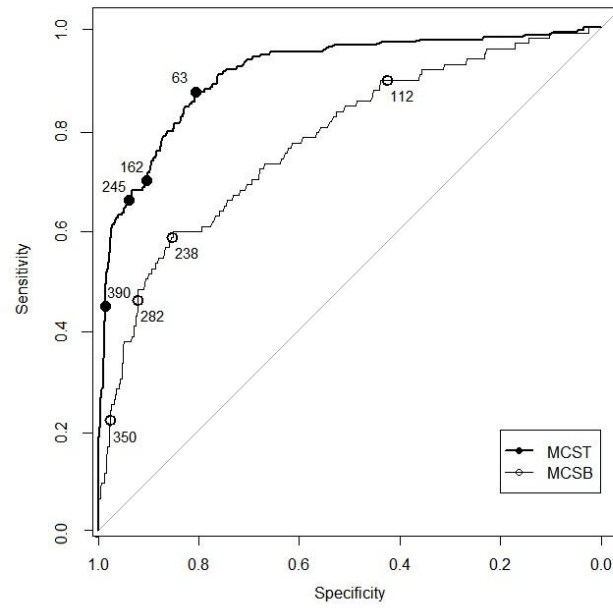


Figura 1. Análise de curva ROC entre MCS e CDC. MCS T versus CDC T (n=1516) apresentou AUC=0,909 e MCSB versus CDC B (n=1408) apresentou AUC=0,775.

5.3 Artigo 2

Relevância clínica da prova cruzada por citometria de fluxo positiva no transplante renal

Priscila de Moraes^{1,3}, Riad Abdel Hadi², Jacqueline Cardone¹, Iara Fagundes¹, Beatriz Chamun Gil¹, Roberto Ceratti Manfro^{2,4}, Luiz Fernando Jobim^{1,3}

¹ Serviço de Imunologia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

² Serviço de Nefrologia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

³ Programa de pós-graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas - UFRGS

⁴ Programa de pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas – UFRGS

Comunicação com autor: Serviço de Imunologia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, 2350 - 90035903, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, tel +555133598020, priscila.moraes92@gmail.com.

Conflito de interesse: nenhum

Abreviações: CDC, citotoxicidade dependente de complemento; FCXM, prova cruzada por citometria de fluxo; MCS, *median channel shift*; SA, *single antigen*; DSA, anticorpos doador específico; HLA, *human leukocyte antigen*; MFI, média de intensidade de fluorescência; AGH, *anti-human globulin*; PCR, *polymerase chain reaction*; SSP, *sequence specific primer*; SSO, *sequence-specific oligonucleotide*; AMR, rejeição mediada por anticorpos; DRE, disfunção retardada do enxerto; dnDSA, DSA denovo; ATG, glubulina anti-timocítica; IPC, índice proteinúria/creatinina; BX, biópsia renal.

RESUMO

A prova cruzada por citotoxicidade dependente de complemento (CDC) tem sido a técnica padrão para identificar anticorpos anti-HLA pré-transplante. A prova cruzada por citometria de fluxo (FCXM) possui sensibilidade conhecidamente maior, no entanto, a relevância clínica da sua positividade é um ponto de discussão na literatura. O propósito deste estudo foi de comparar as sobrevidas dos enxertos e dos pacientes transplantados renais com doador falecido diante de FCXM+, para tal, foram acompanhados por um ano 221 pacientes submetidos ao transplante entre janeiro/2016 e agosto/2017 no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As avaliações imunológicas pré-transplante incluíram CDC, FCXM e Single Antigen (SA). Cento e trinta e sete (66%) pacientes apresentaram FCXM- e 70 (34%) FCXM+. Apenas 30% das FCXM+ estiveram diretamente relacionadas à presença de anticorpos doador específico (DSA) pré-transplante. Não houve diferença nas sobrevidas, bem como na função dos enxertos de pacientes com FCXM+, no entanto, episódios de rejeição foram mais frequentes no grupo FCXM+ versus FCXM- (95% versus 86%, $p=0,04$). Todos os casos de rejeição mediada por anticorpos apresentaram evidência de DSA pós-transplante, apenas um caso pôde ser relacionado diretamente à DSA *denovo*. Median channel shift (MCS) e DSA pré-TX apresentaram associação para os testes de FCXM T e B ($p<0,001$ e $p=0,013$). Este estudo demonstrou que a FCXM+ em curto prazo não deve ser por si um fator impeditivo para o transplante. A análise conjunta com o SA e o nível desta positividade parece ser a forma mais coerente de seleção dos possíveis receptores.

Palavras-chave: Citometria de fluxo; *median channel shift*; transplante renal.

1 INTRODUÇÃO

Testes de histocompatibilidade são indispensáveis para viabilizar o transplante renal. Anticorpos anti-HLA (*human leukocyte antigen*) do receptor dirigido as células do órgão transplantado estão associados à rejeição e perda de enxerto. A prova cruzada por citotoxicidade dependente de complemento (CDC), descrita em 1969 por Patel e Terasaki, tem sido a técnica padrão para identificar os anticorpos anti-HLA pré-transplante, sendo a prova cruzada T considerada contra indicação absoluta ao transplante. Ao longo do tempo, este teste sofreu modificações com o intuito de aumentar a sensibilidade, tais como lavagens adicionais e uso de anti-globulina humana (AGH) [1]. O CDC possui boa correlação com desfechos clínicos, no entanto, algumas limitações merecem atenção no momento da interpretação dos resultados. Como o alvo são os linfócitos, outras moléculas irrelevantes (não HLA), auto anticorpos, imunocomplexos e alótipos de imunoglobulinas podem inespecificamente positivar o teste. Adicionalmente, por ser um teste baseado na ativação de complemento, moléculas de IgG2 com baixa avidéz e de IgG4 não fixadoras de complemento não são detectadas [2,3].

A prova cruzada por citometria de fluxo (FCXM) começou a ser utilizada em 1983 [4]. Este ensaio melhorou a sensibilidade da pesquisa de anticorpos anti-HLA já que permite a detecção de baixos títulos de aloanticorpos circulantes em pacientes que tiveram prova cruzada CDC negativa. A definição dos resultados da FCXM está menos propensa a subjetividade do que a avaliação de morte celular como ocorre no CDC, pois utiliza um anticorpo secundário fluorescente para fornecer uma medida numérica da ligação dos anticorpos na superfície dos linfócitos. Outra vantagem da FCXM é a avaliação independente e simultânea da prova cruzada contra os linfócitos T e B, além de ser mais rápida e econômica que o

CDC. No entanto, a dificuldade na padronização técnica e o elevado background devido à ligação dos anticorpos nos linfócitos B são limitações do teste.

Devido a maior sensibilidade a relevância clínica da FCXM ainda é um ponto de discussão na literatura [2,5]. Algumas publicações apresentam melhor sobrevida do enxerto e do paciente transplantado com FCXM negativa [6,7], entretanto, utilizar a positividade como critério de contraindicação ao transplante pode ser uma desvantagem, principalmente para pacientes hipersensibilizados que comumente apresentam CDC negativo e FCXM positiva [8–10]. Nesse sentido, a interpretação do nível de positividade baseado em MCS (*median channel shift*) pode auxiliar na tomada de decisão quanto à transplantação de um paciente com FCXM positiva.

Desta forma, o propósito deste estudo foi de comparar as sobrevidas dos enxertos e dos pacientes transplantados renais com doadores falecidos diante de FCXM positivas e negativas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Pacientes

Foi realizado um estudo de coorte prospectivo envolvendo 221 pacientes submetidos a transplante renal no Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre durante o período de janeiro/2016 a agosto/2017. Foram excluídos das análises os pacientes com perda precoce do enxerto de origem não imunológica (n=9), perda de acompanhamento por transferência (n=3), óbito no transoperatório (n=1) e paciente transplantado sem realização de FCXM (n=1), restando 207 pacientes elegíveis para este estudo.

As avaliações imunológicas pré- transplante foram realizadas no Serviço de Imunologia do HCPA incluindo provas cruzadas CDC, FCXM e reatividade contra

painel de células pré e em alguns casos, pós- transplante por Single Antigen (SA). As sobrevidas dos enxertos e dos pacientes foram determinadas considerando o período mínimo de seguimento de 4 meses até 1 ano.

2.2 Tipagem HLA

A tipagem HLA dos receptores para os locus HLA-A, -B e -DRB1 foram previamente realizadas por PCR-SSO (*PCR- Sequence Specific Oligonucleotide*), usando Labtype (One Lambda Inc., Canoga Park, CA). A tipagem HLA dos doadores falecidos para os locus HLA-A, -B, -Cw, -DRB1 e -DQB1 foi realizada por PCR-SSP (*PCR - Sequence Specific Primers*), usando um kit *in house* validado em nosso laboratório adaptado de Bunce et al [11]. Em alguns casos (n=21), a tipagem para os locus HLA-Cw e -DQB1 dos doadores não foi realizada.

2.3 Pesquisa de anticorpos anti-HLA

A detecção de anticorpos IgG anti-HLA de classe I e classe II foi realizada utilizando o kit LabScreen Single Antigen (One Lambda) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram adquiridas no equipamento Labscan 100 (Luminex Corporation®). A análise dos dados foi realizada no software HLA Fusion 3.0 (One Lambda®). A presença de anticorpos anti-HLA foi considerada positiva quando a média de intensidade de fluorescência (MFI) foi maior do que 1000.

A presença ou ausência de anticorpo doador específico (DSA) anti-HLA I e II foi definida de acordo com a comparação da especificidade dos anticorpos identificados pelo SA e do genótipo HLA dos locos HLA-A, -B, -Cw, -DRB1 e -DQB1

do doador renal falecido. Em 21 casos essa avaliação não pode ser realizada para os locos HLA-Cw e –DQB1.

2.4 Prova cruzada por citotoxicidade dependente de complemento

A prova cruzada por CDC foi realizada com linfócitos T e B isolados por separação magnética de acordo com o *guideline* da American Society for Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI) [2]. A prova cruzada CDC T teve a sensibilidade aumentada pela adição de AGH. A reação foi visualizada em microscópio de fase invertido; a presença de morte celular $\geq 20\%$ foi avaliada como resultado positivo. Todos os pacientes estudados tiveram prova cruzada CDC T negativa, e três apresentaram CDC B positivo.

2.5 Prova cruzada por citometria de fluxo

A prova cruzada por citometria de fluxo foi realizada a partir do protocolo Halifax [12] modificado em nosso laboratório (concentração da pronase 0,0235U/mL). Foram incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente, 50 μ L de soro do receptor e 25 μ L da suspensão de linfócitos do doador. Após 4 lavagens, adicionou-se o mix reação composto por anti-CD3/PerCP (BD Bioscience, clone SK7), anti-CD19/PE (BD Bioscience, clone J3-119) e Fragmento F(ab')₂ anti-IgG humano conjugado a FITC produzido em cabra (Immuno Jackson Research, referência 109-096-098). Após as lavagens finais, a aquisição das amostras foi realizada no FACS Canto II (BD Biosciences) e para análise dos dados utilizou-se o software BD FACS Diva™ (BD Biosciences), na escala de 1024 canais. A prova cruzada por citometria T e B foi considerada positiva quando MCS ≥ 63 e ≥ 112 canal de fluorescência anti-IgG FITC, respectivamente. O soro controle negativo utilizado

para o cálculo do MCS provem de doador masculino AB-, sem eventos de sensibilização, com painel 0% confirmado por SA.

2.6 Parâmetros clínicos

A disfunção retardada do enxerto (DRE) foi definida como a necessidade de diálise dentro da primeira semana pós- transplante. A perda de enxerto foi definida pela necessidade de retorno permanente à diálise. O diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos (AMR) foi definido por apresentação de sinal clínico, histopatologia, presença de DSA e resposta ao tratamento. Biópsias renais (BX) foram realizadas quando clinicamente indicado, os relatórios histológicos foram definidos de acordo com a classificação de Banff 2003 [13] e realizados por histopatologistas locais como parte do atendimento clínico de rotina, independente do conhecimento quanto à presença ou ausência de DSA. O primeiro episódio de AMR foi usado para construir a curva de sobrevida. Valores de creatinina sérica e IPC (Índice Proteinúria/Creatinina) foram analisados nos meses 1, 3, 6, 9 e 12, conforme tempo de seguimento.

Os protocolos de imunossupressão administrados consistiram de indução com Basiliximab ou globulina anti-timocítica (ATG) e sem indução, seguido de prednisona, micofenolato de mofetila ou sódico e inibidor de calcineurina (ciclosporina ou tacrolimus).

2.7 Análise estatística

A comparação entre as proporções dos grupos de FCXM para variáveis qualitativas (número e percentual) foi realizada pelo teste de Chi-square. Para variáveis quantitativas (mediana, P25 e P75) utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis e

as comparações múltiplas por teste Dunn com ajuste de Bonferroni. O tempo de ocorrência dos desfechos foi verificado por análise de Kaplan-Meier e a comparação entre estes fatores por Log-Rank. Todas as análises foram realizadas no *Social Package Statistical Sciences* versão 18.0, a significância estatística considerada foi de 5% ($p < 0.05$).

3 RESULTADOS

3.1 Características dos pacientes de acordo com o status da FCXM

As características demográficas e imunológicas dos 207 pacientes submetidos ao transplante renal, estratificados pelos resultados da FCXM estão listados na Tabela 1. Cento e trinta e sete (66%) pacientes apresentaram FCXM- (T-/B-) e 70 (34%) FCXM+, destes 5 (7%) eram T+/B+, os demais T-/B+. O percentual de PRA de classe II foi maior no grupo FCXM+ ($p=0,006$). DSA pré- transplante esteve presente em ambos os grupos e a ausência de DSA foi mais prevalente na FCXM- ($p=0,03$). As demais características demográficas foram igualmente prevalentes entre os grupos, exceto a mediana do tempo em diálise, que foi menor no grupo FCXM+ ($p=0,003$).

3.2 Resultados clínicos e imunológicos pós-transplante de acordo com a FCXM

Analisando os dados clínicos pós- transplante não foi possível estabelecer relação entre o grupo FCXM+ e piores desfechos em um ano de acompanhamento. Os níveis de Creatinina sérica, IPC, e a prevalência de DRE não foram diferentes entre os grupos.

Quarenta pacientes (19%) foram transplantados sem terapia de indução, estes pacientes estiveram mais frequentemente relacionados à FCXM-. Entre os pacientes que receberam terapia de indução, em 45 (22%) foi administrado Basiliximab e 122 (59%) ATG. Pacientes com FCXM+ receberam mais frequentemente terapia de indução com ATG, 51 (73%) ($p=0,01$) (tabela 2).

Biópsias que evidenciaram episódios de rejeição (celular, humoral e borderline), embora sem diferença estatística, foram mais frequentes no grupo FCXM+. Na análise de Kaplan-Meier observou-se que as médias de tempo de ocorrência dos episódios de rejeição diferem nos grupos de FCXM- e FCXM+, respectivamente, 95% versus 86% ($p=0,04$) (figura 1A). No entanto quando analisado apenas os eventos de AMR essa diferença não permaneceu (99% versus 95%, $p=0,08$) (figura 1B).

Interessantemente todos os casos de AMR tinham evidência de DSA no pós-transplante, apenas um caso pôde ser relacionado diretamente a DSA *denovo* (dnDSA), sendo este, o único com FCXM- no pré-transplante (tabela 3).

A sobrevida global dos 207 pacientes analisados foi de 99%, ocorreram dois casos de óbito por sepse; a sobrevida do enxerto foi de 98%, duas perdas por rins nunca funcionante e um caso de perda por fatores urológicos.

3.3 Associação de MCS e DSA

A associação entre MCS e presença/ausência de DSA pré-transplante mostrou-se significativa para ambos os testes de FCXM T e B ($p<0,001$ e $p=0,013$, respectivamente) (Figuras 2A e 2B).

Na análise par a par as medianas de MCS T foram diferentes entre o grupo sem DSA e DSA I ($p=0,012$); para MCS B os grupos sem DSA e DSA I, e os grupos

sem DSA e DSA I e II apresentaram medianas diferentes ($p=0,03$ e $p=0,04$, respectivamente).

4 DISCUSSÃO

Neste estudo, examinamos o perfil imunológico pré e pós- transplante, bem como, as características clínicas de pacientes submetidos a transplante renal que apresentaram FCXM+. Resultados de provas cruzadas CDC-/FCXM+ são amplamente documentados na literatura e facilmente explicados pela maior sensibilidade analítica da FCXM, no entanto a relevância clínica desta positividade exclusiva na FCXM é controversa [7,14–17], sendo este um fator limitante para a adoção da FCXM como único teste para avaliação imunológica pré- transplante dentro dos laboratórios de histocompatibilidade.

Neste estudo, apenas 30% das FCXM+ estiveram diretamente relacionadas à presença de DSA pré- transplante. Valor semelhante foi descrito por Le Bas-Bernardet et al. onde demonstraram que somente 23% das FCXM+ eram decorrentes de anticorpos anti-HLA, mas quando presentes, a sobrevida destes pacientes foi mais baixa em relação aos grupos FCXM+/semDSA e FCXM-/semDSA [14]. Neste sentido, o uso da FCXM+ para contraindicar o transplante pode ser potencialmente prejudicial para pacientes que a FCXM seja positiva sem o indicativo da presença de DSA. Por outro lado, é importante certificar-se de que todas as especificidades foram cuidadosamente investigadas, visto que o SA padrão pode não contemplar todos os antígenos HLA (menos frequentes) capazes de positivar uma FCXM [18,19]. Além disto, a positividade da FCXM na ausência de DSA de classe I e/ou II pode ocorrer devido ao o elevado background da FCXM B decorrente da ligação de imunoglobulinas nos receptores Fc de IgG expressos na

superfície dos linfócitos B, por auto-anticorpos, análise incompleta da tipagem HLA do doador e a não realização da análise de epitopos [7,20].

Mahoney et al em um estudo multicêntricos avaliaram a relevância da FCXM B positiva em 9031 transplantes com dados fornecidos pela UNOS. Esse estudo indicou que 17,7% dos pacientes com FCXM B positiva apresentaram perda precoce do enxerto em comparação com 9,4% com FCXM negativo ($p < 0,001$) [7]. Em contra partida, Johnson et al demonstraram que transplantados com FCXM+ apresentam resultados semelhantes aos com FCXM-, este grupo avaliou 508 receptores renais, nos quais a incidência de AMR em ano foi de 13% para FCXM+ e 12% para FCXM- ($p=0,85$) [9].

Nosso estudo não revelou diferença na sobrevida do paciente e do enxerto, bem como na função do enxerto de pacientes transplantados com FCXM+, em comparação aos transplantados com FCXM-. No entanto, episódios de rejeição foram mais frequentes no grupo FCXM+, em comparação ao grupo FCXM- (95% versus 86%, $p=0,04$). Quando analisados apenas os casos de AMR, essa diferença foi mais sutil, demonstrando apenas uma tendência (99% versus 95%, $p=0,08$). Acreditamos que o número pequeno de casos tenha limitado essa análise. Em uma coorte similar a deste estudo, Kupatawintu et al demonstraram a relação da FCXM+ e incidência de AMR, em um ano descreveram 10 casos de AMR, sendo que destes, 3 apresentaram FCXM T+/B+ e 1 apresentou FCXM T+/B-. No entanto, ressaltam que nem toda FCXM+ resulta em AMR e defendem a análise conjunta com outros testes de detecção de ac anti-HLA [21].

Entre os casos de AMR descritos neste estudo, três possuíam evidência de DSA pré-transplante e MCS superior a 173 canais de fluorescência. Destes, um paciente manteve o DSA pré-transplante e adicionalmente desenvolveu dnDSA,

tendo apresentado MCS B=327. Houve apenas um caso de ARM com dnDSA e nesta situação a FCXM pré-transplante foi negativa. Estes achados confirmam estudos anteriores que relatam a presença de DSA como fator de risco para AMR [5,22,23].

A associação do MCS com a presença de DSA foi demonstrada. As medianas de MCS tendem a serem maiores quando o DSA está presente para ambos os testes de FCXM T e B (figura 2). A distribuição do MCS B no grupo sem DSA é bastante ampla, apresentando mediana maior que o grupo DSA II, isto pode ser explicado pelos fatores já mencionado acima, tais como, genotipagem e investigação incompleta das especificidades HLA, elevado background da FCXM B. Apesar disso, a FCXM parece ser o teste de célula mais seguro para avaliação final pré-transplante, uma vez que apresenta sensibilidade próxima aos ensaios de fase sólida.

Quanto aos valores de MCS permissíveis para a transplantabilidade, não foi possível estabelecer um valor único no qual a FCXM proveja risco aumentado para desenvolvimento de AMR. Embora os poucos casos descritos neste estudo tenham sido um fator limitante para esta análise, confirmamos que a FCXM positiva em curto prazo não deve ser por si um fator impeditivo para o transplante. A análise conjunta com o SA e o nível desta positividade parece ser a forma mais coerente de seleção dos possíveis receptores.

Referências bibliográficas

- [1] H.M. Gebel, R.A. Bray, P. Nickerson, Pre-Transplant Assessment of Donor-Reactive, HLA-Specific Antibodies in Renal Transplantation: Contraindication vs. Risk, *Am. J. Transplant.* 3 (2003) 1488-1500.
- [2] G.A. Land, R.M. Strothman, C.E. Blanck, D.L. Phelan, M.T. Hew, *ASHI Laboratory Manual*, Am. Soc. Histocompat. Immunogenet. (2000).
- [3] H.S. Eng, G. Bennett, E. Tsiopelas, M. Lake, I. Humphreys, S.H. Chang, P.T.H. Coates, G.R. Russ, Anti-HLA donor-specific antibodies detected in positive B-cell crossmatches by Luminex® predict late graft loss, *Am. J. Transplant.* 8 (2008) 2335–2342.
- [4] P.P. Lee, M.R. Garovoy, Flow Cytometry Crossmatching: The First 10 Years, *Transplantation Reviews* 8 (1994) 1-14.
- [5] P.I. Terasaki, M. Ozawa, Predicting Kidney Graft Failure by HLA Antibodies: A Prospective Trial, *Am. J. Transplant.* 4 (2004) 438–443.
- [6] A.J. Norin, M.O. Mondragon-Escorpizo, A. Brar, D. Hochman, N. Sumrani, D.A. Distant, M.O. Salifu, Poor kidney allograft survival associated with positive B cell - Only flow cytometry cross matches: A ten year single center study, *Hum. Immunol.* 74 (2013) 1304-1312.
- [7] R.J. Mahoney, S. Taranto, E. Edwards, B-cell crossmatching and kidney allograft outcome in 9031 United States transplant recipients, *Hum. Immunol.* 63 (2002) 324-335.
- [8] C. Süsal, G. Opelz, Options for immunologic support of renal transplantation through the HLA and immunology laboratories, *Am. J. Transplant.* 7 (2007) 1450–1456.
- [9] C.P. Johnson, J.J. Schiller, Y.R. Zhu, S. Hariharan, A.M. Roza, D.C. Cronin, B.D. Shames, T.M. Ellis, Renal Transplantation with Final Allocation Based on the Virtual Crossmatch, *Am. J. Transplant.* 16 (2016) 1503-1515.
- [10] J.C. Delgado, D.D. Eckels, Positive B-cell only flow cytometric crossmatch: Implications for renal transplantation, *Exp. Mol. Pathol.* 85 (2008) 59-63.
- [11] M. Bunce, C.M. O'Neill, M.C.N.M. Barnardo, P. Krausa, M.J. Browning, P.J. Morris, K.I. Welsh, Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP), *Tissue Antigens.* 46 (1995) 355–367.
- [12] R.S. Liwski, A.L. Greenshields, D.M. Conrad, C. Murphey, R.A. Bray, J. Neumann, H.M. Gebel, Rapid optimized flow cytometric crossmatch (FCXM) assays: The Halifax and Halifaster protocols, *Hum. Immunol.* 79 (2018) 28-38.
- [13] M. Haas, B. Sis, L.C. Racusen, K. Solez, D. Glotz, R.B. Colvin, M.C.R. Castro, D.S.R. David, E. David-Neto, S.M. Bagnasco, L.C. Cendales, L.D. Cornell, A.J. Demetris, C.B. Drachenberg, C.F. Farver, A.B. Farris, I.W. Gibson, E. Kraus, H. Liapis, A. Loupy, V. Nickeleit, P. Randhawa, E.R. Rodriguez, D. Rush, R.N. Smith, C.D. Tan, W.D. Wallace, M. Mengel, Banff 2013 meeting report: Inclusion of C4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions, *Am. J. Transplant.* 14 (2014) 272-283.
- [14] S.E. Le Bas-Bernardet, M. Hourmant, N. Valentin, C. Paitier, M. Giral-Classe, S. Curry, G. Follea, J.-P. Souillou, J.-D. Bignon, Identification of the antibodies involved in b-cell crossmatch positivity in renal transplantation, *Transplantation.* 75 (2003) 477–482.
- [15] C.F. Bryan, M. Wakefield, J.C. Reese, C.F. Shield, B.A. Warady, F.T.

- Winklhofer, D. Murillo, Renal graft survival is not influenced by a positive flow B-cell crossmatch, *Clin. Transplant.* 21 (2007) 72-79.
- [16] R.J. Graff, H. Xiao, M.A. Schnitzler, P. Ercole, H. Solomon, T. Pessin, K.L. Lentine, The role of positive flow cytometry crossmatch in late renal allograft loss, *Hum. Immunol.* 70 (2009) 502-505.
- [17] J.C. Scornik, W. Clapp, P.R. Patton, W.J. Van Der Werf, A.W. Hemming, A.I. Reed, R.J. Howard, Outcome of kidney transplants in patients known to be flow cytometry crossmatch positive, *Transplantation.* 71 (2001) 1098–1102.
- [18] V. Jani, E. Ingulli, K. Mekeel, G.P. Morris, Root cause analysis of limitations of virtual crossmatch for kidney allocation to highly-sensitized patients, *Human Immunol.* 78 (2016) 72-79.
- [19] A.R. Tambur, D.S. Ramon, D.B. Kaufman, J. Friedewald, X. Luo, B. Ho, A. Skaro, J. Caicedo, D. Ladner, T. Baker, J. Fryer, L. Gallon, J. Miller, M.M. Abecassis, J. Leventhal, Perception versus reality?: Virtual crossmatch - How to overcome some of the technical and logistic limitations, *Am. J. Transplant.* 9 (2009)1886- 1893.
- [20] M.-J. Apithy, J. Desoutter, A. Gicquel, E. Guiheneuf, P.-F. Westeel, A. Lesage, V. Piot, G. Choukroun, N. Guillaume, Pronase treatment improves flow cytometry crossmatching results, *HLA.* 90 (2017) 157-164.
- [21] P. Kupatawintu, A. Tatawatorn, N. Premasathian, Y. Avihingsanon, A. Leelahavanichkul, N. Hirankarn, Association between flow cytometric crossmatching and graft survival in Thai cadaveric-donor kidney transplantation, *Asian Pacific J. Allergy Immunol.* 34 (2016) 86–93.
- [22] N. Singh, A. Djamali, D. Lorentzen, J.D. Pirsch, G. Levenson, N. Neidlinger, B. Voss, J.R. Torrealba, R.M. Hofmann, J. Odorico, L.A. Fernandez, H.W. Sollinger, M. Samaniego, Pretransplant Donor-Specific Antibodies Detected by Single-Antigen Bead Flow Cytometry Are Associated With Inferior Kidney Transplant Outcomes, *Transplantation.* 90 (2010) 1079–1084.
- [23] A.M. Patel, C. Pancoska, S. Mulgaonkar, F.L. Weng, Renal transplantation in patients with pre-transplant donor-specific antibodies and negative flow cytometry crossmatches, *Am. J. Transplant.* 7 (2007) 2371–2377.

Tabela 1. Características pré-transplante dos pacientes de acordo com a FCXM

Variável	Ambos os grupos (n=207)	FCXM – (n=137)	FCXM + (n=70)	Valor de p
Idade receptor ¹	52 (43-61)	52 (42-61)	53 (42-63)	0,63
Idade doador ¹	44 (27-57)	45 (32-58)	40 (24-53)	0,13
Gênero ²				
Masculino	131	88 (64)	43(61)	0,69
Feminino	76	49 (36)	27 (39)	
Tempo em lista (meses) ¹	8 (3-22)	8 (3-22)	7 (3-19)	0,29
Tempo em diálise (meses) ¹	28 (16-51)	29 (18-59)	23 (12-36)	0,003
RAÇA ²				
Caucasiano	176	114 (83)	62 (89)	0,31
Não Caucasiano	31	23 (17)	8 (11)	
IRC ²				
HAS	59	40 (29)	19 (27)	0,86
DM	47	32 (24)	15 (21)	
Outros	101	65 (47)	36 (52)	
Status TX ²				
Primeiro TX	200	134 (98)	66 (94)	0,18
Re-TX	7	3 (2)	4 (6)	
Transfusão ²				
Neg	105	65 (47)	40 (57)	0,19
Pos	102	72 (53)	30 (43)	
Gestação ² (n=76)				
Neg	16	13 (26)	3 (11)	0,11
Pos	60	36 (74)	24 (89)	
MM ²				
0-3	109	72 (53)	37 (53)	0,97
4-6	98	65 (47)	33 (47)	
PRA Classe I (%) ¹	1 (0-21)	1 (0-17)	4 (0-34)	0,11
PRA Classe II ¹ (%)	0 (0-19)	0 (0-13)	3 (3-31)	0,006
DSA ² (n=199)				
SEM DSA	156	110 (83)	46 (70)	0,03
DSA I e/ou II	43	23 (17)	20 (30)	
TIF (horas) ¹	21 (17-25)	22 (18-25)	21 (16-26)	0,38

FCXM, prova cruzada por citometria de fluxo; IRC, diagnóstico de insuficiência renal crônica; HAS, hipertensão arterial sistêmica; DM, diabetes mellitus; MM, mismatches; PRA, reatividade contra painel; DSA, anticorpo doador específico; TIF, tempo de isquemia fria; TX, transplante.

¹ mediana (25% – 75%), intervalo interquartil.

² frequência e percentual.

Tabela 2. Características pós-transplante dos pacientes de acordo com a FCXM

Variável	Ambos os grupos (n=207)	FCXM – (n=137)	FCXM + (n=70)	Variável
DRE¹				
Não	64	41 (30)	23 (33)	0,66
Sim	143	96 (70)	47 (67)	
Imunossupressão¹				
Indução com ATG	122	71 (52)	51 (73)	0,01
Indução com Basiliximab	45	33 (24)	12 (17)	
Sem indução	40	33(24)	7(10)	
Creatinina²				
1m	1,72 (1,28-2,33)	1,80 (1,29-2,31)	1,65 (1,20-2,41)	0,59
3m	1,40 (1,10-1,88)	1,46 (1,10-1,94)	1,36 (1,10-1,85)	0,43
6m	1,43 (1,10-1,84)	1,48 (1,10-1,85)	1,36 (1,10-1,82)	0,86
9m	1,38 (1,04-1,78)	1,34 (1,04-1,74)	1,40 (1,04-1,90)	0,85
12m	1,37 (1,00-1,61)	1,38 (1,01-1,61)	1,37 (1,0-1,64)	0,89
IPC²				
1m	0,12 (0,09-0,20)	0,14 (0,09-0,21)	0,11 (0,09-0,20)	0,47
3m	0,13 (0,08-0,28)	0,13 (0,08-0,24)	0,13 (0,08-0,30)	0,71
6m	0,14 (0,08-0,27)	0,15 (0,09-0,26)	0,12 (0,08-0,38)	0,86
9m	0,15 (0,09-0,30)	0,14 (0,08-0,26)	0,16 (0,10-0,39)	0,17
12m	0,15 (0,09-0,26)	0,15 (0,09-0,27)	0,15 (0,08-0,24)	0,56
Biópsias¹ (n=58)				
Sem rejeição	42	22 (76)	20 (69)	0,16
Borderline	9	3 (10)	6(21)	
Rejeição Celular	3	3 (10)	0	
Rejeição Humoral	4	1 (4)	3 (10)	

FCXM, prova cruzada por citometria de fluxo; DRE, disfunção retardada do enxerto; ATG, globulina anti-timocítica; IPC, índice proteinúria/creatinina.

¹ frequência e percentual.

² mediana (25% – 75%), intervalo interquartil.

Tabela 3. Perfil imunológico dos pacientes que apresentaram AMR.

ID ¹	Rejeição (dia)	PRA I/II pré-TX	DSA pré-TX (MFI)	PRA I/II pós-TX	DSA pós-TX (MFI)	FCXM T/B (MCS)	Creatinina pré/pós tratamento	Tipagem HLA receptor	Tipagem HLA Doador
142	12	47/0	Sem DSA	96/24	A24 (10702)	17/102	8,6/3,7	A3,68	A24,30
					A30 (4941)			B14,15	B51,64
194	10	66/5	B35 (3305)	98/19	B35 (3122)	58/182	10,8/4,8	DR7,12	DR7,12
228	13	75/94	DQ2 (11233)	88/95	A25 (10091)	40/327	8,0/2,8	A2,3	A2,25
					B18 (1935)			B7,39	B7,35
					CW5 (1508)			DR8,15	DR7,15
					DQ2 (9450)			A2,3	A2,25
39	338	8/45	DQ9 (2972)	8/50	DQ9 (11496)	1/173	8,0/4,9	B38,44	B18,44
								DR7,16	CW5,12
									DR7,15
									DQ2,5
								A2,26	A1,31
								B7,38	B39,57
								DR13,15	DR7,16
									DQ9

ID, identificação do paciente; PRA, reatividade contra painel; DSA, anticorpo doador específico; TX, transplante; MFI, média de intensidade de fluorescência; FCXM, prova cruzada por citometria de fluxo; MCS, median channel shift; HLA, human leukocyte antigen; ATG, globulina anti-timocítica.

¹ todos os pacientes receberam indução com ATG

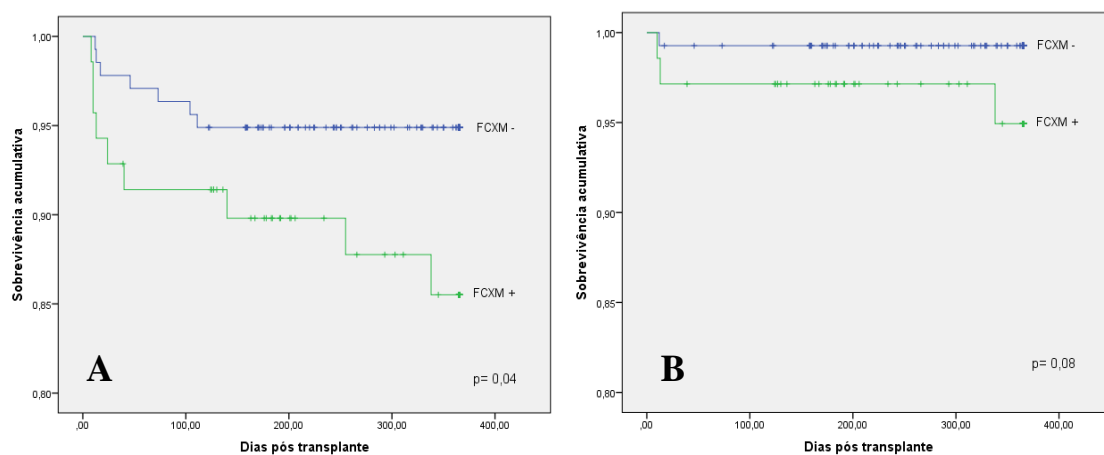


Figura 1. (A) Tempo de ocorrência de episódios de rejeição (celular, humoral e borderline). (B) Tempo de ocorrência de episódios de AMR.

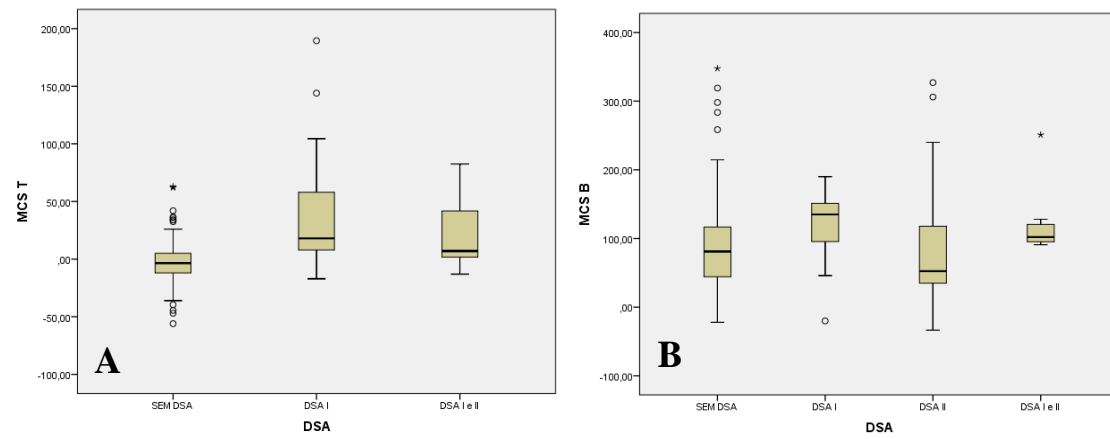


Figura 2. Associação de MCS e DSA. (A) Medianas de MCS T e DSA ($p < 0,001$): SEM DSA-DSA I ($p = 0,01$); SEM DSA-DSA I e II ($p = 0,13$); DSA I-DSA I e II ($p = 1,0$). (B) Medianas de MCS B e DSA ($p = 0,01$): DSA II-SEM DSA ($p = 1,00$); DSA II-DSA I e II ($p = 0,15$); DSA II-DSA I ($p = 0,12$); SEM DSA-DSA I e II ($p = 0,04$); SEM DSA-DSA I ($p = 0,03$); DSA I e II-DSA I ($p = 0,15$).

6. ANEXOS

ANEXO I - Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa



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

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 160357

Data da Versão do Projeto: 12/07/2016

Pesquisadores:

LUIZ FERNANDO JOB JOBIM

PRISCILA DE MORAES

IARA DOS SANTOS FAGUNDES

JACQUELINE MORAES CARDONE

RIAD ABDEL HADI

ROBERTO CERATTI MANFRO

Título: ANÁLISE QUANTITATIVA DA PROVA CRUZADA POR CITOMETRIA DE FLUXO NO TRANSPLANTE RENAL: IMPACTOS CLÍNICOS E DETERMINAÇÃO DE PONTOS DE CORTE

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 29 de agosto de 2016.


Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA

ANEXO II – Termo de compromisso para utilização de dados institucionais



Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

Termo de Compromisso para Utilização de Dados Institucionais

Título do Projeto

ANÁLISE QUANTITATIVA DA PROVA CRUZADA POR CITOMETRIA DE FLUXO NO TRANSPLANTE RENAL: IMPACTOS CLÍNICOS E DETERMINAÇÃO DE PONTOS DE CORTE	Cadastro no GPPG
---	------------------

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar as informações institucionais que serão coletadas em bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas em atividades acadêmicas e científicas, no contexto do projeto de pesquisa aprovado.

Porto Alegre, 25 de Maio de 2017.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
LUIZ FERNANDO JOB JOBIM	
PRISCILA DE MORAES	
ROBERTO CERATTI MANFRO	
JARA DOS SANTOS FAGUNDES	
JACQUELINE MORAES CARDONE	
RIAD ABDEL HADI	