



**PROGRAMA DE APRIMORAMENTO  
PROFISSIONAL**

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS

FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO  
ADMINISTRATIVO – FUNDAP



**PAULO HENRIQUE DE MELO**

**ESTUDO DA SENSIBILIZAÇÃO E DA FREQUÊNCIA DE  
ALOANTICORPOS EM PACIENTES CANDIDATOS AO  
TRANSPLANTE RENAL**

RIBEIRÃO PRETO

2010

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. BREVE HISTÓRICO DOS TRANSPLANTES

O início na prática dos transplantes ocorreu com as tentativas de transfusões sanguíneas, sendo a primeira transfusão realizada durante a Idade Média em 1443 com o Papa Inocêncio VIII, que à beira de sua morte, fez os médicos transfundirem seu sangue para três jovens na tentativa de purificá-los, tanto o papa quanto os três jovens morreram (BALESTIERI, 2006).

Em 1908, A. Carrel transplantou rins entre cães, observando um infiltrado de plasmócitos nos órgãos rejeitados, sendo que em 1923, Williamson atribui a presença de tais células à incompatibilidade biológica entre doador e receptor, já que até então todas as células de indivíduos de uma mesma espécie eram consideradas iguais (BALESTIERI, 2006).

Em 1930, na Rússia, foi realizada a primeira tentativa de transplante renal entre humanos. Dempster, em 1940, demonstrou através do transplante de pele em cães, que uma vez sensibilizado por um enxerto, quando este animal recebia um novo enxerto do mesmo doador, a rejeição ocorria mais rapidamente que a primeira, atribuindo a rejeição a um fenômeno de ordem imunológica (BALESTIERI, 2006).

O primeiro transplante bem sucedido, foi um transplante renal realizado por três médicos, em 1955, entre gêmeos idênticos, localizando-o na cavidade pélvica, dentro do abdome. A partir daí outros transplantes bem sucedidos foram realizados entre gêmeos idênticos (relação isogênica), demonstrando desta maneira que o maior empecilho estava relacionado com diferenças genéticas (BALESTIERI, 2006). Somente três anos depois, a natureza imunológica da rejeição de enxertos foi definitivamente aceita.

Em 1967, foi realizado o primeiro transplante cardíaco por Christian Barnad, na África do Sul, sendo que daí até a década de 80, a sobrevida entre receptores cardíacos era baixa (cerca de 20% nos primeiros cinco anos) e a

partir da década de 80 como a advento dos imunossupressores a sobrevida aumentou para 60% (BALESTIERI, 2006).

O Brasil ocupa uma posição de destaque em relação ao número e a diversidade de transplantes de órgãos sólidos, tecidos e células progenitoras hematopoiéticas (CPH), além de ser o segundo país em número de transplantes renais no mundo, segundo a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO). Só na última década cerca de 79.000 transplantes foram realizados no Brasil, sendo que cerca de 40% foram de órgãos sólidos e destes 80% foram renais, 14% de fígado, 4% de coração e pequenas percentagens entre: pulmão, pâncreas ou duplos. O restante deve-se aos transplantes de tecidos e células, sendo que o transplante de córnea ocupa 78% desta modalidade, o de ossos (7%) e o restante de CPH autólogo ou alogênica (VOLTARELLI *et al.*, 2009).

O estado de São Paulo concentra o maior número de equipes e realiza o maior número de transplantes de CPH e órgãos sólidos, exceto do transplante de pulmão e ossos (com mais frequência nos estados do Sul). Os órgãos sólidos para transplante são fornecidos predominantemente por doadores falecidos, porém no caso de enxertos renais, o número de doadores vivos é semelhante aos de doadores falecidos (VOLTARELLI *et al.*, 2009).

Hoje a realização de transplantes alogênicos pode ser considerada uma terapia convencional para muitas doenças humanas, principalmente em casos de doenças renais, cardíacas ou hepáticas em estágio terminal, assim como em pacientes que apresentam doenças hematológicas potencialmente fatais, como aplasia medular, algumas doenças auto-imunes, genéticas ou malignas (VOLTARELLI *et al.*, 2009).

A possibilidade de transplantes alogênicos, sem dúvidas foi uma das maiores revoluções da medicina no século passado, porém, o maior progresso ocorreu nos últimos 20 anos, com a inovação e a qualidade de drogas imunossupressoras. Porém a ocorrência das reações de rejeição desenvolvida pelo sistema imune do receptor contra o enxerto continua a representar o principal obstáculo ao sucesso de transplante de órgão e tecidos

vascularizados. Sendo que no caso de CPH o grande problema é a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). A rejeição aguda é a mais freqüente, porém na maioria dos casos consegue ser revertida com o grande arsenal de imunossuppressores no mercado, sendo que o grande desafio para a medicina moderna é a rejeição crônica, pois até hoje não tem nenhum tratamento disponível (VOLTARELLI *et al.*, 2009).

Segundo o Censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia em 2009, vem crescendo a demanda por estes procedimentos considerados de escolha para casos de falência funcional de órgãos, sendo realizados mais de 4000 transplantes renais por ano no Brasil (ALVES, 2010).

## 1.1. GENES E ANTÍGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDADE

### 1.1.1. Complexo principal de histocompatibilidade

Na época em que os primeiros transplantes foram realizados, não se sabia que as células de cada indivíduo possuem características particulares numa combinação única de proteínas, herdadas do pai e da mãe de forma co-dominante.

A função das proteínas do **complexo** (conjunto de genes altamente polimórficos) **principal** (proteínas de histocompatibilidade com maior expressão na superfície celular) **de histocompatibilidade** (primeira função dada a estas moléculas determinando a compatibilidade entre receptor e doador) foi inicialmente relacionado a rejeição de tecidos. Como o transplante não é algo fisiológico, a função fisiologia na resposta imune do MHC (*Major Histocompatibility Complex*) só foi desvendada em 1970, quando o seu papel no processamento e apresentação de antígenos para linfócitos T, foi demonstrado (BALESTIERI, 2006).

No homem, o MHC é representado pelo sistema HLA (*human leukocyte antigen*), um complexo poligênico situado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.31), contendo mais de 200 *loci* gênicos, incluindo os quase 50 *loci* principais nas chamadas regiões de classe I e II, os quais sozinhos, soma cerca de 3 mil alelos, devido a seu extremo polimorfismo, representando um alto grau de complexidade biológica. Deste modo o HLA é a região com maior densidade de genes relacionados em todo genoma humano (PONTES; SOUZA; PORTO, 2007).

Por convenção, o complexo HLA é dividido em três regiões contíguas, que congregam genes que compartilham determinadas características comuns: classe I, classe II e classe III. A região de classe I situa-se em 6p na região mais telomérica e abriga, entre outros os genes que codificam a síntese das cadeias  $\alpha$  das moléculas de classe I clássicas HLA-A, B e C. Já a classe II situa-se na região mais centromérica, abrigando genes que codificam cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  das moléculas clássicas de HLA-DR, DQ e DP, entre outros. Entre as duas regiões, situa-se a região de classe III, cujos genes codificam moléculas não-HLA, mas que estão envolvidas nas respostas imunes, tais como citocinas, fatores do complemento e proteínas do choque térmico, dentre outras (PONTES; SOUZA; PORTO, 2007).

Em termos de estruturais, as moléculas de classe I clássicas são formados por duas cadeias polipeptídicas: uma cadeia pesada  $\alpha$  de natureza glicoprotéica de 45 kDa, ancorada à membrana da célula e uma cadeia leve hidrossolúvel com 12kDa, chamada de  $\beta_2$ -microglobulina, não polimórfica codificada pelo cromossomo 15, importante para a estabilidade da molécula de classe I na membrana celular. A porção extracelular da cadeia pesada apresenta três domínios globulares, sendo os domínios variáveis  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  mais distais e  $\alpha 3$  constante mais proximal em relação a membrana, sendo que cada domínio apresenta cerca de 90 aminoácidos. A cadeia  $\alpha$  atravessa a membrana celular e possui uma cauda intracitoplasmática hidrofóbica (DAS; JANEWAY, 2003).

As moléculas de classe II consistem em um heterodímero, contendo uma cadeia globular  $\alpha$  e outra  $\beta$ , ambas ancoradas à membrana. As cadeias  $\alpha$

tem peso molecular em torno de 35 kDa, contendo domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  e a cadeia  $\beta$  possui 28 kDa, contendo domínios  $\beta 1$  e  $\beta 2$ . Assim como na classe I, os domínios mais distais são resultados do polimorfismo genético ( $\beta 1$  e  $\alpha 1$ ) contendo uma fenda que abriga os peptídeos antigênicos. Em ambas as classes, as moléculas possuem domínios conservados que interagem com linfócitos T no momento da apresentação dos antígenos, sendo que domínio  $\beta 2$  do classe II interage com co-receptor CD4 e domínio  $\alpha 3$  da classe I interage com CD8 do linfócito T, respectivo (PONTES; SOUZA; PORTO, 2007).

### **1.1.2. MICA como Antígeno secundário de histocompatibilidade:**

Os antígenos de histocompatibilidade secundários foram inicialmente definidos como os que causam uma rejeição mais lenta (rejeição crônica). Também já foram considerados como antígenos de histocompatibilidade secundários porque apresentavam características estruturais diferentes das do MHC e induziam à rejeição do tipo celular. Esses antígenos geralmente são proteínas intracelulares, como fatores nucleares de transcrição e, em princípio, qualquer molécula intracelular que apresente variação alélica pode atuar como antígenos de histocompatibilidade secundário, deste que apresentado de forma imunogênica pelo MHC (BALESTIERI, 2006).

Atualmente o antígeno de histocompatibilidade secundário mais estudado é o MIC (*MHC class I chain-related*), o qual foi descrito pela primeira vez por Tom Spies e colaboradores, em 1994. Inicialmente descrito como PERB11, o gene de MIC, foi descrito em um *locus* gênico dentro do MHC e que produzia uma glicoproteína com 30% de homologia com produtos de MHC de classe I, porém com uma distribuição tecidual diferenciada. Esses pesquisadores também observaram que quando comparados a genes não-clássicos de MHC de classe I, os genes de MIC possuíam alto polimorfismo (STEPHENS, 2001).

Os genes de MIC estão localizados na região de Classe I do MHC a 46,5 Kb centromérico ao gene de HLA-B, constituído por seis exóns com variações

polimórficas do tipo microssatélite, os quais codificam regiões extracelulares:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ , assim como moléculas clássicas de MHC de classe I, porém as moléculas de MIC são altamente glicosiladas, não apresentam peptídeos na superfície celular, não se associam a  $\beta 2$ -microglobulina na membrana celular, além de não estarem envolvidos com *up-regulation* de IFN- $\gamma$  (MORALES-BUENROSTRO; ALBERÚ, 2008).

Hoje são conhecidos sete membros para esta família de genes: MICA, MICB, MICC, MICD, MICE, MICF e MICG, apenas os genes A e B são funcionais e polimórficos, sendo os demais considerados pseudogenes. Aproximadamente 61 alelos são descritos para MICA e aproximadamente 30 para MICB (MORALES-BUENROSTRO e ALBERÚ, 2008).

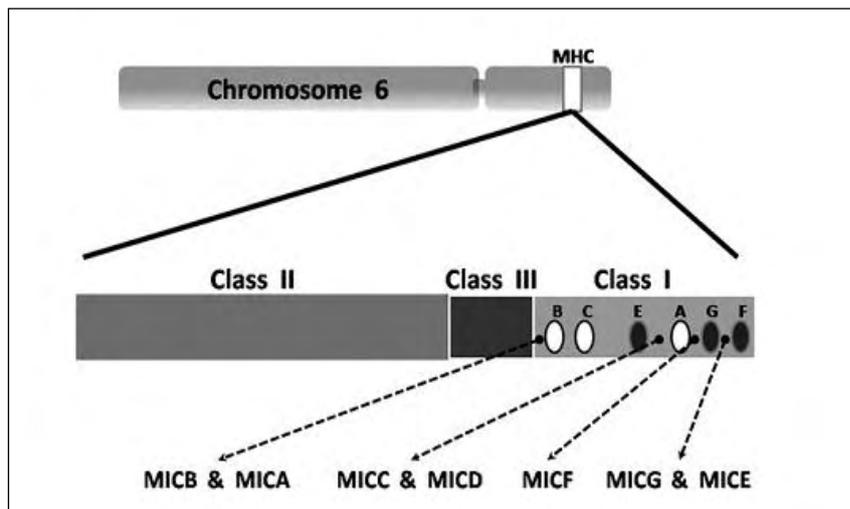


Figura 1: Mostra a localização cromossômica de MHC, enfatizando os genes MIC na região de Classe I (MORALES-BUENROSTRO; ALBERÚ, 2008).

MICA/B foi detectada pela primeira vez na superfície de células como os fibroblastos e células epiteliais. Mais tarde, foi detectada a expressão de MICA na superfície de monócitos, queratinócitos e células endoteliais, além de sua inexistência na superfície dos linfócitos. Estudos dirigidos por Stephens consideraram a existência de moléculas de MIC, presente no citoplasma de algumas células, como neutrófilos, células renais, monócitos. Em resposta ao estresse celular induzido por choque térmico, inflamação, infecção, hipertensão

ou citotoxicidade por drogas, a expressão de MICA aumenta consideravelmente na superfície de células epiteliais, endoteliais e de fibroblastos. Esse fato associado ao seu polimorfismo levou a hipótese da atuação de MIC na resposta imune ao enxerto na rejeição aos transplantes, já que pode induzir a ativação de Linfócitos T, células NK, além da ativação LB e a formação de aloanticorpos (STEPHENS, 2001; MORALES-BUENROSTRO; ALBERÚ, 2008).

No caso dos alotransplantes, diferentes variantes polimórficas entre receptor e doador poderiam ser consideradas aloantígenos de histocompatibilidade secundários, desencadeando um processo de resposta imune ao enxerto. Diversos estudos no início deste século mostraram que antes mesmo do início do processo de rejeição aguda ou crônica, os antígenos MICA podem ser detectados em células epiteliais de rim, em resposta a fatores que causam estresse celular e que após a detecção destes, podem ser detectados anticorpos anti-MIC alogênico, responsáveis pela rejeição do aloenxerto (MARIN; GOLDBERG, 2006).

A participação de MICA na indução de produção de aloanticorpos na resposta imune ao aloenxerto não é a única função destas moléculas na rejeição, já que estas moléculas atuam como ligantes diretos de células Naturais Killers (NK), através de seu receptor NKG2D, atuando desta forma como alvo de células NK na rejeição ao aloenxerto renal (SUÁREZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2009).

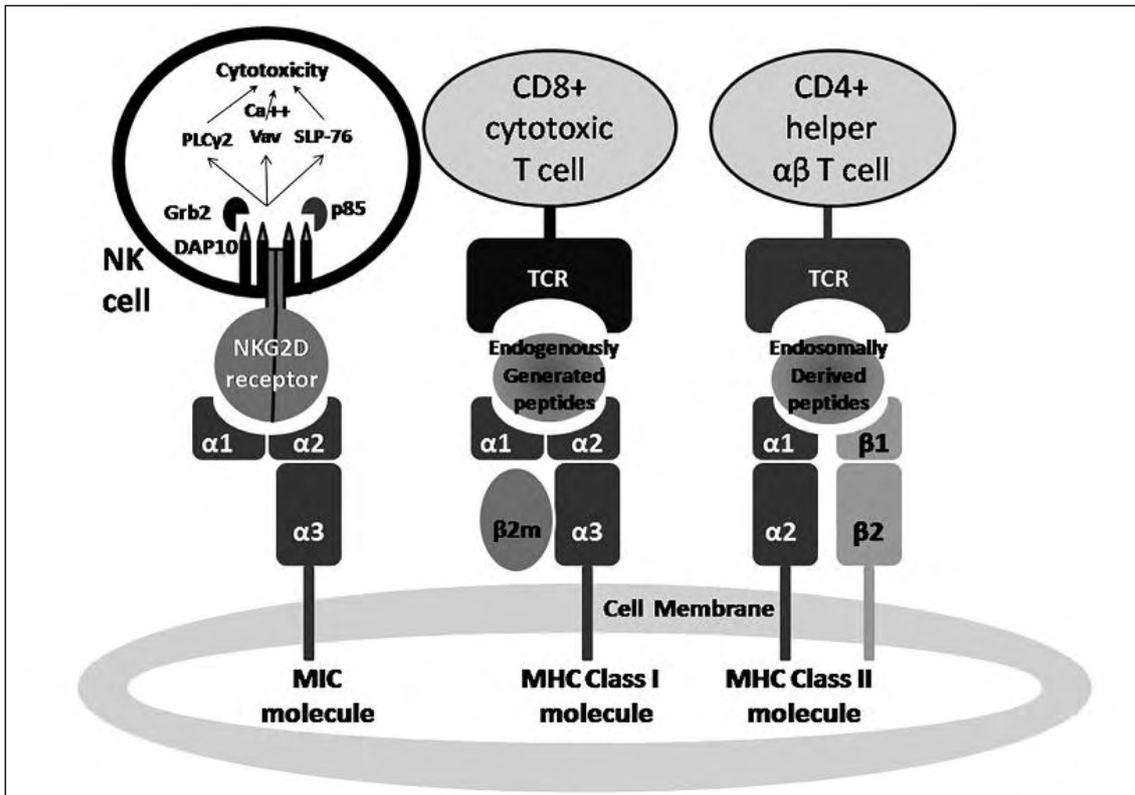


Figura 2: Mostra as diferenças entre estruturas das moléculas de Histocompatibilidade principais (HLA classe I e II) e secundária (MIC), além da relação com seus principais ligantes (MORALES-BUENROSTRO; ALBERÚ, 2008).

## 1.2. RESPOSTA IMUNE AO ALOEXERTO

A resposta imune ao aloenxerto pode ser dividida em duas fases: uma fase de sensibilização, para que os linfócitos reativos aos antígenos de histocompatibilidade sejam ativados, proliferem e se diferenciem em células efetoras, e uma fase efetora, na qual ocorre o ataque do sistema imune contra o enxerto, podendo ocorrer de forma humoral ou celular.

O primeiro passo é o reconhecimento da célula transplantada, como próprias (transplante singênico ou autólogo) ou estranhas (no caso de transplante alogênico), sendo este fato atribuído à presença de antígenos

distintos nas células do doador e do receptor variáveis dentro de uma mesma espécie. Esses antígenos que ditam a compatibilidade entre tecidos diferentes são principalmente os antígenos leucocitários humanos (HLA) por todas as características já discutidas anteriormente. Mas como esses aloantígenos podem ser reconhecidos como estranhos pelos linfócitos do receptor? O Fato é que HLA distinto do enxerto pode ser apresentado ao LT por duas vias diferentes: direta ou indireta (VOLTARELLI *et al.*, 2009).

Na apresentação direta, o HLA alogênico apresenta grau de similaridade com HLA do receptor, e desta forma os linfócitos T (CD4+ ou CD8+) do receptor reconhecem via TCR (receptor de célula T) o complexo HLA alogênico/peptídeos na superfície das células do enxerto. Tal fenômeno contraria o mecanismo de restrição ao MHC.. Neste caso TCR é responsável em reconhecer HLA alogênico, porque apesar da restrição ao MHC próprio, o LT com certo grau de alorreatividade não passa pela seleção tímica, sendo que cerca de 2% dos linfócitos T de um indivíduo tem a capacidade de reconhecer e responder a HLA estranho associado a um peptídeo. Além disso, TCR tem afinidade intrínseca ao HLA, sendo que desta forma, o complexo HLA alogênico/peptídeo do enxerto poderá ser reconhecido como HLA próprio/peptídeo antigênico (reação cruzada), caso exista similaridade entre eles, ocorrendo desta forma a resposta alogênica (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2008).

Na via de apresentação indireta, os aloantígenos do doador são processados pelas células apresentadoras de antígenos (APC) do receptor e os peptídeos derivados do HLA alogênico são apresentados aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, pelas moléculas de HLA classe II presentes nas APC do receptor. Neste caso a APC do receptor penetra no enxerto e fagocita o HLA alogênico, para processá-lo e apresentá-lo convencionalmente aos linfócitos T, principalmente aos CD4<sup>+</sup> (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2008).

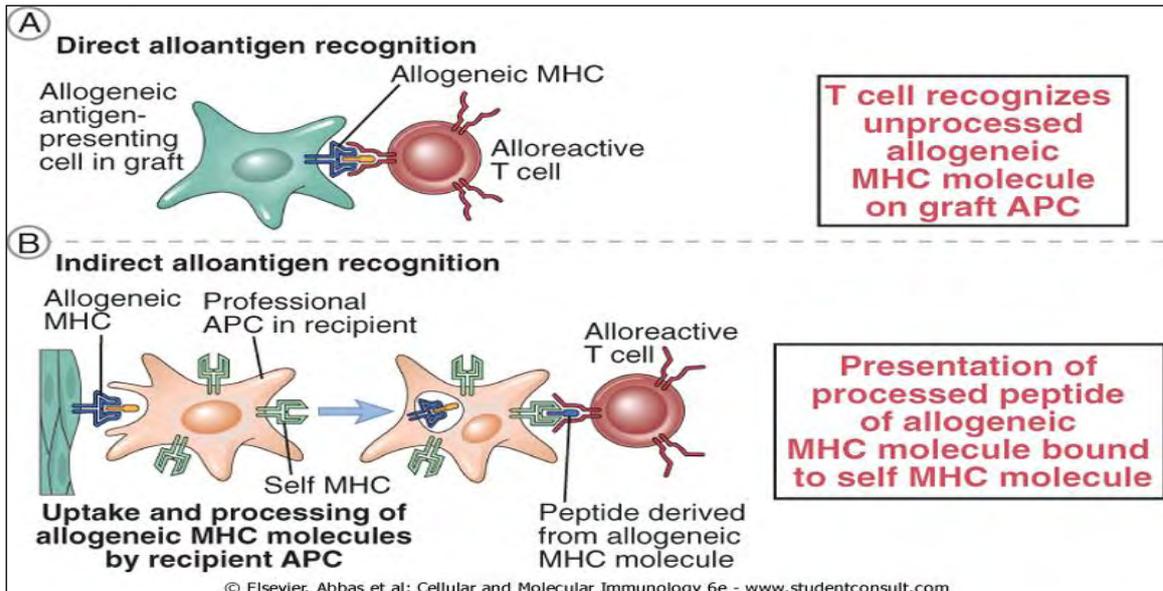


Figura 3: Reconhecimento dos aloantígenos pelos linfócitos do receptor (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2008).

Após reconhecimento, os linfócitos alorreativos são ativados, diferenciados e proliferados para gerar uma resposta efetora contra enxerto. Essa ativação linfocitária contra outras células diferentes foi evidenciada pela primeira vez em um experimento *“in vitro”* chamado de MLR (cultura mista de linfócitos), a qual analisa a resposta alogênica de LT a moléculas de HLA estranhas, neste caso uma célula é colocada em contato com outra em uma cultura que propicia sua expansão em caso de ativação e o resultado observado é a expansão clonal de ambas as células (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2008).

As respostas efetoras contra o aloenxerto auxiliam na classificação das rejeições, a qual também leva em consideração o decurso temporal desta resposta. Desta forma, é possível considerar os padrões de rejeição como hiperaguda, aguda e a disfunção crônica do enxerto.

A rejeição hiperaguda ocorre devido a existência de Anticorpos preexistentes na circulação do hospedeiro contra o enxerto. Esses anticorpos podem ser: Anticorpos contra grupo ABO, os quais são raros graças tipagem sanguínea obrigatória no pré-transplante. Hoje a maior causa de rejeição hiperaguda é a presença de IgG contra Antígenos protéicos do doador

(Anticorpos anti-HLA classe I ou outros antígenos endoteliais, como MIC) gerados após exposição prévia aos aloantígenos em transfusões, transplantes prévios ou gestação. A rejeição hiperaguda é um processo contornável devido à realização de provas cruzadas pré-transplante alogênico. A rejeição hiperaguda ocorre em até 72 horas após a revascularização do enxerto e é de rápida progressão levando a perda irreversível do enxerto. Caso o título de aloanticorpos pré-formados contra enxerto esteja muito baixo, a rejeição pode ocorrer em dias, sendo chamada de rejeição acelerada do enxerto (PIAZZA, 2001).

Os Anticorpos pré-formados se ligam as células endoteliais do enxerto, após a anastomose dos vasos do enxerto e do receptor, ativando a via clássica do complemento e causando lesão endotelial. Desta forma as proteínas da membrana basal subendotelial e o fator do Von Willebrand são expostos, levando a ativação, adesão e agregação plaquetária no vaso do enxerto. Com a lesão, o endotélio perde substâncias inibidoras da coagulação e secretam partículas lipídicas que promovem a coagulação. Esses eventos levam a trombose e oclusão vascular com isquemia irreversível do tecido enxertado (TERASAKI, 2005).

A rejeição aguda é a mais freqüente no transplante alogênico e ocorre em semanas ou meses após o transplante. Hoje as principais ferramentas utilizadas na sua prevenção são: a terapia imunossupressora e a seleção imunológica de doadores através de testes de histocompatibilidade, mesmo assim a rejeição aguda ainda representa um grande obstáculo ao sucesso dos transplantes no cenário mundial.

Este tipo de rejeição ocorre principalmente devido a uma resposta celular contra aloantígenos presentes em células endoteliais e células do parênquima do enxerto. Nos enxertos altamente vascularizados, o primeiro achado é a endotelite endovascular e a arterite de camada íntima em artérias de médio calibre, sendo que somente após tais achados, a lesão parenquimatosa pode ser detectada. Os Linfócitos citotóxicos causam destruição direta das células do enxerto, devido a produção de enzimas pró-apoptóticas como Granzima B e perforinas. Já os LT auxiliares alorreativos são

responsáveis pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, causando uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH), responsáveis pela lesão inflamatória no local. Além da evidente resposta celular é possível evidenciar a participação de alguns anticorpos, principalmente de IgG, os quais levam a inflamação tecidual e a necrose transmural da parede do vaso sanguíneo do enxerto (VOLTARELLI *et al.*, 2009).

As disfunções crônicas do enxerto incluem a rejeição crônica e a vasculopatia do enxerto, e são assim denominadas devido a características multifatoriais de sua etiologia, que incluem: além da resposta imune celular e humoral, fatores não imunológicos, como idade do doador, incompatibilidade ortotrópica, tempo de isquemia fria, hipertensão arterial, hiperlipidemia e infecção por citomegalovírus. Ocorre após seis meses de transplante, sendo que o primeiro evento observado é a vasculopatia do enxerto, na qual ocorre uma arteriosclerose acelerada do enxerto, devido a proliferação das células musculares lisas da camada íntima, levando lesão isquêmica do enxerto. Além disso, episódios de rejeições agudas mascarados com uso de imunossupressores, podem causar pequenas lesões que só terão influência em longo prazo. As reações de DTH crônica dos LT auxiliares do hospedeiro contra aloantígenos levam a produção de fatores de crescimento que induzem a hiperplasia e hipertrofia das células musculares lisas dos vasos e a fibrose das células do parênquima do enxerto, agravada pela falta de fluxo sanguíneo gerado pela vasculopatia do enxerto (SILVA; JOBIM, 2004).

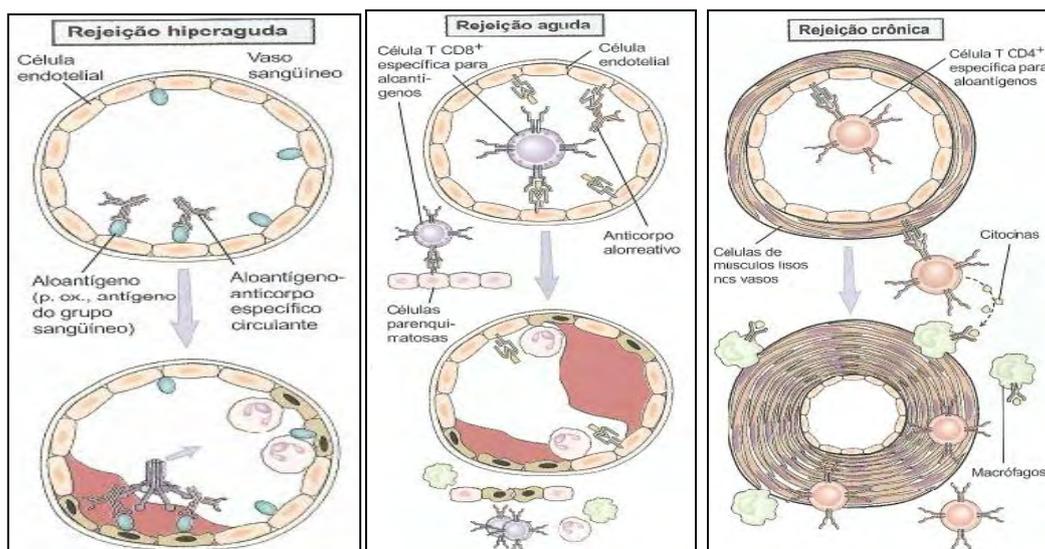


Figura 4: Classificação dos mecanismos de Rejeição ao enxerto (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2008).

### 1.2.1. Impacto dos aloanticorpos na resposta humoral aos aloenxertos

A resposta humoral aos aloantígenos desempenha um papel importante na indução de rejeição, seja por anticorpos pré-formados (rejeição hiperaguda) ou formados após transplante induzindo rejeições agudas ou crônicas. Os anticorpos anti-HLA do tipo IgG geralmente são encontrados em casos de rejeição aguda, cuja o receptor não respondeu a terapia imunossupressora padrão (RIFLE, 2005).

Por muito tempo a resposta humoral era atribuída apenas a padrões hiperagudos e acelerados de rejeição, sendo que apenas o mecanismo celular de rejeição aguda e crônica era focado nos trabalhos da área. Embora o papel principal no reconhecimento de aloantígenos e a indução da cascata de eventos que levam à destruição do enxerto sejam exercidos pela imunidade mediada por células, existe uma cooperação celular entre linfócitos T e B, sendo que a resposta do linfócito T também resulta em ativação do linfócito B e conseqüentemente na produção de anticorpos (RIFLE, 2005).

Segundo Terasaki e colaboradores (2005), evidências sugerem a associação de anticorpos anti-HLA com uma evolução negativa pós-transplante renal, ocorrendo desde rejeição hiperaguda, aguda (RA) humoral ou nefropatia crônica do enxerto com a perda precoce e diminuição da sobrevida do enxerto. O mesmo autor sugere a “Teoria humoral do Transplante”, na qual anticorpos causariam diretamente a rejeição dos enxertos, sem a ação de células, com a hipótese de que os anticorpos se ligariam ao endotélio do enxerto, causando um ciclo de danos e reparo podendo levar de meses a anos, resultando no espessamento lento e gradual da camada íntima dos vasos (MCKENNA, TAKEMOTO, TERASAKI, 2000).

O processo supracitado contribuiria como um fator imunológico, influenciando negativamente na sobrevida do enxerto em longo prazo. Do mesmo modo outros estudos demonstraram que pacientes com anticorpos anti-HLA no pós-transplante, tiveram duas a dez vezes mais incidência de RA do que pacientes sem anticorpos anti-HLA, nos quais a rejeição crônica foi menos freqüente e a sobrevida foi maior do que em pacientes que apresentavam anticorpos anti-HLA (TORESAN, 2007).

Quanto aos isotipos de anticorpos formados, alguns aloanticorpos relacionados ao transplante de órgãos parecem exercer um papel prejudicial à sobrevida do enxerto, outros isotipos parecem não ter efeito aparente e um terceiro grupo pode estar relacionado a um efeito benéfico. Anticorpos anti-HLA do tipo IgM estão freqüentemente correlacionados a não exercer papel deletério na sobrevida do enxerto. Ao contrário, anticorpos do tipo IgG, quando encontrados em provas cruzadas no pré-transplante, contra-indicam a realização do transplante. Contudo, foi observado que em alguns casos a presença de anticorpo anti-HLA pertencentes a classe IgM também tinham um papel prejudicial ao aloenxerto. Anticorpos anti-HLA do isotipo IgA presentes no pré-transplante foram associados à melhor sobrevida do enxerto (BÖHMING, BARTEL e WAHRMANN, 2008).

Anticorpos, tanto contra Classe I quanto contra a Classe II, mostraram-se prejudiciais ao enxerto independentemente de suas freqüências. Piazza e cols. (2001) encontraram positividade para a classe I de 35% pós-transplante,

enquanto anticorpos contra ambas as classes foram encontrados em 55% dos casos e somente 10% apresentaram exclusivamente anticorpos contra classe II após a rejeição.

Outro trabalho dirigido por Harmer (1995) estudou 90 pacientes que perderam o enxerto, sendo que 85 apresentaram anticorpos contra HLA e destes 75 não eram sensibilizados no pré-transplante, destes últimos, 76% produziram anticorpos contra antígenos de Classe I, e 11% contra Classe II. Demais estudos demonstram resultados variantes, porém de um modo geral moléculas de classe I exercem um papel mais sensibilizador do que moléculas de classe II.

Na metade dos anos 80, a atenção foi voltada aos anticorpos anti-HLA (IgG) pós-transplante específicos ao doador, devido aos vários estudos que chegavam a conclusões semelhantes, sugerindo que o aparecimento de anticorpos anti-HLA doador específico está relacionado à redução da sobrevida do enxerto e ao aumento das alterações crônicas do enxerto, quando comparados aos controles sem anticorpos (LEE *et al.*, 2004)

Segundo TORESAN (2007), muitos pacientes são subestimados quanto à produção de tais anticorpos, pois estes anticorpos muitas vezes só são revelados após perda ou remoção do enxerto, sendo que a hipótese mais aceita é a que esses anticorpos ficam aderidos ao enxerto, sendo subestimados no soro.

Um excelente marcador de rejeição humoral, é o depósito do C4d do complemento nos capilares Peritubulares, sendo um marcador específico (segundo classificação de Banff para rejeição de aloenxertos renais) e significativamente associado à detecção de aloanticorpos específicos contra o doador e aos achados histológicos das lesões (SILVA, 2004).

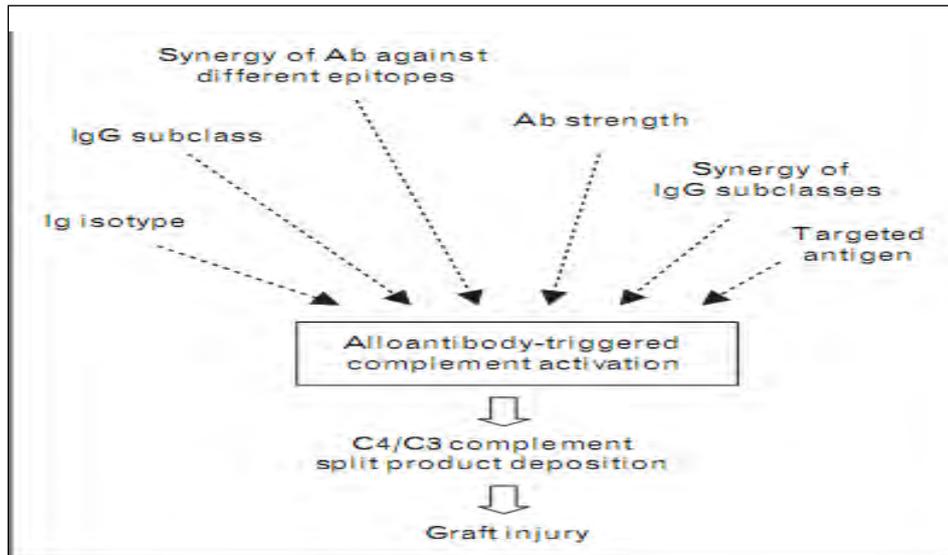


Figura 5: Demonstra o principal mecanismo de rejeição através de aloanticorpos. (BÖHMING, BARTEL e WAHRMANN, 2008).

### 1.3. ALOANTICORPOS:

#### 1.3.1. Anticorpos anti-HLA no transplante:

A exposição a antígenos HLA alogênicos ocorre durante a gestação, após uma transfusão sanguínea ou a um transplante prévio. A sensibilização alogênica pelo enxerto foi detalhada acima no item 1.3, sendo resultado de uma cooperação celular entre Linfócitos T e B, principalmente após reconhecimento indireto dos aloantígenos pelo linfócito T CD4<sup>+</sup> e pelo receptor de célula B (BCR) nos linfócitos B, resultando na produção de aloanticorpos de modo eficiente. Assim como no Transplante prévio, a alosensibilização também pode ocorrer através da aloimunização induzida por transfusão sanguínea, na qual componentes celulares que possuíam moléculas HLA distintas na sua superfície são transfundidas para um receptor, sensibilizando-o.

No caso da aloimunização pós-transfusional, os antígenos HLA alogênicos dos componentes celulares do doador estimulam o sistema imune

do paciente a produzir aloanticorpos antiplaquetários específicos, principalmente contra moléculas HLA de classe I. Esse tipo de aloimunização é comum em pacientes politransfundidos que possuem alguma doença hematológica, os quais recebem reposição transfusional de concentrado de hemácias e plaquetas, respectivamente. Pacientes hematológicos que são aloimunizados, geralmente desenvolvem um estado refratário, o qual é inadequado ao aproveitamento das transfusões de plaquetas (ARRUDA *et al.*, 2008).

No caso da gestação, o feto é apresentado à gestante como um enxerto semi-alogênico. Num decurso normal da gestação, o organismo materno desenvolve uma intrincada rede imunorregulatória com o objetivo de desenvolver um estado de tolerância materno-fetal. No início as células do trofoblasto fetal representam a interface entre tecido materno e fetal, sendo que através destas células as gestantes são sensibilizadas por aloantígenos do sistema HLA paterno. Neste caso o estado de tolerância é mantido por uma resposta de padrão Th2 influenciado diretamente pela produção de progesterona, esta resposta inibe a atividade de células citotóxicas (principais responsáveis pelo abortamento espontâneo de origem imunológica) e aumenta a atividade de células T regulatórias (MICHELON, SILVEIRA e NEUMANN, 2006).

Desta forma é possível dizer que a produção de anticorpos alogênicos na gestação é um processo natural, já que o reconhecimento do feto semi-alogênico é inevitável e um balanço Th2 é favorável a manutenção da gestação. Os anticorpos produzidos dirigidos contra moléculas HLA paternas presentes no tecido embrionário, são ditos como anticorpos bloqueadores, pois atuam como proteção à resposta citotóxica materna contra o embrião. Esses anticorpos podem ser detectados desde as primeiras fases da gestação, permanecendo por tempo indeterminado na circulação materna e podendo recrudescer diante de um novo desafio antigênico no caso de uma nova gestação, especialmente se provenientes do mesmo pai, em decorrência da memória imunológica específica (MICHELON, SILVEIRA e NEUMANN, 2006).

Estudos recentes demonstraram que alguns pacientes não imunizados apresentavam anticorpos anti-HLA, este evento é considerado raro, e tem sido sugerida a possibilidade de produção destes anticorpos por reação cruzada com determinantes de origem microbiana (KARAHAN *et al.*, 2010). Esses aloanticorpos são produzidos com intensidade diferentes, devido as variações individuais da resposta imune, podendo desaparecer após algum tempo ou permanecer com altos níveis por longos períodos. Também são conhecidos casos de pacientes que mesmo expostos a HLA estranho, não desenvolvem aloanticorpos, esse fenômeno permanece desconhecido, porém sabe-se que alguns antígenos HLA são mais imunogênicos que outros (KARAHAN *et al.*, 2010).

Os anticorpos anti-HLA desempenham um papel importante na sobrevida do enxerto, principalmente em transplante de rim. A existência de anticorpos anti-doador no pré-transplante está diretamente envolvida com a patogênese da rejeição hiperaguda e acelerado do enxerto, deste modo a presença desses anticorpos pré-formados é sempre avaliada antes do transplante, através da realização de provas cruzadas, utilizando amostras de soro atual (no máximo 90 dias precedentes ao transplante) e o histórico (soro mais antigo disponível dentro de um período de cerca de 1 ano pré-transplante) do provável receptor. A detecção de aloanticorpos pela técnica de PRA (Reatividade contra Painel) é usada para monitorar a sensibilização dos pacientes em lista de espera para um transplante (TORESAN, 2007).

Foi observado em vários estudos que pacientes sensibilizados antes do transplante possuem menor taxa de sobrevida do enxerto quando comparados a pacientes não sensibilizados, deste modo o valor em percentagem de PRA pré-transplante está relacionada diretamente com taxa de perda do enxerto. Há um índice de perda do enxerto de 12% em pacientes com PRA menor que 10%, aumentando para 33% em pacientes sensibilizados e para 63% em pacientes hipersensibilizados (MONTEIRO *et al.*, 1997).

A sobrevida do enxerto decai conforme aumenta o número de incompatibilidade HLA (missmatches), quando há valor alto de PRA e ainda se o pacientes tiver alto PRA contra HLA de classe I e II, sendo que deste modo a

sensibilização pelo HLA é um importante barreira no transplante de órgãos sólidos (ZEEVI, GIRNITA e DUQUESNOY, 2006).

### **1.3.2. Anticorpos anti-MIC no transplante:**

A resposta humoral dada por anti-HLA e anti-MIC específicos, tem papel crucial na rejeição aguda vascular e também pode preceder muitos casos de disfunções crônicas do enxerto. Desta forma a maioria dos anticorpos direcionados ao aloenxerto representa um grande risco a sobrevida do mesmo (ZOU *et al.*, 2006).

A presença de anticorpos anti-MICA específicos contribuem para a falência do enxerto mesmo na ausência de anticorpos anti-HLA, esse dados foram relatados em casos como o descrito por Morales-Buenrostro e Alberú (2008), no qual de oito pacientes com perda irreversível do enxerto renal, cinco apresentavam anticorpos anti-MICA e destes quatro desenvolveram primeiro a trombose vascular do enxerto. Sendo evidenciados nos cinco enxertos rejeitados, lesões glomerulares e endoteliais com depósitos de IgG, IgM e IgA, C3 e fibrinogênio (MORALES-BUENROSTRO E ALBERÚ, 2008).

Outros estudos buscando a relação entre anti-MIC e anti-HLA na rejeição de origem humoral e na sobrevida do enxerto, evidenciaram que quando o paciente no pré-transplante não possui nenhum dos dois aloanticorpos o risco de rejeição é de 14% e sobrevida do enxerto é aumentada em 89%. Já nos pacientes que possuíam apenas anti-MIC específico para o doador, o risco de rejeição aumentava para 33% e as chances de sobrevida do enxerto diminuía para 71%. Nos casos em que o paciente possuía aloanticorpos anti-MIC e anti-HLA, o risco aumentava para 83% e as chances de sobrevida do enxerto caíam para 17% (MORALES-BUENROSTRO E ALBERÚ, 2008).

Segundo trabalho dirigido por Zou e cols. (2006), mostrou os anticorpos anti-MIC como responsáveis por 18,6% dos casos de rejeição humoral, sendo

que dentre estes casos, 14,3% estavam relacionados à rejeição hiperaguda, 6,7% a rejeições agudas e 23,3% a rejeições crônicas. Enquanto que os demais casos foram atribuídos a presença de aloanticorpos anti-HLA para Classe I (33,9%) e os dirigidos contra Classe II (35,6%) (ZOU *et al.*, 2006).

Os achados de forma geral mostram que quando há produção de anticorpos anti-MIC e anti-HLA contra aloantígenos presentes no endotélio vascular, a rejeição ocorre de modo mais rápido e mais intenso, do que quando existe a presença de apenas um dos dois aloanticorpos doador específicos.

#### **1.4. AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CONTRA PAINEL (PRA)**

A avaliação da reatividade de anticorpos contra um painel de células ou antígenos HLA é a forma mais rotineira de investigar a sensibilização prévia aos antígenos HLA. O resultado informa o grau de aloimunização dos candidatos ao transplante, sendo expressos como um percentual de reatividade (TORESAN, 2007).

A detecção de anticorpos anti-HLA no soro de receptores tem sido associado com a maior perda do enxerto em diversos estudos multicêntricos. A pesquisa de tais anticorpos pode ser realizada por meio de métodos isolados ou combinados de linfocitotoxicidade dependente de complemento (CDC), ELISA (*enzyme like immunosorbent assay*) ou análise de fluorescência (Luminex®). O teste de reatividade do soro contra um painel de células de doadores (*Panel Reactive Antibody – PRA*) foi o princípio das técnicas utilizadas atualmente, sendo a Tecnologia Luminex® a mais empregada. Esta nova metodologia utiliza ao invés de células, microesferas (*beads*) como um suporte, adsorvidos de moléculas HLA em sua superfície (PEI, 1999). Sendo que hoje é possível detectar através de algumas beads específicas não só a presença de anticorpos anti-HLA, mas também a presença de anticorpos anti-MIC.

A não utilização do painel de células nos dias atuais, é devido à dificuldade de obter um painel que seja realmente representativo da população de potenciais doadores, pois neste caso o soro do mesmo paciente, quando testado contra diferentes painéis pode resultar em proporções diferentes de reatividade (SILVA, 2004). Para evitar tais problemas, as técnicas mais recentes que consistem em testar o soro do paciente com o maior número possível de antígenos HLA. O objetivo é detectar a existência e reatividade destes aloanticorpos, além das especificidades de anticorpos HLA (seja contra classe I ou II) presentes, apresentando desta forma maior sensibilidade e especificidade que as demais técnicas (SILVA e JOBIM, 2004).

As causas mais comuns de sensibilização aos antígenos HLA são as gestações, transfusões e transplantes prévios. O soro que reage com a maioria dos antígenos HLA possui um valor alto de PRA, indicando que o paciente apresenta um alto nível de sensibilização aos antígenos HLA. Desta forma os pacientes são classificados de acordo com a percentagem de PRA: PRA menor que 10% (não sensibilizado), entre 10% e 50% (sensibilizado) e maior que 50% (hipersensibilizado), indicando desta forma uma interferência na meia vida do enxerto (LEE *et al.*, 2004; TORESAN, 2007).

Porém após a realização do PRA é obrigatório realizar uma prova confirmatória da reatividade humoral contra o enxerto, através de provas cruzadas. Porém estudos vêm demonstrando que mesmo com prova cruzada negativa, um alto PRA pré-transplante representa risco aumentado de rejeição, devido a uma maior reatividade do sistema imune do receptor ou pela produção de anticorpos específicos ao doador não serem detectados na prova cruzada (geralmente anticorpos que não fixam complemento) (SILVA e JOBIM, 2004; TORESAN, 2007).

Segundo SILVA (2004), pacientes reativos, porém não considerados sensibilizados (PRA menor que 10%), independente da prova cruzada, não apresentaram diferenças na sobrevida do enxerto do enxerto, diferente daqueles que possuíam prova cruzada positiva e PRA alto (cujo transplante é contra indicado), devido à grande inferioridade no tempo de vida do enxerto,

afirmações essa que ressaltam a grande importância do PRA no pré-transplante.

Segundo Voltarelli e cols (2008) as principais funções de um resultado de PRA são: estimativa da probabilidade do receptor em encontrar um doador contra o qual apresente prova cruzada negativa; selecionar os soros que deveram ser testados com as células do doador na prova cruzada (*crossmatch*) no pré-transplante; avaliar a da perda do transplante em longo prazo, uma vez que altos níveis de PRA (hipersensibilizados, especialmente acima de 80%) associam-se à menor sobrevida do transplante, sendo considerados como pacientes hipersensibilizados de alto risco. Outro aspecto muito importante do PRA é a definição da especificidade dos anticorpos, para que sejam evitados transplantes com doadores que apresentam antígenos HLA contra os quais o receptor apresente, ou tenha apresentado no passado, aloanticorpos (MONTEIRO *et al.*, 1997; CECKA, 2010).

Apesar da classificação segundo Lee *et al.*, (2004) e Toresan (2007), considerarem hipersensibilizados os indivíduos com PRA acima de 50%, sabendo-se que para o transplante renal, um PRA maior que 80% representa uma desvantagem para transplante e um grande risco de perda do enxerto, sendo considerado um ponto para remoção do paciente de uma provável lista de transplante (CECKA, 2010).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Realizar estudo sobre a sensibilização de pacientes inscritos na fila de espera para transplante renal na CNCDO2, visando à coleta de dados quanto à produção de Anticorpos contra Antígenos de Histocompatibilidade, bem como as frequências dos principais anticorpos anti-HLA distribuídos nesta população do interior Paulista.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as Triagens de anticorpos anti-HLA realizadas nos pacientes candidatos a transplante renal nos anos de 2008, 2009 e 2010, com a finalidade de averiguar quantos pacientes permaneciam ativos na lista, e destes quantos apresentavam triagem positiva e negativa, bem como para qual classe de antígenos HLA seus anticorpos estavam dirigidos.

-Avaliar as Triagens de anticorpos anti-MIC em pacientes candidatos a transplante renal nos três últimos anos, quanto à presença ou ausência de anticorpos anti-MIC.

-Cruzar os dados Coletados nas Triagens (anti-MIC e anti-HLA) para relacionar o perfil de positividade e negatividade de anticorpos anti-HLA com os resultados encontrados para a triagem de anti-MIC nos diferentes anos de estudo.

-Fazer um estudo da aloimunização destes pacientes, buscando a distribuição dos diferentes perfis de sensibilização a cada ano, bem como uma relação da %PRA (sensibilização) como os principais fatores causais da aloimunização.

-Analisar as frequências das principais especificidades de anticorpos anti-HLA de classe I (2008, 2009 e 2010) e de classe II (2009 e 2010) distribuídos entre os pacientes candidatos a transplante renal triados positivamente.

### **3. METODOLOGIA:**

#### **3.1. Delineamento do plano experimental**

Todos pacientes que são inscritos na fila de espera para transplante renal na Central de Transplantes (Regional de Ribeirão Preto – CNCDO2) tem seu soro armazenado no laboratório de Sorologia de HLA do Hemocentro de Ribeirão Preto, esse soro deve ser renovado a cada três meses, para que o paciente continue ativo na Lista de espera junto a Central de Transplantes. Faz parte da rotina do Laboratório a realização da Reatividade Contra Painel (PRA) duas vezes ao ano de cada paciente ativo, já que pode ocorrer a soroconversão devido à exposição a fatores que possam causar a aloimunização dos pacientes. Caso ocorra uma seleção prévia destes receptores para realização da Prova Cruzada, os soros com os quais serão realizados a Prova Cruzada serão aqueles que estão ativos.

No início, antes da realização o PRA, é realizada uma triagem, com a finalidade de detectar os pacientes que possuíam ou não anticorpos anti-HLA e anti-MIC, além de direcionar contra qual classe de HLA o paciente possui anticorpos. Após a Triagem, as amostra que se apresentaram positivas são submetidas à realização do PRA, o qual será responsável em mostrar a sensibilização (% reatividade) e as especificidades de tais anticorpos anti-HLA resultantes da aloimunização.

Primeiramente todas as triagens (LABScren™/LSM12) de 2008, 2009 e 2010 foram investigadas e a coleta de dados foi dada do seguinte modo: a percentagem de pacientes positivos (triagem anti-HLA positiva) frente àqueles que apresentavam triagem negativa em cada ano. Após esses primeiros dados, foram investigados entre os pacientes positivos, quais apresentavam aloanticorpos para Classe I, para Classe II ou para ambas as Classes, e esses resultados em seguida foram plotados em planilhas e gráficos do Programa Excel 2007.

Ainda dentro da Triagem, foram investigados quantos pacientes (a cada ano de estudo), apresentavam ou não anti-MIC, e logo após os dados da triagem anti-HLA e anti-MIC foram cruzados, com o intuito de investigar qual a relação da sensibilização por MIC e por HLA, sendo que o perfil anti-MIC foi investigado dentro dos pacientes com triagem positiva ou não para anti-HLA.

Em uma segunda etapa, os dados obtidos do PRA% (LABScren™/LS1 e 2PRA) dos pacientes positivos na Triagem, foram analisados. Esses dados mostraram a diferença de distribuição dos perfis de sensibilização da população estudada a cada ano, deste modo os pacientes foram divididos em quatro grupos:

- A- Pacientes com PRA menor que 10%: não sensibilizados
- B- Pacientes com PRA de 11 a 50%: sensibilizados
- C- Pacientes com PRA de 51 a 80%: hipersensibilizados
- D- Pacientes com PRA maior que 80%: hipersensibilizados com alto risco

Após tal classificação, foram averiguados quantos pacientes apresentavam-se nas situações acima e os dados foram plotados em gráficos e planilhas do Excel 2007. Ainda dentro do estudo da sensibilização dos pacientes investigados, uma seleção aleatória foi realizada, com o objetivo de investigar a influência dos principais fatores causais na produção de anticorpos anti-HLA (Gestações, Transplantes ou Transfusões), sobre cada grupo investigado independentemente. Foram utilizados grupos amostrais (n=20), totalizando 80 pacientes estudados. Os dados foram obtidos do Sistema on-line da Central de Transplante no site [www.saude.gov.br/transplante](http://www.saude.gov.br/transplante) (acesso dia 22 de outubro de 2010, às 10h). Os pacientes selecionados foram aqueles que realizavam hemodiálise a pelo menos três anos, e que estavam ativos na última Retipagem em 2010, dos quais metade foram pacientes do sexo feminino, permitindo o estudo da influência da Gestaçao na sensibilização de tais indivíduos.

O terceiro passo da pesquisa foi a investigação da distribuição e das freqüências dos anticorpos anti-HLA de classe I e de classe II, em cada ano

estudado (2008, 2009 e 2010), sendo que para a classe II, o ano de 2008, não apresentou resultados. As especificidades de anticorpos anti-HLA foram analisadas pelo Sistema LabScan™ e interpretadas através do Software HLA fusion 2.0. Após cada interpretação, as especificidades obtidas foram contadas e separadas, e o resultado final foi plotado em Tabelas e Gráficos, com a percentagem e distribuição de cada aloanticorpo anti-HLA na população estudada nos últimos anos.

### **3.2. População estudada:**

O estado de São Paulo possui duas CNCDO (Central de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos), a CNCDO 1 (Região da Grande São Paulo) e a CNCDO 2 (Regional de Ribeirão Preto que abrange o Interior Paulista). Os dados coletados são referentes aos pacientes na fila de espera para Transplante renal com doador cadáver cadastrados na CNCDO 2. Cada paciente é oriundo de um Centro de Diálise, onde realiza periodicamente o procedimento de Hemodiálise. Desta forma cada Centro de Hemodiálise é responsável por enviar a cada três meses, as amostras de soro de seus pacientes para renovação, junto à soroteca do laboratório de Sorologia de HLA de Ribeirão Preto. As amostras com mais de três meses no laboratório são descartadas e o paciente passa a ser considerado inativo até o Centro de Hemodiálise enviar nova amostra de soro deste paciente.

Deste modo, a população estudada concentrou-se nos Pacientes em Hemodiálise nos seguintes Centros, cadastrado na CNCDO2:

ASSIS	DRACENA	LINS
AVARÉ	FRANCA	MARILIA
ADAMANTINA	FERNANDÓPOLIS	PRES. PRUDENTE
ARAÇATUBA	ITAPEVA	RIBEIRÃO PRETO
BARRETOS	ITUVERAVA	SERTÃOZINHO
BAURU	ITAPETININGA	SÃO CARLOS
BATATAIS	ILHA SOLTEIRA	SOROCABA
BEBEDOURO	JAÚ	S. J. DO RIO PRETO
CATANDUVA	JABOTICABAL	TUPÃO

Quadro 1 : Mostra as cidades que representam os Centros de Hemodiálise, locais de origem dos pacientes inscritos na CNCDO2, que possuem soro no Laboratório de Sorologia de HLA de RP, para posterior realização do PRA e Prova Cruzada.

### 3.3. Triagem de anticorpos anti-HLA e anti-MIC:

A triagem de anticorpos anti-HLA foi realizada pelo Kit comercial LABScren® Mixed (LSM12) da ONE LAMBDA® , o qual detecta simultaneamente anticorpos dirigidos contra antígenos de HLA classe I e II, além de anticorpos contra MICA. O sistema LABScren® foi utilizado porque é capaz de detectar anticorpos frente a um Painel de microesferas (Beads) coloridas, nas quais antígenos HLA purificados ficam adsorvidos (PEI *et al*, 1999)

O princípio do método LABScren® é baseado na incubação do soro do paciente com as beads adsorvidas de antígenos HLA, sendo que os anticorpos presentes contra tais antígenos devem se ligar as beads. Após algumas lavagens para remoção de interferentes de reação, foram adicionados

anticorpos secundários anti-IgG humana conjugado com agente Fluorescente (R-Ficoeritrina ou PE), o qual se liga aos anticorpos do isotipo IgG aderidos aos antígenos nas beads. Então após a incubação com o imunoconjugado, foram realizadas lavagens para remoção dos imunoconjugados que não se ligaram. A cada conjunto de beads, existe uma bead controle positivo (com anticorpos anti-HLA adsorvidos), com a finalidade de checar a eficiência do imunoconjugado; e uma bead controle negativo (possui a superfície lisa), para detectar a presença de ligações inespecíficas, e desconsiderá-las no momento da análise.

Após a reação foi realizada a leitura em um equipamento (LUMINEX®), o qual analisa a Fluorescência emitida em cada bead, pelo Sistema de análise LABScan™, fornecendo os dados em tempo real.

Os dados encontrados pela leitura em LABScan™, foram interpretados com auxílio de um Software denominado HLA fusion 2.0, no qual os dados de cada reação são comparados ao encontrado em um Soro Controle negativo. Através de uma fórmula calculada pelo HLA fusion 2.0, o NBG Ratio, uma razão entre a amostra e o controle negativo é estabelecida, dando deste modo a diferença entre resultados positivos e negativos em relação ao Cut Off da reação.

O princípio é resumido na figura abaixo e a técnica consiste na incubação de 2,5 µL de bead de LSM12 e 10µL do soro de cada pacientes ativo (após ser aliquoteado e centrifugado), sob agitação e abrigo da luz por 30 minutos. Uma lavagem consiste na adição 200µL de Tampão de lavagem e centrifugação de 2700 rpm por 5 minutos, com flicagem ao final, deste modo 3 lavagens foram procedidas após a primeira incubação. Após lavagens, foram adicionados 50 µL imunoconjugado (LSAB2) com PE diluído, em cada poço (49,5µL do tampão de lavagem e 0,5µL do conjugado LSAB2 puro). A reação foi incubada sob abrigo da luz e com agitação por 30 minutos, após esta incubação duas lavagens foram realizadas, e então foram adicionados a cada poço 65µL de Tampão Fosfato Salina pH 7,2 a 10%. Após essa etapa, o

conteúdo de cada poço foi Transferido para uma placa de ELISA de fundo em “V” e então levado ao Luminex® para a leitura através do LABScan™.

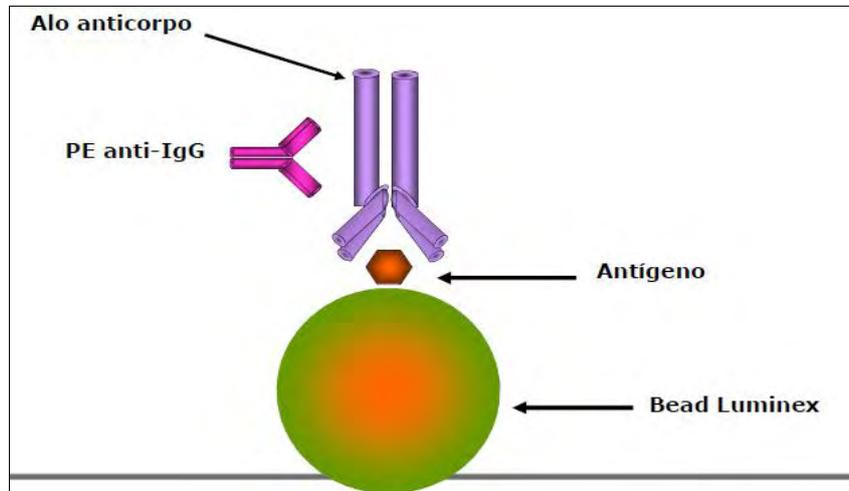


Figura 6: Demonstra o princípio da Técnica LABScreen™ (BIOMETRIX, 2010)



Figura 7: Luminex® analisador de Fluorescência (LABScan™)

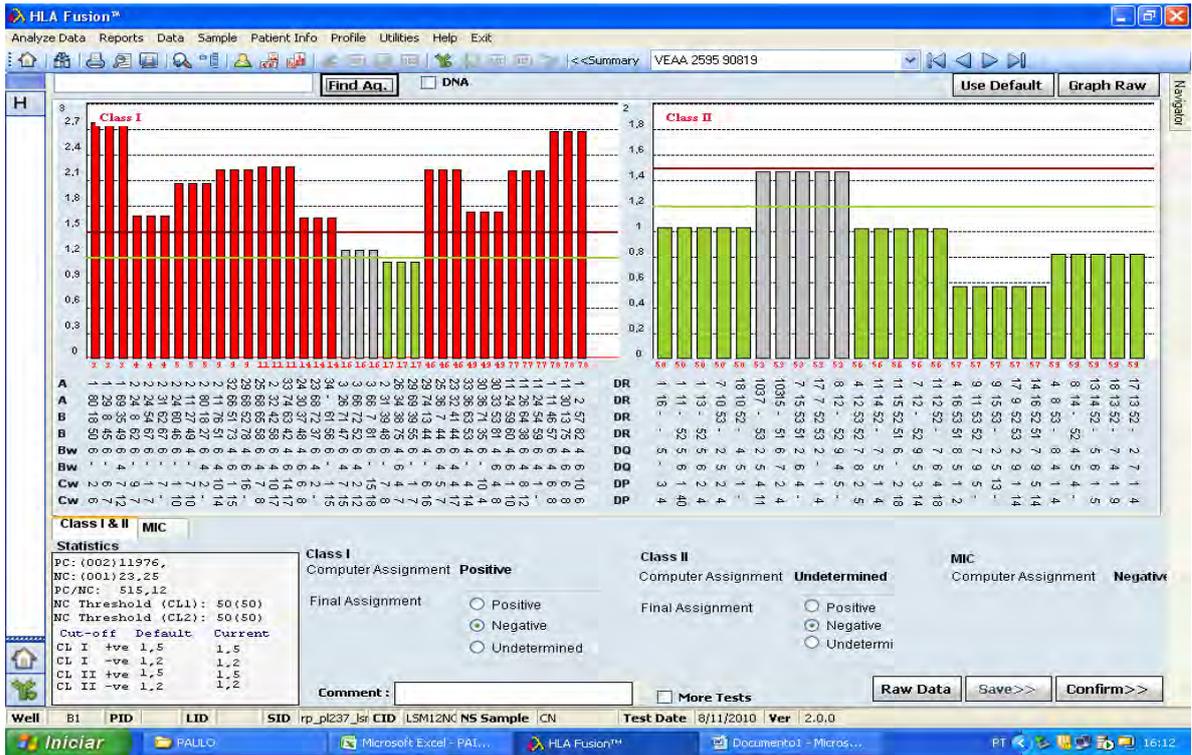


Figura 8: Dados do HLA fusion 2.0 na triagem de anti-HLA, mostrando os valores dados pelo NBG de cada Bead (cada barra corresponde a fluorescência de uma bead). Os valores NBG menor que 1,2 são considerados negativos e acima de 1,5 são considerados positivos, sendo que valores entre 1,2 e 1,5 são considerados intermediários. O Cut Off da reação é NBG 1,5, deste modo essa amostra é positiva para presença de anti-HLA de classe I e negativo/intermediário para anti-HLA de Classe II.

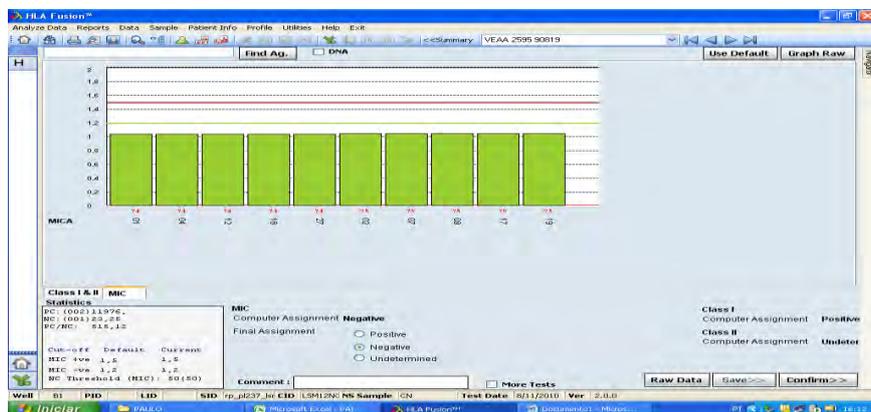


Figura 9: mostra dados do HLA fusion 2.0 para uma amostra anti-MIC negativa, pois os valores de NBG estão abaixo do Cut off (barras verdes)

A fórmula de NBG é dada por:

$$\text{NBG Ratio} = \frac{[ (\text{Raw Data bead \#N}) - (\text{Raw Data NC bead}) ]}{[ (\text{Raw Data bead \#N}) - (\text{Raw Data NC Bead}) ]}$$

Amostra do Paciente  
Soro Controle Negativo

Raw Data Bead #N: Valor de Fluorescência na Bead do teste ou do soro controle negativo

Raw Data NC bead: Valor da Fluorescência dada pelo Background (ligações não específicas) encontrada na Bead negativa na amostra e no soro controle negativo.

Após a realização da triagem dos dados são lançados em um arquivo interno do Laboratório de Sorologia de HLA chamado PAINEL 2008 e os dados para este trabalho foram retirados deste arquivo, dos quais as seguintes informações foram obtidas para cada ano de coleta de dados:

- Quantidade de pacientes que possuíam anti-HLA (independente para qual classe esse anticorpo era direcionado) *versus* quantidade de pacientes que não possuíam anti-HLA.

-Quantidade de pacientes ativos na lista de espera para Transplante renal

-Dos pacientes com Triagem positiva para anti-HLA, quantos apresentavam apenas anti-HLA para classe I, apenas para Classe II e aqueles que apresentam positividade de anticorpos dirigidos contra ambas as classes de HLA.

-Quantidade de amostras que possuíam anti-MIC e os que eram negativas para anti-MIC.

-Quantidade de pacientes anti-HLA positivos (para ambas as classes e para uma das classes) e que também possuíam anti-MIC. Do mesmo modo quantos pacientes não apresentavam nenhum aloanticorpo.

A partir da Coleta destes dados, foram realizados cálculos de frequência, os quais foram expressos em percentagens, representando um grupo alvo frente a toda população proposta para o estudo. Então os resultados foram expressos em tabelas e gráficos do Microsoft Office Excel 2007.

#### **3.4. PRA: reatividade e especificidade de anticorpos anti-HLA**

A Reatividade contra Painel (PRA %) foi realizado com o Kit comercial One Lambda®, do mesmo modo e mesmo princípio que a Triagem (descrita anteriormente). Porém para a realização do PRA foram utilizadas beads do Catálogo LS1PRA LABScren®, as quais são responsáveis pela detecção de anticorpos contra Antígenos HLA de classe I, bem como as suas especificidades. Também foram utilizadas beads do Kit LS2PRA (LABScren® PRA Class II), a qual detecta anticorpos contra Antígenos HLA de Classe II e suas especificidades.

O princípio e a técnica são os mesmos utilizados para LSM12. Após a realização da técnica e leitura pelo Sistema LABScan™ (LUMINEX®), os dados foram interpretados com auxílio ao Software HLA fusion 2.0. Para cada bead contada pelo Luminex, o Software calcula uma fórmula denominada BASELINE, o qual relaciona dados da amostra subtraindo de *Background* (interferentes) detectado pelo Soro controle negativo, demonstrado abaixo:

$$\text{BASELINE} = [ (\text{Raw Value \#N}) - (\text{Raw Value NC}) ] \text{ menos } [ (\text{Raw Data \#N}) - (\text{Raw Data NC}) ]$$

**Amostra do Paciente**                      **Soro Controle Negativo**

Raw Value #N: Valor da Fluorescência detectada na bead em questão na amostra e no soro controle negativo

Raw Value NC: Valor da Fluorescência na bead CN na amostra e no soro controle negativo.

Os dados de cada bead após reação e Calculo pelo Software são apresentados da seguinte forma, para então decorrer-se a interpretação:

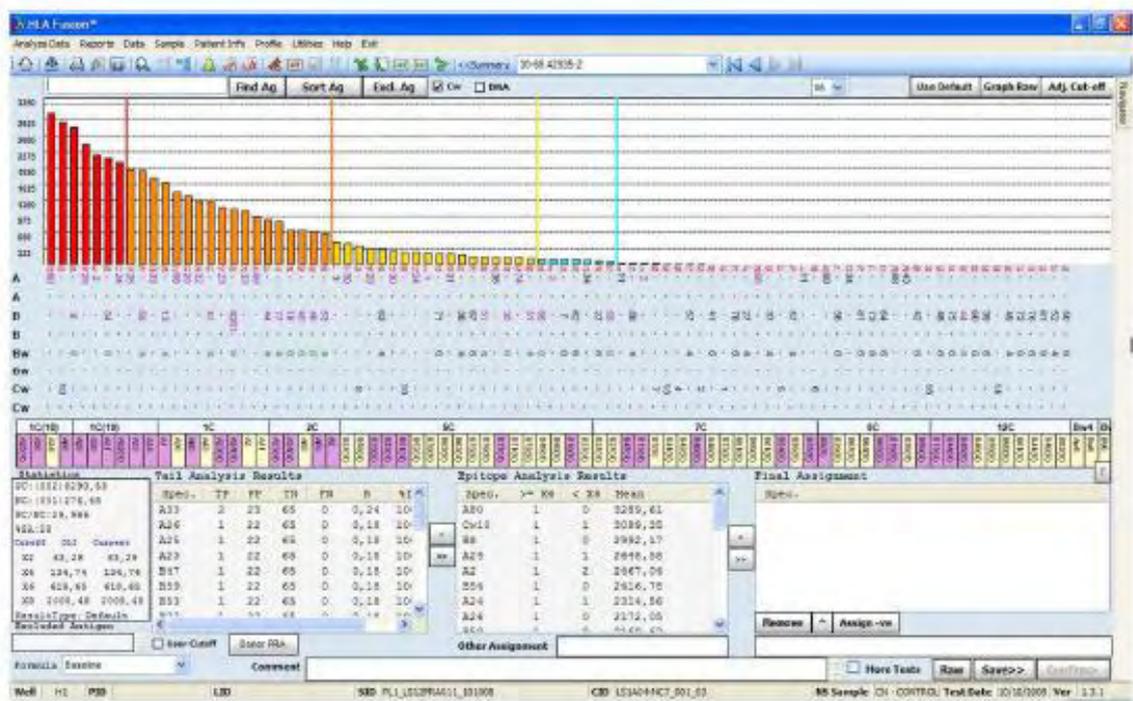


Figura 10: Mostra como pode ser interpretado os dados lidos pelo HLA fusion para 2.0. As colunas em vermelho representam a reação em 8+ (valores maiores que 70% do maior valor obtido pelo BASELINE), as colunas em laranja representam 6+ (valores de 30% a 70% do maior BASELINE encontrado), as colunas em amarelo representam 4+(15% a 30% do maior BASELINE), e as colunas em azul representam 2+ (10% a 15% do maior BASELINE)

Após a interpretação do PRA de Classe I e II, dos pacientes com triagem anti-HLA positivas, em cada ano estudado, foram coletadas as seguintes informações: o valor de PRA (%) de cada paciente, separando os mesmos em quatro grupos distintos de sensibilização (menor que 10%, de 11 a 50%, de 51% a 80%, e maior que 80% de PRA). Outra informação obtida através desta análise foram as quantidades das especificidades de cada anticorpo anti-HLA em cada amostra analisada, a fim de determinar a frequência dos anticorpos anti-HLA nesta população.

Tais informações foram plotados em tabelas e Gráficos do Excel 2007.

### **3.5. Análise estatística:**

Os resultados foram analisados pelo Software HLA fusion 2.0, como descrito anteriormente. Os dados coletados foram contatos e inseridos em tabelas e gráfico (modelo PIZZA e modelo COLUNAS) do Microsoft Excel 2007. Os cálculos realizados foram baseados na Freqüência relativa simples, dadas em porcentagem, permitindo a comparação entre os diferentes dados obtidos em relação ao espaço populacional/amostral que os constituiu.

#### 4 - RESULTADOS:

##### 4.1. TRIAGEM DE ANTICORPOS ANTI-HLA NOS ANOS DE 2008, 2009 E 2010.

##### 4.1.1. Triagem de Anticorpos anti-HLA de classe I e II em pacientes candidatos a transplante renal 2008.

TRIAGEM DE ANTICORPOS ANTI-HLA DE CLASSE I	
NEGATIVOS	1036
POSITIVOS	1453
INATIVOS	904
TOTAL DE PACIENTES	3393

Tabela 1 – Triagem de anticorpos anti – HLA de classe I em pacientes ativos na lista de espera de transplante renal com cadáver.

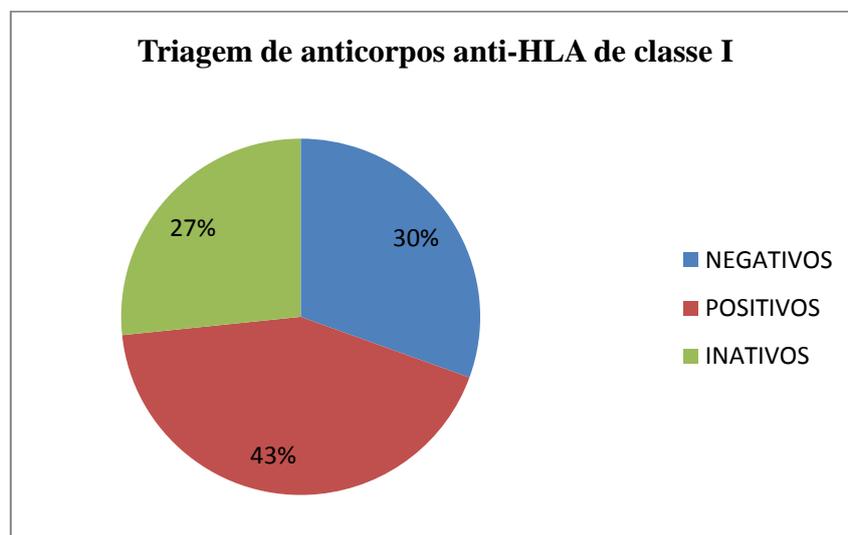


Gráfico 1 – Gráfico representa a tabela acima, apresentando a percentagem de pacientes ativos positivos e negativos para anti-HLA de classe I, além dos pacientes não ativos na lista de espera para transplante renal na regional de Ribeirão Preto no ano de 2008.

TRIAGEM DE ANTICORPOS ANTI-HLA DE CLASSE II	
NEGATIVOS	1653
POSITIVOS	836
INATIVOS	904
TOTAL DE PACIENTES	3393

Tabela 2 – Triagem de anticorpos anti – HLA de classe II em pacientes ativos na lista de espera de transplante renal com cadáver.

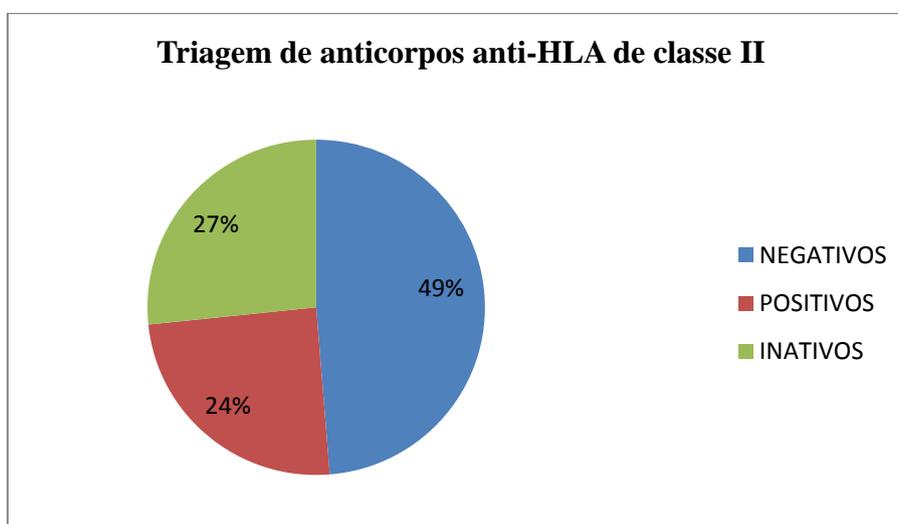


Gráfico 2 – Gráfico representa a tabela acima, apresentando a percentagem de pacientes ativos positivos e negativos para anti-HLA de classe II, além dos pacientes não ativos na lista de espera para transplante renal na regional de Ribeirão Preto no ano de 2008.

PACIENTES ATIVOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA AMBAS AS CLASSES DE HLA	
POSITIVOS	1560
NEGATIVOS	929
TOTAL DE ATIVOS	2489

Tabela 3 – Mostra um dado geral sobre os pacientes ativos positivos para anti-HLA (independente da classe de HLA) e dos negativos anti-HLA para ambas as classes.

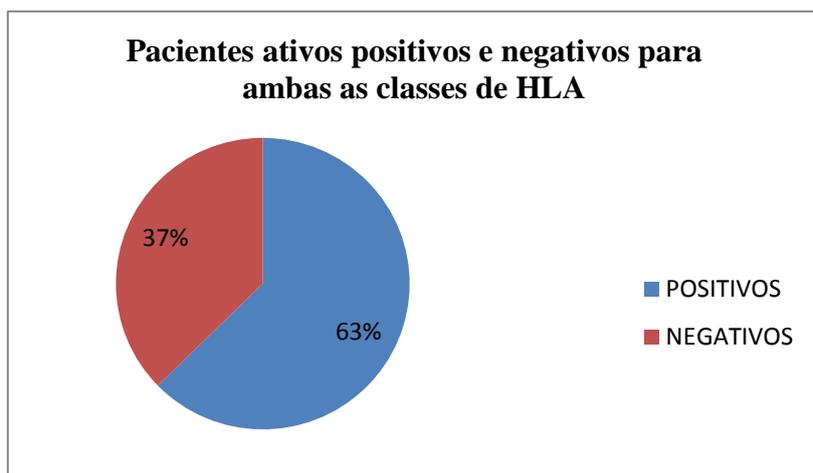


Gráfico 3 – Representa a Tabela acima e mostra um parâmetro geral sobre os pacientes ativos que apresentaram ou não anticorpos anti-HLA no soro.

ESTUDO DOS ANTICORPOS ANTI-HLA NOS PACIENTES ATIVOS EM 2008	
<b>PACIENTES ATIVOS</b>	
POSITIVOS CLASSE I	723
POSITIVOS CLASSE II	106
POSITIVOS I E II	731
NEGATIVOS I E II	929
<b>TOTAL:</b>	<b>2489</b>

Tabela 4 – Representa uma triagem dos pacientes positivos, mostrando os pacientes que possuíam anticorpos anti-HLA apenas para classe I, apenas classe II, ambas as classes e negativos.

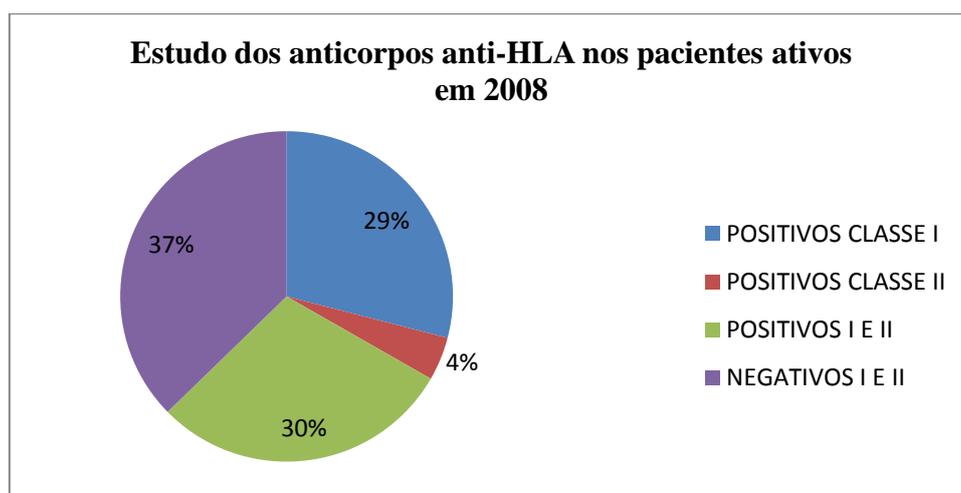


Gráfico 4 – Representação da Tabela acima, mostrando a triagem de anti-HLA de modo mais específico quanto a presença de anticorpos direcionados a cada classe de HLA.

No ano de 2008, a central de transplantes de Ribeirão Preto – SP possuía 3393 pacientes inscritos na fila de transplante renal com cadáver, dos quais 904 (27%) estavam inativos nos meses em que as Triagens/Retipagens anti-HLA foram realizadas. 63% dos pacientes inscritos (2.489) estavam em ordem com a renovação do seu soro na soroteca do laboratório de Histocompatibilidade de Ribeirão Preto, deste modo apresentavam-se ativos na lista.

Os dois primeiros gráficos mostram que além dos 27% de inscritos inativos, 43% dos pacientes apresentavam anticorpos anti-HLA de classe I e que outros 24% dos pacientes apresentavam anticorpos anti-HLA de classe II, sendo que tais dados não são considerados excludentes. Em relação apenas aos ativos, é possível demonstrar que 37% dos pacientes ativos não apresentavam anticorpos dirigidos a HLA e que outros 63% apresentavam anticorpos contra HLA, independente da classe de HLA estudada.

Das amostras estudadas foi possível averiguar que além dos 37% (929) dos pacientes negativos para ambas as classes, 29% (723) dos pacientes apresentaram apenas anticorpos anti-HLA de classe I detectáveis no soro, enquanto apenas 4% (106) dos pacientes ativos apresentavam exclusivamente anti-HLA de II no soro e 30% (731) apresentaram tanto anti-HLA de classe I quanto de classe II detectáveis na amostra analisada.

#### **4.1.2. Triagem de Anticorpos anti-HLA de classe I e II em pacientes candidatos a transplante renal 2009.**

TRIAGEM DE ANTICORPOS ANTI-HLA CLASSE I	
POSITIVOS	1099
NEGATIVOS	630
INATIVOS	1877
TOTAL PACIENTES	3606

Tabela 5 – Triagem de anticorpos anti – HLA de classe I em pacientes ativos na lista de espera de transplante renal com cadáver em 2009.

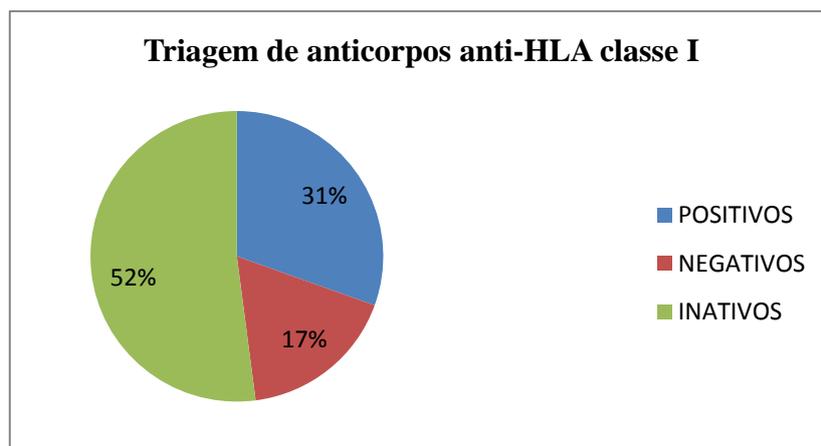


Gráfico 5 – Gráfico representa a tabela anterior, apresentando a percentagem de pacientes ativos positivos e negativos para anti-HLA de classe I, além dos pacientes não ativos na lista de espera para transplante renal na regional de Ribeirão Preto no ano de 2009.

<b>TRIAGEM DE ANTICORPOS ANTI-HLA CLASSE II</b>	
POSITIVOS	587
NEGATIVOS	1142
INATIVOS	1877
<b>TOTAL PACIENTES 2009</b>	<b>3606</b>

Tabela 6 – Triagem de anticorpos anti – HLA de classe II em pacientes ativos na lista de espera de transplante renal com cadáver.

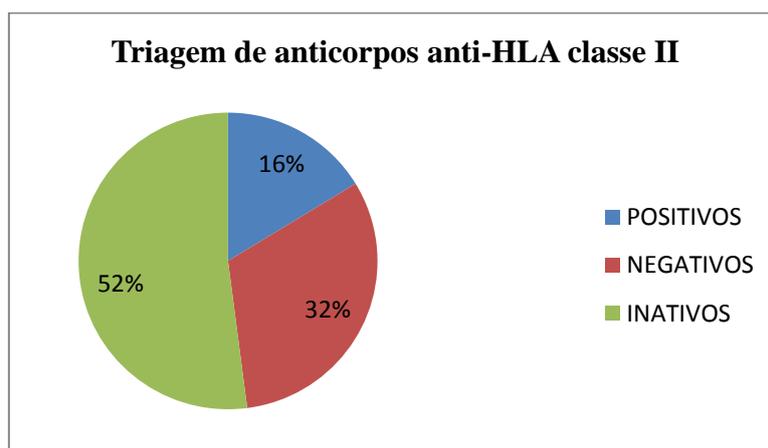


Gráfico 6 – Gráfico representa a tabela acima, apresentando a percentagem de pacientes ativos positivos e negativos para anti-HLA de classe II, além dos pacientes não ativos na lista de espera para transplante renal na regional de Ribeirão Preto no ano de 2009.

**PACIENTES ATIVOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA AMBAS AS CLASSES DE HLA**

POSITIVOS	1149
NEGATIVOS	580
TOTAL DE ATIVOS	1729

Tabela 7 – Mostra um dado geral sobre os pacientes ativos positivos para anti-HLA (independente da classe de HLA) e dos negativos anti-HLA para ambas as classes em 2009.

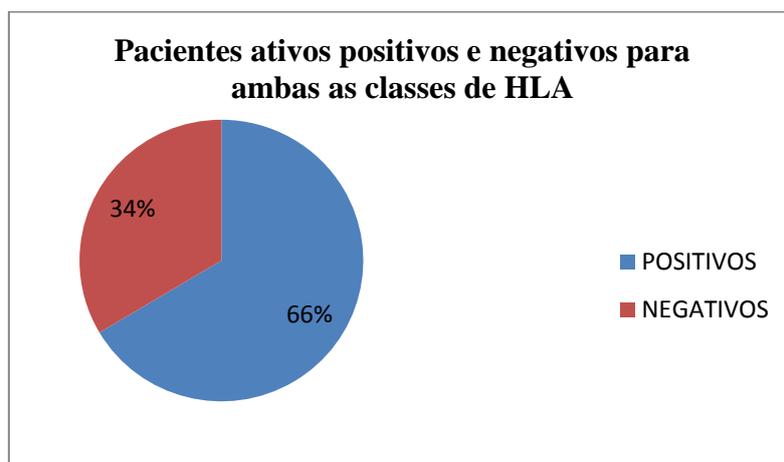


Gráfico 7 – Representa a Tabela acima e mostra um parâmetro geral sobre os pacientes ativos que apresentaram ou não anticorpos anti-HLA no soro.

**ESTUDO DOS ANTICORPOS ANTI-HLA EM PACIENTES ATIVOS DE 2009**

<b>PACIENTES ATIVOS</b>	
POSITIVOS CLASSE I	562
POSITIVOS CLASSE II	50
POSITIVO I E II	537
NEGATIVO I E II	580
TOTAL	1729

Tabela 8 – Representa uma triagem dos pacientes positivos, mostrando os pacientes que possuíam anticorpos anti-HLA apenas para classe I, apenas classe II, ambas as classes e negativos.

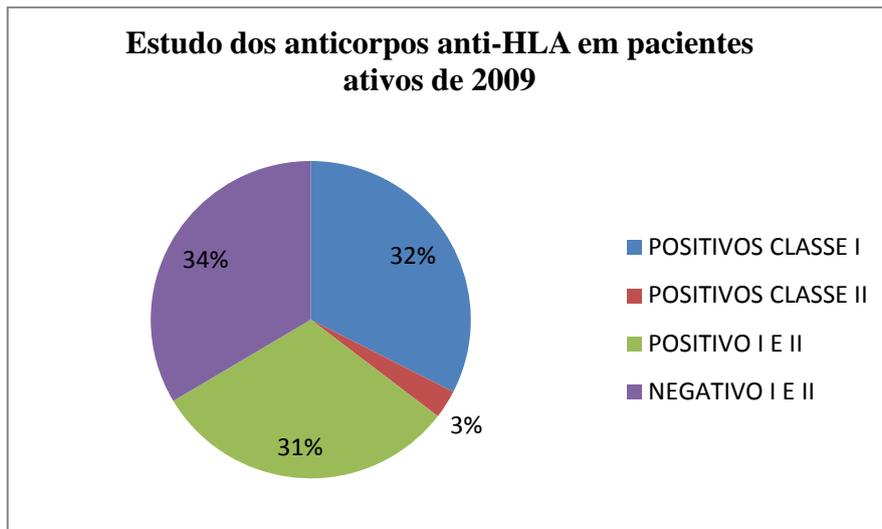


Gráfico 8 – Representação da Tabela acima, mostrando a triagem de anti-HLA de modo mais específico quanto à presença de anticorpos direcionados a cada classe de HLA.

No ano de 2009, havia 3.606 pacientes inscritos na fila de espera do transplante renal na regional de Ribeirão Preto – SP, porém 52% destes pacientes estavam com o soro inativo na soroteca do laboratório de Histocompatibilidade (sem renovação nos últimos três meses). Considerando o total de pacientes inscritos, foi possível observar que 31% apresentaram nesta triagem a presença de anticorpos anti-HLA de classe I em seus soros e que 17% não apresentavam anti-HLA de classe I. Quanto a classe II, também considerando o total de pacientes inscritos foi possível observar que 16% dos pacientes tiveram anti-HLA II detectados em seus soros contra 32% que não apresentavam anti-HLA II.

Quanto aos pacientes ativos (48% do total de inscritos), 34% não apresentavam anti-HLA no soro, independente da classe de tais antígenos e 66% dos ativos possuíam anti-HLA de classe I e/ou II. O Gráfico 8 traz dados mais específicos quanto a presença de anticorpos dirigidos contra as moléculas das classes de HLA, dos 66% de pacientes positivos: 3% dos pacientes apresentavam anticorpos dirigidos apenas para HLA de classe II, 32% possuíam anticorpos apenas contra classe I de HLA e 31% dos pacientes tinham anticorpos dirigidos contra classe I e classe II das moléculas de HLA.

**4.1.3. Triagem de Anticorpos anti-HLA de classe I e II em pacientes candidatos a transplante renal 2010.**

TRIAGEM DE ANTICORPOS ANTI-HLA CLASSE I	
POSITIVOS	666
NEGATIVOS	821
INATIVOS	2250
TOTAL	3737

Tabela 9 – Triagem de anticorpos anti – HLA de classe I em pacientes ativos na lista de espera de transplante renal com cadáver em 2010.

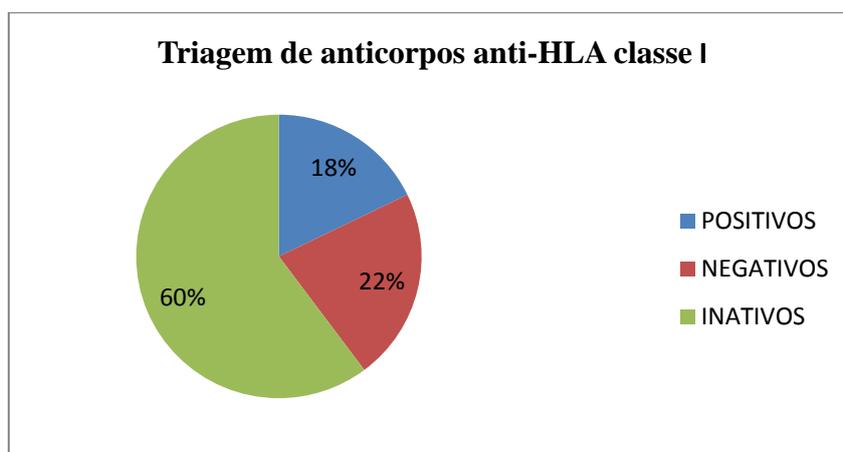


Gráfico 9 – Gráfico representa a tabela anterior, apresentando a percentagem de pacientes ativos positivos e negativos para anti-HLA de classe I, além dos pacientes não ativos na lista de espera para transplante renal na regional de Ribeirão Preto no ano de 2010.

TRIAGEM DE ANTICORPOS ANTI-HLA CLASSE II	
POSITIVOS	433
NEGATIVOS	1054
INATIVOS	2250
TOTAL	3737

Tabela 10 – Triagem de anticorpos anti – HLA de classe II em pacientes ativos na lista de espera de transplante renal com cadáver.

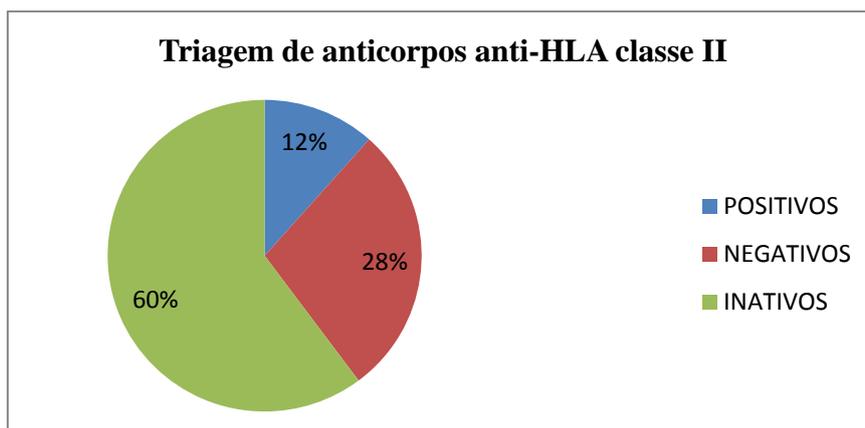


Gráfico 10 – Gráfico representa a tabela acima, apresentando a percentagem de pacientes ativos positivos e negativos para anti-HLA de classe II, além dos pacientes não ativos na lista de espera para transplante renal na regional de Ribeirão Preto no ano de 2010.

PACIENTES ATIVOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA AMBAS AS CLASSES DE HLA	
POSITIVOS	749
NEGATIVOS	738
<b>TOTAL DE ATIVOS</b>	<b>1487</b>

Tabela 11 – Mostra um dado geral sobre os pacientes ativos positivos para anti-HLA (independente da classe de HLA) e dos negativos anti-HLA para ambas as classes em 2010.

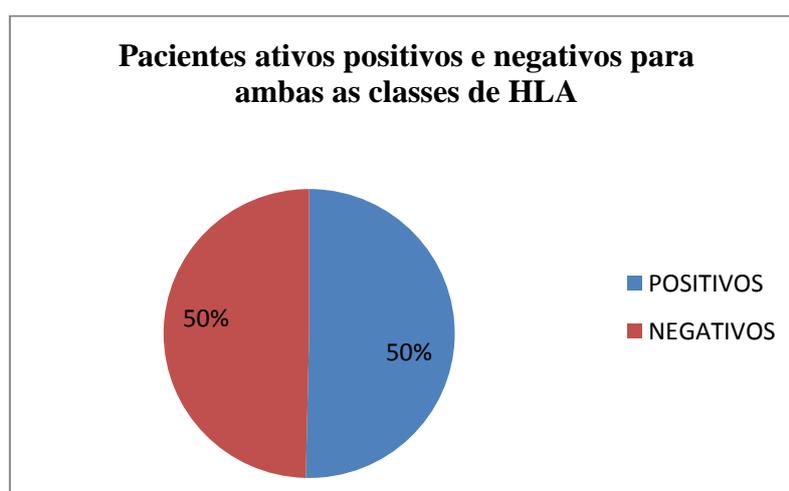


Gráfico 11 – Representa a Tabela acima e mostra um parâmetro geral sobre os pacientes ativos que apresentaram ou não anticorpos anti-HLA no soro.

ESTUDO DOS ANTICORPOS ANTI-HLA EM PACIENTES ATIVOS DE 2010	
PACIENTES ATIVOS	
POSITIVOS CLASSE I	336
POSITIVOS CLASSE II	83
POSITIVO I E II	330
NEGATIVO I E II	738
TOTAL:	1487

Tabela 12 – Representa uma triagem dos pacientes positivos, mostrando os pacientes que possuíam anticorpos anti-HLA apenas para classe I, apenas classe II, ambas as classes e negativos.

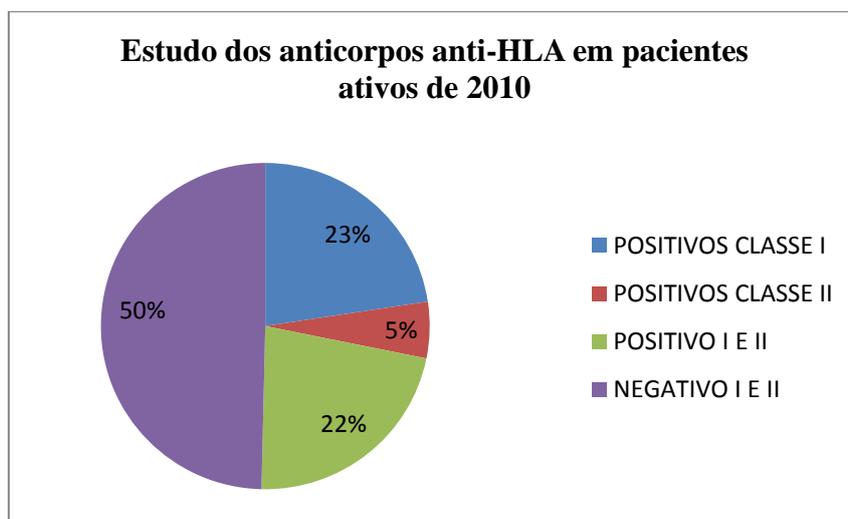


Gráfico 12 – Representação da Tabela acima, mostrando a triagem de anti-HLA de modo mais específico quanto à presença de anticorpos direcionados a cada classe de HLA.

Dos 3737 pacientes inscritos nesta Regional até o início do ano de 2010, apenas 40% apresentavam-se ativos nos meses de realização da Retipagem de 2010, sendo que destes 40%, 18% dos pacientes apresentavam positividade para Classe I e 22% não apresentaram anti-HLA de classe I e para a pesquisa de anti-HLA de classe II, 12% foram positivos e 28% negativos.

Dos 1487 pacientes ativos na lista para transplante renal em 2010, 50% apresentaram anti-HLA no soro contra outros 50% que não apresentavam anticorpos dirigidos contra moléculas de HLA. Destes 50% de pacientes positivos, 5% apresentavam positividade apenas para a classe II, 23% apenas para a classe I e outros 22% apresentavam tanto anti-HLA classe I quanto os anticorpos dirigidos para a classe II de HLA.

## 4.2. . TRIAGEM DE ANTICORPOS ANTI-MIC NOS ANOS DE 2008, 2009 E 2010.

### 4.2.1. Anticorpos anti-MIC em pacientes candidatos a transplante renal no ano de 2008.

TRIAGEM DE ANTICORPOS ANTI-MIC EM PACIENTES CANDIDATOS A TX RENAL 2008

MIC POSITIVOS	1120
MIC NEGATIVOS	1246
SEM RESULTADO	123
TOTAL	2489

Tabela 13: Mostra o perfil dos pacientes em relação a presença ou não de anticorpos anti-MIC em 2008.

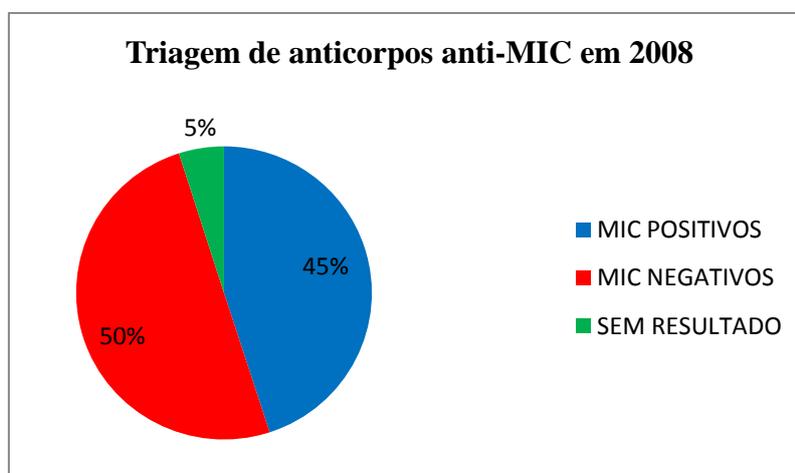


Gráfico 13: Mostra o freqüência de anticorpos anti-MIC em 2008.

Os dados acima demonstram que dos pacientes ativos em 2008, 5% não apresentavam resultados da triagem de anti-MIC, devido à ausência do método laboratorial (LSM12) para detecção de anti-MIC até o início de 2008. Dos demais pacientes ativos triados neste ano, 45% apresentavam anti-MIC detectados no soro, contra outros 50% que foram negativos para anti-MIC.

#### 4.2.1 Anticorpos anti-MIC em pacientes candidatos a transplante renal no ano de 2009.

TRIAGEM DE ANTICORPOS ANTI-MIC EM PACIENTES CANDIDATOS A TX RENAL 2009	
MIC POSITIVOS	670
MIC NEGATIVOS	1059
TOTAL	1729

Tabela 14: Mostra o perfil dos pacientes em relação a presença ou não de anticorpos anti-MIC em 2009.

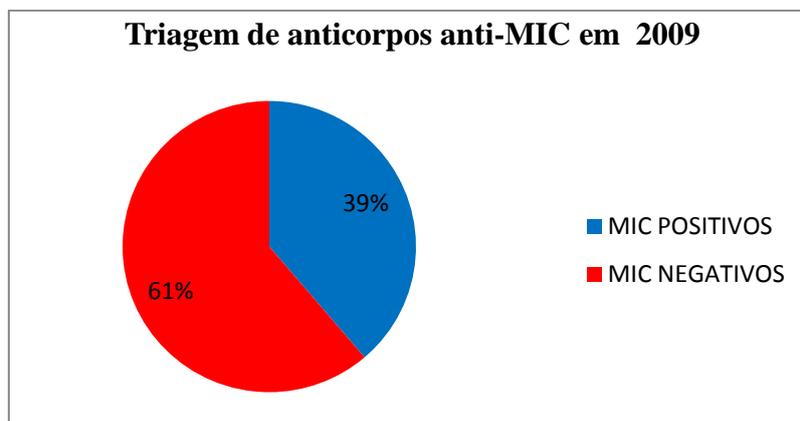


Gráfico 14: Frequência de anticorpos anti-MIC em 2009

Os dados acima mostram que 39% dos pacientes ativos na lista de espera para transplante renal com cadáver apresentavam anti-MIC no soro, enquanto 61% dos pacientes neste mesmo ano apresentavam-se negativos para a pesquisa de tal anticorpo.

#### 4.2.3. Anticorpos anti-MIC em pacientes candidatos a transplante renal no ano de 2010.

TRIAGEM DE ANTICORPOS ANTI-MIC EM PACIENTES CANDIDATOS A TX RENAL 2010	
MIC POSITIVOS	728
MIC NEGATIVOS	759
TOTAL	1487

Tabela 15: Mostra o perfil dos pacientes em relação a presença ou não de anticorpos anti-MIC em 2010.

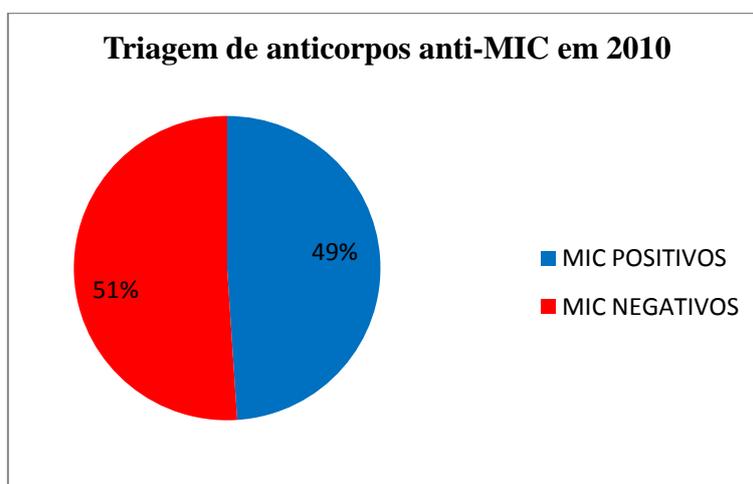


Gráfico 15: Freqüência de anticorpos anti-MIC em 2010

Na Retipagem realizada em 2010 pelo laboratório de Histocompatibilidade de Ribeirão Preto, dos 1.487 pacientes considerados ativos, 51% não apresentavam anti-MIC no soro, enquanto 49% apresentavam anticorpos dirigidos contra MIC no soro.

### 4.3. PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-MIC EM RELAÇÃO AOS PACIENTES ATIVOS SENSIBILIZADOS POR MOLÉCULAS HLA.

#### 4.3.1. Indivíduos sensibilizados por MIC em relação aos mesmos indivíduos sensibilizados por HLA (2008).

RELAÇÃO ENTRE A SENSIBILIZAÇÃO MIC X HLA EM PACIENTES ATIVOS 2008			
HLA/MIC	MIC POSITIVOS	MIC NEGATIVOS	TOTAL HLA
POSITIVOS CLASSE I	397	326	723
POSITIVOS CLASSE II	32	74	106
POSITIVO CLASSE I E II	416	314	730
POSITIVOS GERAL	845	714	1559
NEGATIVOS	275	532	807
TOTAL MIC	1120	1246	2366

Tabela 16 – Relação entre os diferentes pacientes positivos e negativos para HLA e positivos e negativos para MIC, no ano de 2008.

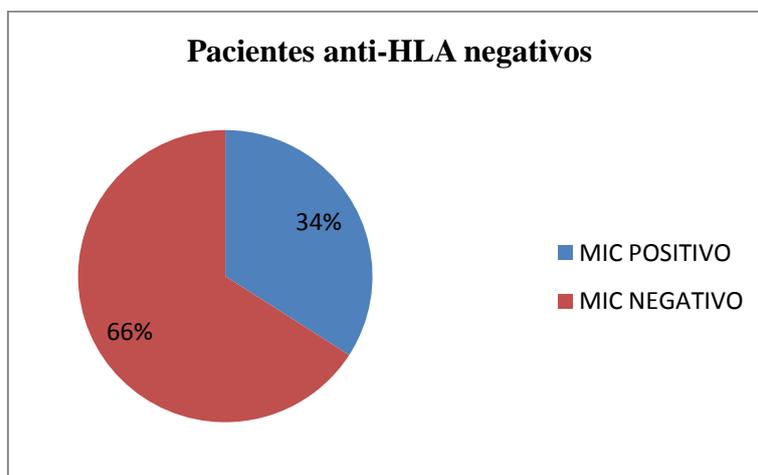


Gráfico 16.1 – Perfil sorológico (anti-MIC) em relação aos pacientes negativos para anti-HLA.

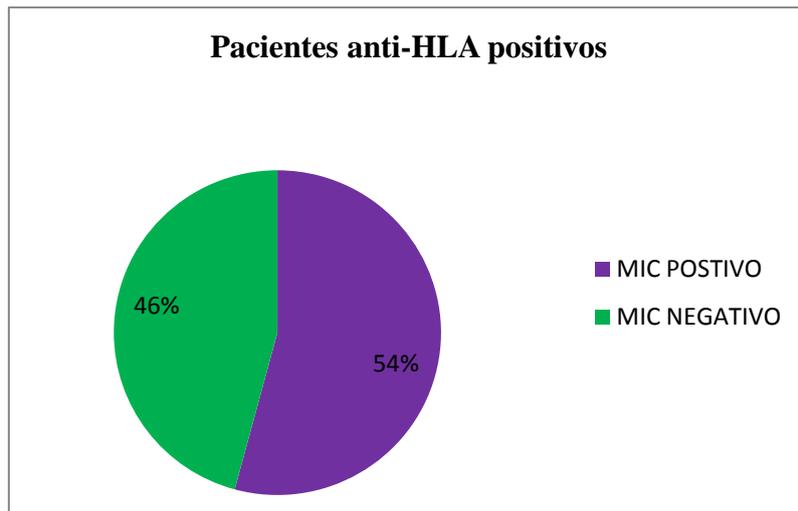


Gráfico 16.2 – Perfil sorológico (anti-MIC) em relação aos pacientes positivos para anti-HLA.

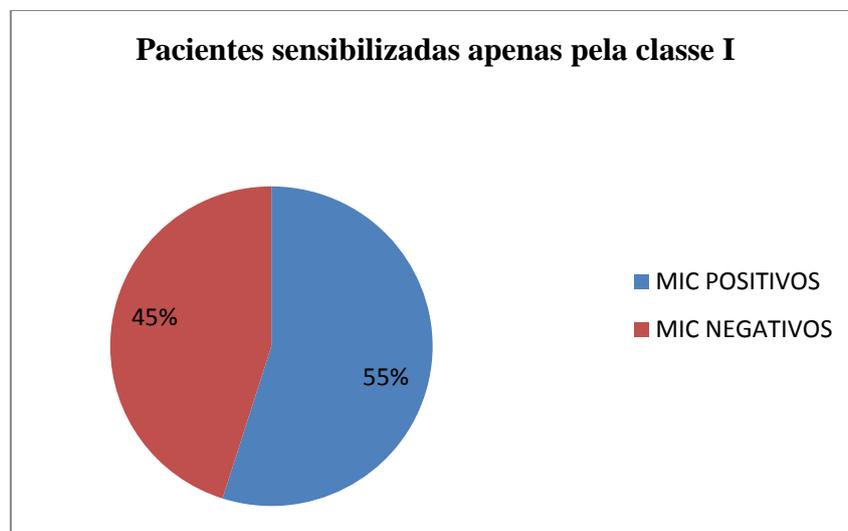


Gráfico 16.3 – Perfil sorológico (anti-MIC) em relação aos pacientes positivos apenas para anti-HLA de classe I

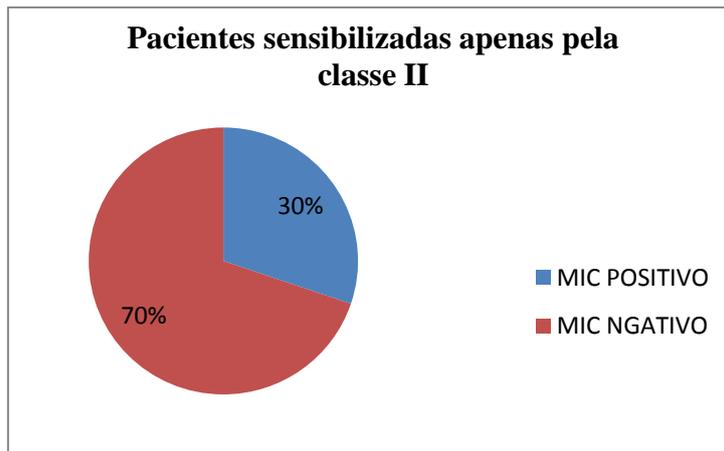


Gráfico 16.4 – Perfil sorológico (anti-MIC) em relação aos pacientes positivos apenas para anti-HLA de classe II

Das 2.366 amostras analisadas em relação à presença de anticorpos anti-MIC (ano 2008), 45% dos pacientes apresentaram anti-MIC. Em relação aos pacientes que não apresentavam anti-HLA (807 pacientes), 66% destes pacientes também não apresentavam anti-MIC e 34% apresentaram anticorpos anti-MIC. Dentre os pacientes que apresentaram anti-HLA no soro (66% do total de pacientes ativos em 2008), 54% apresentaram anti-MIC e outros 46% não possuíam anticorpos anti-MIC. Entre os pacientes que apresentaram apenas anti-HLA de classe I (29% do total), 55% apresentavam anti-MIC enquanto 45% não possuíam tais anticorpos no soro. Com relação aos pacientes que possuíam sensibilização apenas para HLA classe II (4% do total), 70% não apresentaram sensibilização para MIC enquanto 30% apresentaram anticorpos anti-MIC no soro.

**4.3.2. Indivíduos sensibilizados por MIC em relação aos mesmos indivíduos sensibilizados por HLA (2009).**

**RELAÇÃO ENTRE A SENSIBILIZAÇÃO MIC X HLA EM PACIENTES ATIVOS 2009**

HLA/MIC	MIC POSITIVO	MIC NEGATIVO	TOTAL HLA
POSITIVOS CLASSE I	240	322	562
POSITIVOS CLASSE II	16	34	50
POSITIVO CLASSE I E II	244	293	537
POSITIVOS GERAL	500	649	1149
NEGATIVOS	170	410	580
TOTAL MIC	670	1059	1729

Tabela 17 – Relação entre os diferentes pacientes positivos e negativos para HLA e positivos e negativos para MIC, no ano de 2009.

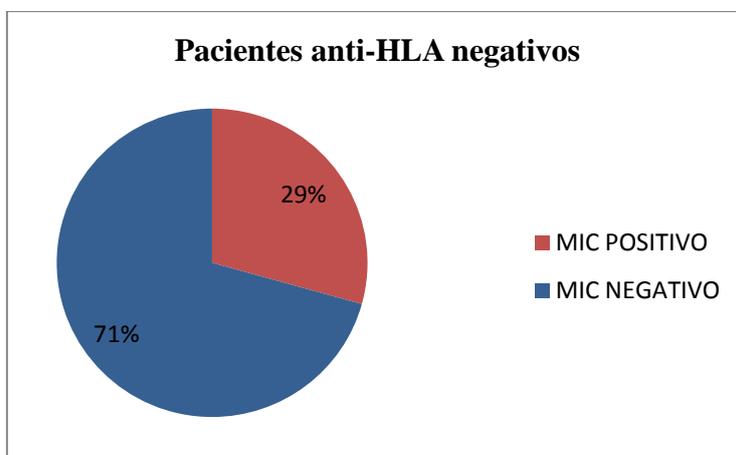


Gráfico 17.1 – Perfil sorológico (anti-MIC) em relação aos pacientes negativos para anti-HLA.

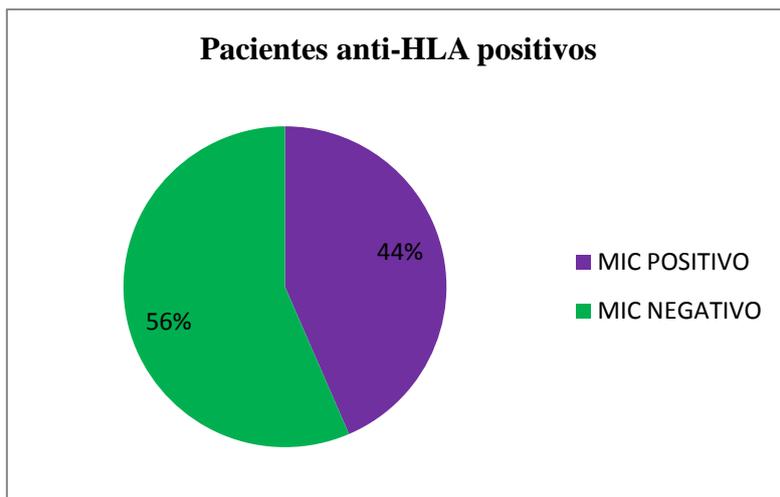


Gráfico 17.2 – Perfil sorológico (anti-MIC) em relação aos pacientes positivos para anti-HLA

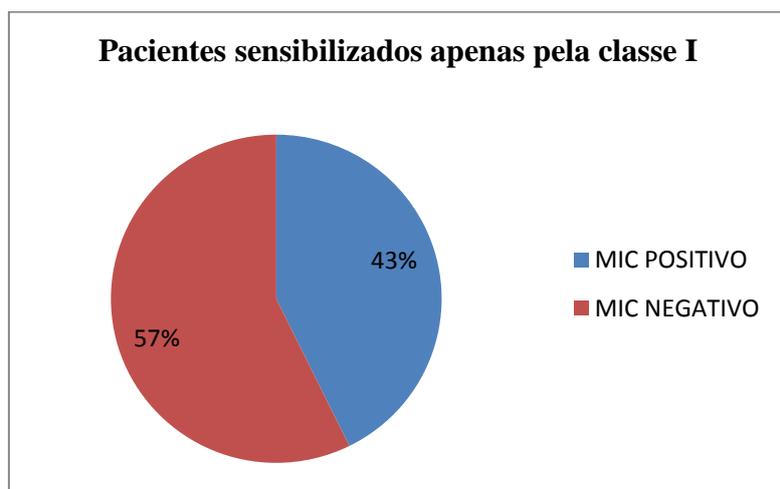


Gráfico 17.3 – Perfil sorológico (anti-MIC) em relação aos pacientes positivos apenas para anti-HLA de classe I.

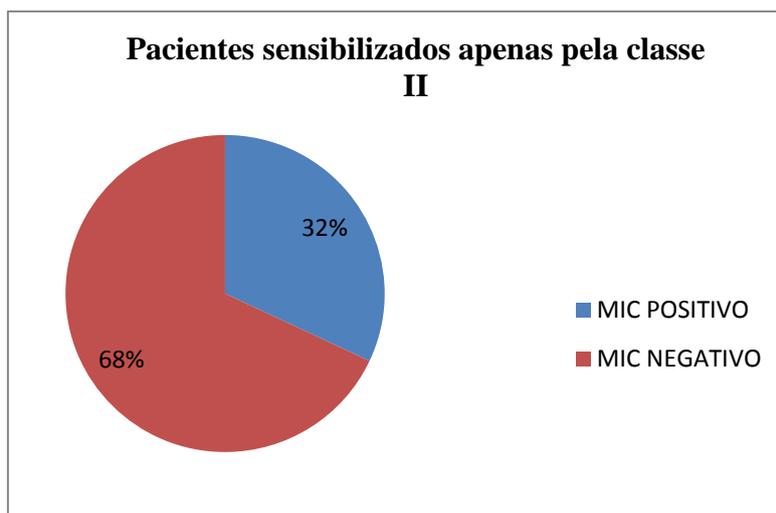


Gráfico 17.4 – Perfil sorológico (anti-MIC) em relação aos pacientes positivos apenas para anti-HLA de classe II

Dos 1.729 amostras analisadas em relação a presença de anticorpos anti-HLA e a presença de anticorpos anti-MIC, é possível demonstrar que dos pacientes que não apresentaram anticorpos anti-HLA (negativos), 71% também eram negativos quanto a presença de anti-MIC, contra 39% que não possuíam anti-HLA, mas possuíam anti-MIC no soro. Em relação aqueles pacientes que possuíam anti-HLA (positivos), dos quais 44% também apresentavam anticorpos anti-MIC no soro, contra outros 56% que possuíam anti-HLA, mas não possuíam anti-MIC. Dos pacientes positivos para anti-HLA, daqueles que apresentavam-se sensibilizados apenas para classe I, 43% apresentavam-se sensibilizados para MIC contra 57% que não apresentavam anticorpos anti-MIC. Daqueles que possuíam anticorpos apenas contra HLA classe II, a grande maioria representada por 68% não apresentavam anticorpos anti-MIC.

**4.3.2. Indivíduos sensibilizados por MIC em relação aos mesmos indivíduos sensibilizados por HLA (2010).**

RELAÇÃO ENTRE A SENSIBILIZAÇÃO MIC X HLA EM PACIENTES ATIVOS 2010			
HLA/MIC	MIC POSITIVO	MIC NEGATIVO	TOTAL HLA
POSITIVOS CLASSE I	179	157	336
POSITIVOS CLASSE II	41	42	83
POSITIVO CLASSE I E II	179	151	330
POSITIVOS GERAL	399	350	749
NEGATIVOS	329	409	738
TOTAL MIC	728	759	1487

Tabela 18 – Relação entre os diferentes pacientes positivos e negativos para HLA e positivos e negativos para MIC, no ano de 2010.

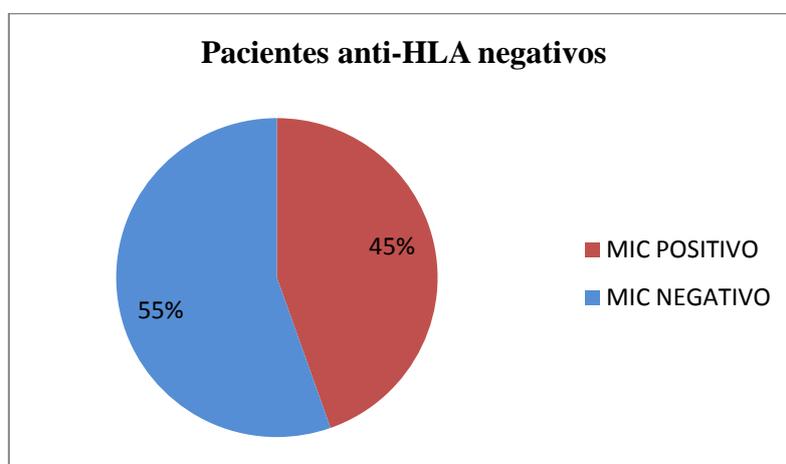


Gráfico 18.1 – Perfil sorológico (anti-MIC) em relação aos pacientes negativos para anti-HLA.

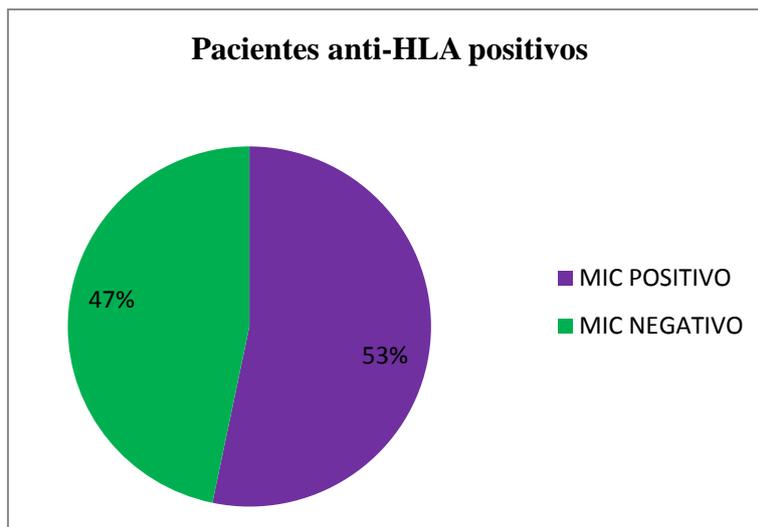


Gráfico 18.2 – Perfil sorológico (anti-MIC) em relação aos pacientes positivos para anti-HLA

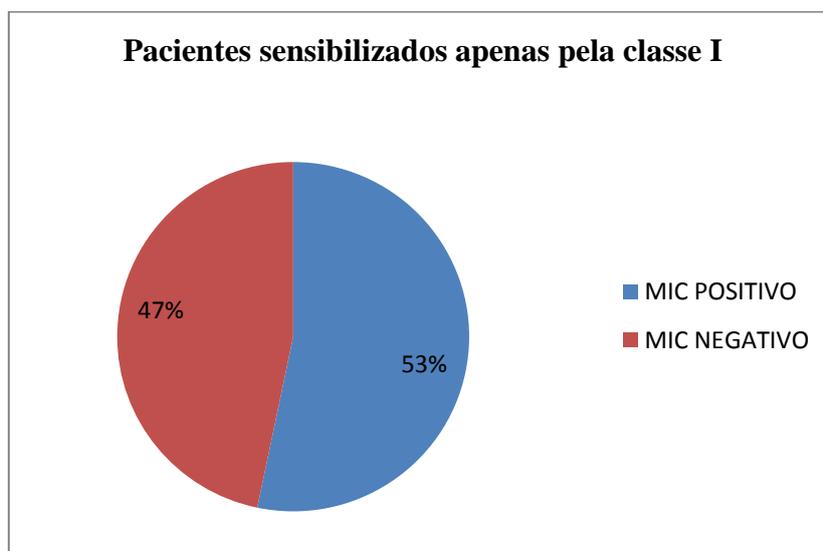


Gráfico 18.3 – Perfil sorológico (anti-MIC) em relação aos pacientes positivos apenas para anti-HLA de classe I

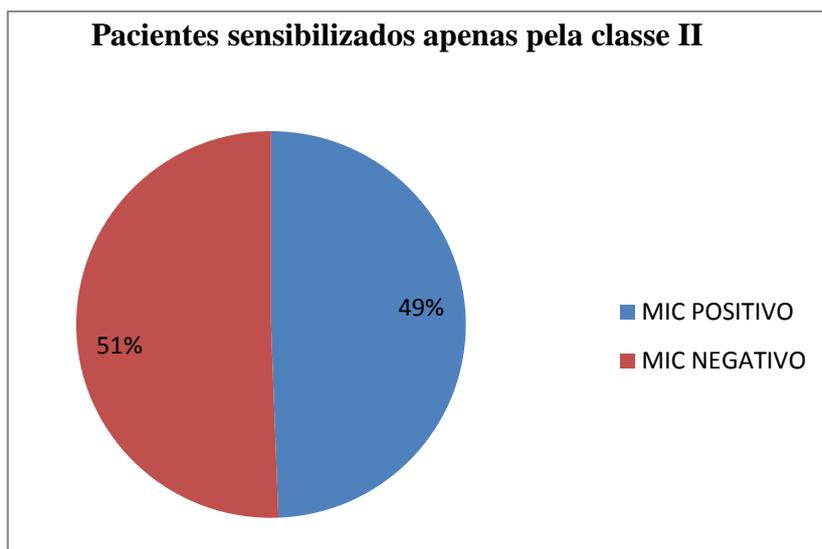


Gráfico 18.4 – Perfil sorológico (anti-MIC) em relação aos pacientes positivos apenas para anti-HLA de classe II

Das 1.487 amostras analisadas (referente aos pacientes ativos em 2010), 50% dos pacientes não apresentavam anticorpos anti-HLA, sendo que destes pacientes negativos para anti-HLA, 55% também se apresentavam anti-MIC negativos e 45 % possuíam a presença de anti-MIC no soro. Dentre os pacientes anti-HLA positivos, 53% também apresentaram anti-MIC contra 47% negativos para anti-MIC.

Dos pacientes positivos para anti-HLA, aqueles sensibilizados apenas pela classe I, 53% apresentavam anti-MIC e 47% não apresentaram tais anticorpos, e aqueles sensibilizados apenas para HLA classe II, 49% tinha a presença de anticorpos anti-HLA no soro.

#### 4.4. ESTUDO DA SENSIBILIZAÇÃO DOS PACIENTES CANDIDATOS A TRANSPLANTE RENAL EM 2008, 2009 E 2010.

##### 4.4.1. Distribuição dos perfis de sensibilização dos candidatos a transplante renal

ESTUDO DA SENSIBILIZAÇÃO DE PACIENTES CANDIDATOS A TRANSPLANTE RENAL EM 2008	
NÃO SENSIBILIZADOS (PRA <10%)	156
SENSIBILIZADOS (PRA >10% e <50%)	342
HIPERSENSIBILIZADOS (PRA >50% e <80%)	144
HIPERSENSIBILIZADOS COM ALTO RISCO (> 80%)	108
<b>TOTAL</b>	<b>750</b>

Tabela 19: Mostra a distribuição entre os diferentes perfis de PRA quanto a sensibilização de cada grupo de indivíduos inscritos na fila de espera para transplante renal.

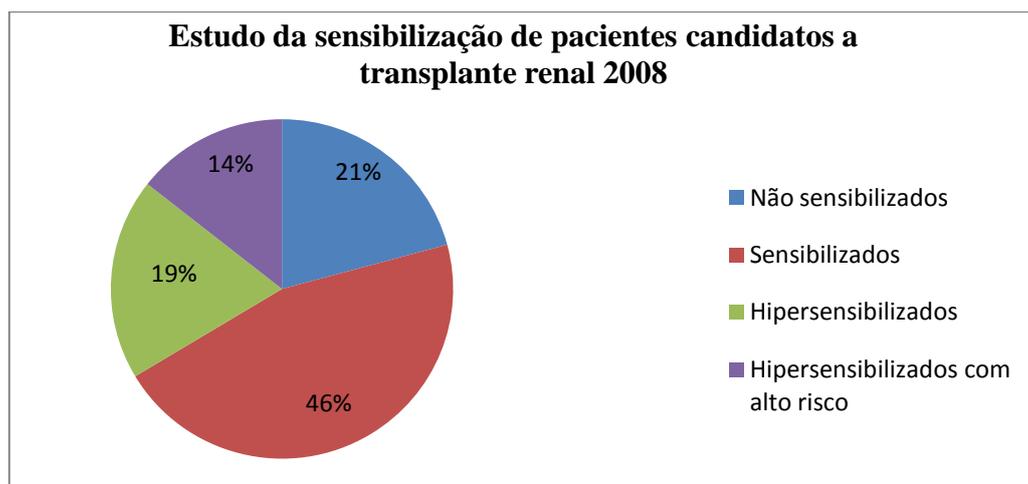


Gráfico 19: distribuição da sensibilização dos diferentes pacientes em 2008, representando a tabela acima.

ESTUDO DA SENSIBILIZAÇÃO DE PACIENTES CANDIDATOS A TRANSPLANTE RENAL EM 2009	
NÃO SENSIBILIZADOS (PRA <10%)	182
SENSIBILIZADOS (PRA >10% e <50%)	282
HIPERSENSIBILIZADOS (PRA >50% e <80%)	102
HIPERSENSIBILIZADOS COM ALTO RISCO (> 80%)	132
<b>TOTAL</b>	<b>698</b>

Tabela 20: Mostra a distribuição entre os diferentes perfis de PRA dando a sensibilização de cada grupo de indivíduos inscritos na fila de espera para transplante renal.

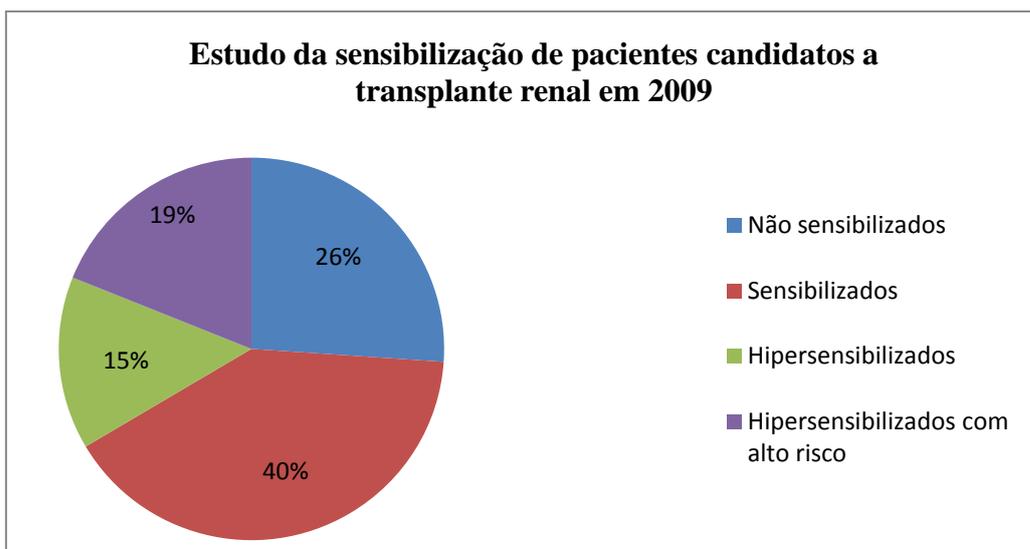


Gráfico 20: distribuição da sensibilização dos diferentes pacientes em 2009, representando a tabela acima.

**ESTUDO DA SENSIBILIZAÇÃO DE PACIENTES CANDIDATOS A TRANSPLANTE RENAL EM 2010**

NÃO SENSIBILIZADOS (PRA < 10%)	68
SENSIBILIZADOS (PRA > 10% e < 50%)	231
HIPERSENSIBILIZADOS (PRA > 50% e < 80%)	110
HIPERSENSIBILIZADOS COM ALTO RISCO (> 80%)	139
<b>TOTAL</b>	<b>548</b>

Tabela 21: Mostra a distribuição entre os diferentes perfis de PRA quanto a sensibilização de cada grupo de pacientes inscritos na fila de espera para transplante renal.

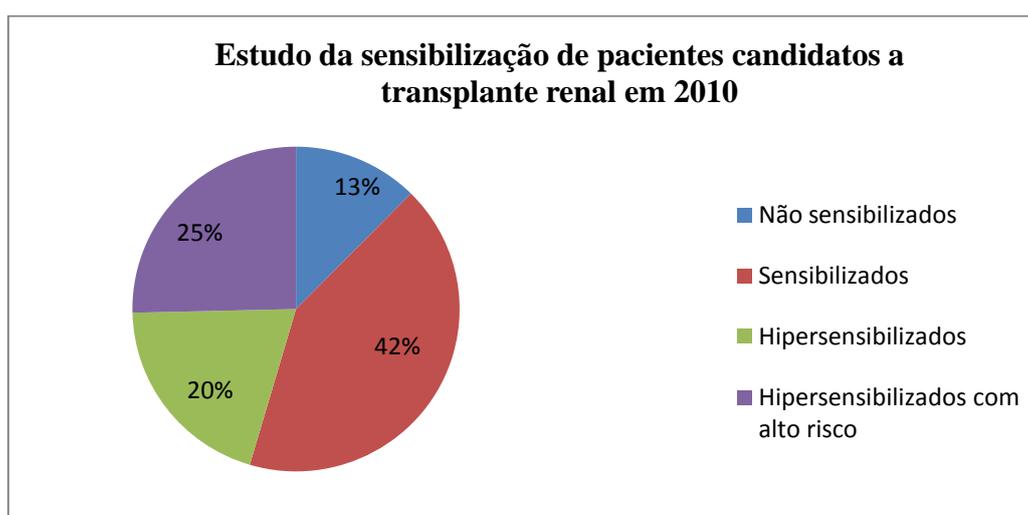


Gráfico 21: distribuição da sensibilização dos diferentes pacientes em 2010, representando a tabela acima.

Os pacientes considerados como não sensibilizados ou com baixíssima sensibilização são aqueles que possuem PRA menor que 10%, os quais tiveram diferentes freqüências ao longo dos três anos últimos anos, sendo que em 2008 este grupo representava 21% dos pacientes que tiveram seu soro triados positivamente. Já em 2009 esse grupo de baixo risco representava 26% do total de pacientes estudados e em 2010, o mesmo grupo obteve uma baixa representação de 13% dos os indivíduos candidatos a transplante renal.

Os pacientes considerados com risco moderado de rejeição em longo prazo, caso sejam transplantados, são aqueles que apresentam PRA maior que 10% e menor que 50%, os quais representaram em 2008, 46% do total de pacientes estudados e essa freqüência não se modificou muito ao longo dos anos seguintes, sendo que em 2009 representaram 40% dos indivíduos e em 2010 essa freqüência foi de 42%. Uma sensibilização considerada alta (hipersensibilização) é representada por um PRA maior que 50%, sendo que os pacientes hipersensibilizados apresentam um risco maior de ter a meia vida do enxerto diminuída, após transplante. Esses pacientes representaram no ano de 2008 mais de 30%, sendo que 19% tinham um PRA maior que 50%, porém menor que 80%, e outros 14% apresentaram um PRA maior que 80%, o qual é considerado um PRA de altíssimo risco para uma futura rejeição.

Em 2009, os pacientes hipersensibilizados com PRA menor que 80% representaram 15% da população estudada e aqueles com Painel de altíssimo risco tiveram a freqüência de 19%. Já em 2010, os índices de pacientes hipersensibilizados aumentaram para 45%, sendo que aqueles com PRA entre 50 e 80%, representaram 20% da população e aqueles com Painel acima de 80% representaram 25% da população de candidatos a Transplante renal com triagem positiva.

**4.4.2. Influência dos principais fatores causais sobre os diferentes perfis sensibilização (produção de anticorpos anti-HLA) em pacientes candidatos ao Transplante renal.**

<b>Perfil dos Pacientes não sensibilizados</b>			
<b>Pacientes</b>	<b>Transfusões</b>	<b>Retransplante</b>	<b>Gestação (n°)</b>
1	>10	Não	
2	6 à 10	Não	
3	Não	Sim	
4	Não	Não	
5	Não	Não	
6	1 à 5	Não	
7	Não	Não	
8	Não	Não	
9	Não	Não	
10	1 à 5	Não	
11	Não	Não	Sim (4)
12	Não	Não	Não
13	6 à 10	Não	Não
14	Não	Não	Não
15	Não	Não	Não
16	1 à 5	Não	Não
17	Não	Não	Não
18	Não	Não	Não
19	Não	Não	Não
20	Não	Não	Não

Tabela 23: Mostra dentro de uma amostra de 20 pacientes (10 homens e 10 mulheres) com PRA menor que 10%, os possíveis eventos causais da sensibilização de cada paciente.

Dentre esse grupo de pacientes, pode se considerar que 20% destes pacientes já receberam em algum momento da vida transfusões sanguíneas, sendo que destes 15% podem ser considerados politransfundidos. Neste mesmo grupo 5% já foram transplantados anteriormente e dentre as pacientes do sexo feminino, 20% já passaram por alguma gestação com média de 0,5 gestações/cada paciente mulher.

<b>Perfil dos Pacientes Sensibilizados</b>			
<b>Pacientes</b>	<b>Transfusões</b>	<b>Retransplante</b>	<b>Gestação (n°)</b>
1	6 à 10	Sim	
2	6 à 10	Sim	
3	1 à 5	Não	
4	6 à 10	Não	
5	6 à 10	Não	
6	1 à 5	Sim	
7	6 à 10	Sim	
8	1 à 5	Não	
9	1 à 5	Não	
10	>10	Não	
11	1 à 5	Não	Não
12	>10	Não	Sim (10)
13	1 à 5	Não	Não
14	6 à 10	Não	Não
15	1 à 5	Não	Sim (3)
16	Não	Não	Sim (2)
17	1 à 5	Não	Sim (1)
18	Não	Não	Sim (6)
19	Não	Não	Sim (1)
20	1 à 5	Não	Não

Tabela 24: Mostra dentro de uma amostra de 20 pacientes (10 homens e 10 mulheres) com PRA maior que 10% e menor que 50%, os possíveis eventos causais da sensibilização de cada paciente.

Neste caso 85% dos pacientes sensibilizados já receberam doação de sangue em algum período anteriormente a realização do Painel, sendo que destes 40% foram considerados politransfundidos. Dentre esse mesmo grupo 20% dos pacientes já foram Transplantes anteriormente. Das mulheres investigadas 60% das mesmas já passaram por alguma gestação, com média de 2,3 gestações/ cada paciente do sexo feminino investigada.

<b>Perfil dos Pacientes Hipersensibilizados</b>			
<b>Pacientes</b>	<b>Transfusões</b>	<b>Retransplante</b>	<b>Gestação (nº)</b>
1	Não	Sim	
2	6 à 10	Não	
3	>10	Não	
4	1 à 5	Não	
5	1 à 5	Não	
6	>10	Não	
7	6 à 10	Sim	
8	1 à 5	Não	
9	6 à 10	Não	
10	1 à 5	Não	
11	6 à 10	Não	Sim (1)
12	6 à 10	Não	Não
13	6 à 10	Não	Sim (6)
14	6 à 10	Não	Sim (2)
15	6 à 10	Sim	Sim (3)
16	1 à 5	Não	Não
17	1 à 5	Sim	Não
18	1 à 5	Não	Não
19	1 à 5	Não	Sim (3)
20	1 à 5	Não	Não

Tabela 25: Mostra dentro de uma amostra de 20 pacientes (10 homens e 10 mulheres) com PRA maior que 50% e menor que 80%, os possíveis eventos causais da sensibilização de cada paciente.

Neste grupo de pacientes, 95% já foram transfundidos em algum momento de suas vidas, sendo que 50% destes são politransfundidos. Sendo que 20% dos pacientes deste grupo já receberam algum transplante anteriormente à realização do PRA. Das pacientes investigadas, 50% já passaram por alguma gestação, sendo que a média de gestação de 1,5 por paciente do sexo feminino.

<b>Perfil dos Pacientes Hipersensibilizados com alto risco</b>			
<b>Pacientes</b>	<b>Transfusões</b>	<b>Retransplante</b>	<b>Gestação (n°)</b>
1	1 à 5	Sim	
2	Não	Sim	
3	6 à 10	Sim	
4	1 à 5	Sim	
5	6 à 10	Sim	
6	1 à 5	Sim	
7	Não	Sim	
8	1 à 5	Sim	
9	1 à 5	Sim	
10	6 à 10	Não	
11	> 10	Não	Sim (3)
12	1 à 5	Não	Não
13	1 à 5	Não	Sim (2)
14	Não	Não	Sim (4)
15	6 à 10	Não	Sim (2)
16	>10	Sim	Não
17	1 à 5	Não	Sim (2)
18	1 à 5	Não	Sim (10)
19	6 à 10	Sim	Não
20	6 à 10	Sim	Não

Tabela 26: Mostra dentro de uma amostra de 20 pacientes (10 homens e 10 mulheres) com PRA maior que 80%, os possíveis eventos causais da sensibilização de cada paciente.

Dos pacientes que se apresentavam hipersensibilizados com altíssimo risco de redução da meia vida do enxerto após transplante, caso sejam transplantados, ou seja, com PRA maior que 80%, tiveram a frequência de 85% de transfusões anteriores, sendo 40% dos mesmos foram considerados politransfundidos. Deste grupo estudado, 60% já foram submetidos a transplantes anteriormente ao exame. Das mulheres estudadas, 60% já estiveram grávidas, sendo a média de gestações por mulher de 2,4.

DISTRIBUIÇÃO DOS PRINCIPAIS FATORES CAUSAIS DA PRODUÇÃO DE ANTI-HLA EM CADA GRUPO DE PACIENTES TRIADOS POSITIVAMENTE.				
	NÃO SENSIBILIZADOS	SENSIBILIZADOS	HIPERSENSIBILIZADOS	HIPERS. DE ALTO RISCO
TRANSFUSÕES	4 casos	17 casos	19 casos	17 casos
RETRANSPLANTES	1 caso	4 casos	4 casos	12 casos
GESTAÇÕES	2 casos	6 casos	5 casos	6 casos

Tabela 27: Resume as quatro tabelas anteriores, sobre a possível influência dos principais fatores causais sobre os diferentes perfis de sensibilização dada por PRA.

É possível observar que os pacientes que possuíam um PRA baixo (menor que 10%), tiveram baixa exposição frente aos principais fatores para sensibilização e produção de anti-HLA. Enquanto apenas 4 casos foram observados de transfusões neste grupo, este número aumentou para no mínimo quatro vezes mais quando se trata dos demais grupos ditos como sensibilizados. O mesmo é observado entre as mulheres sendo que os casos de gestação triplicaram nos demais grupos em relação ao primeiro grupo. O Transplante prévio mostrou-se ser um importante fator para o aumento de PRA, quando se trata dos grupos sensibilizados e hipersensibilizados, em relação ao primeiro grupo, mostrando ser um fator determinante para a hipersensibilização de grande risco, já que para este grupo foram encontrados 12 casos de Retransplantes em relação a 4 casos no grupo anterior a este.

#### 4.5 FREQUÊNCIAS DOS PRINCIPAIS ALOANTICORPOS ANTI-HLA ENCONTRADOS NA POPULAÇÃO DE CANDIDATOS A TRANSPLANTE RENAL NA REGIONAL DE RIBEIRÃO PRETO NOS ANOS DE 2008, 2009 E 2010.

##### 4.5.1. Frequência de anticorpos anti-HLA de classe I

FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-HLA CLASSE I			
	ANTI-HLA A	ANTI-HLA B	ANTI-HLA Cw
%	%	%	
2008	74,4	78,6	41,7
2009	50,1	56,2	31
2010	68	74	43,7
MÉDIA	64,2	69,6	38,8
%			

Tabela 28: Mostra distribuição dos aloanticorpos anti-HLA de Classe I nos anos estudados.

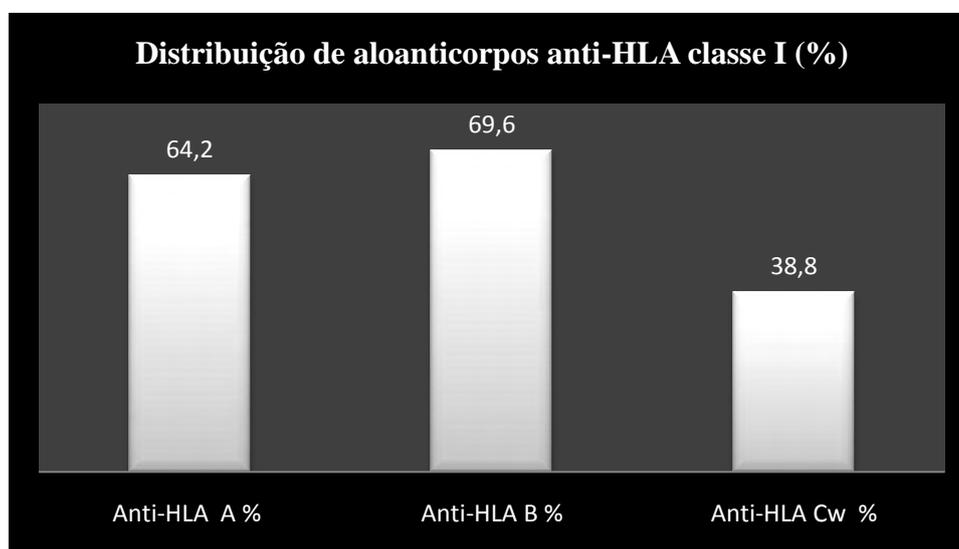


Gráfico 22: representa a média (%) dada pela tabela acima, quanto a distribuição dos aloanticorpos anti-HLA de Classe I.

Os resultados acima mostram que dos pacientes que possuem anticorpos anti-HLA de classe I, em média cerca de 70% apresentam aloanticorpos anti-HLA B, representando a grande maioria. Destes mesmos pacientes em média 64,2% dos pacientes possuíam anti-HLA dirigidos contra as moléculas oriundas do *Locus A* e que 38,8% dos pacientes positivos para a triagem de anticorpos anti-HLA de classe I, possui anti-HLA Cw.

#### 4.5.1.1. Distribuição e Freqüência de anti-HLA A em 2008, 2009 e 2010.

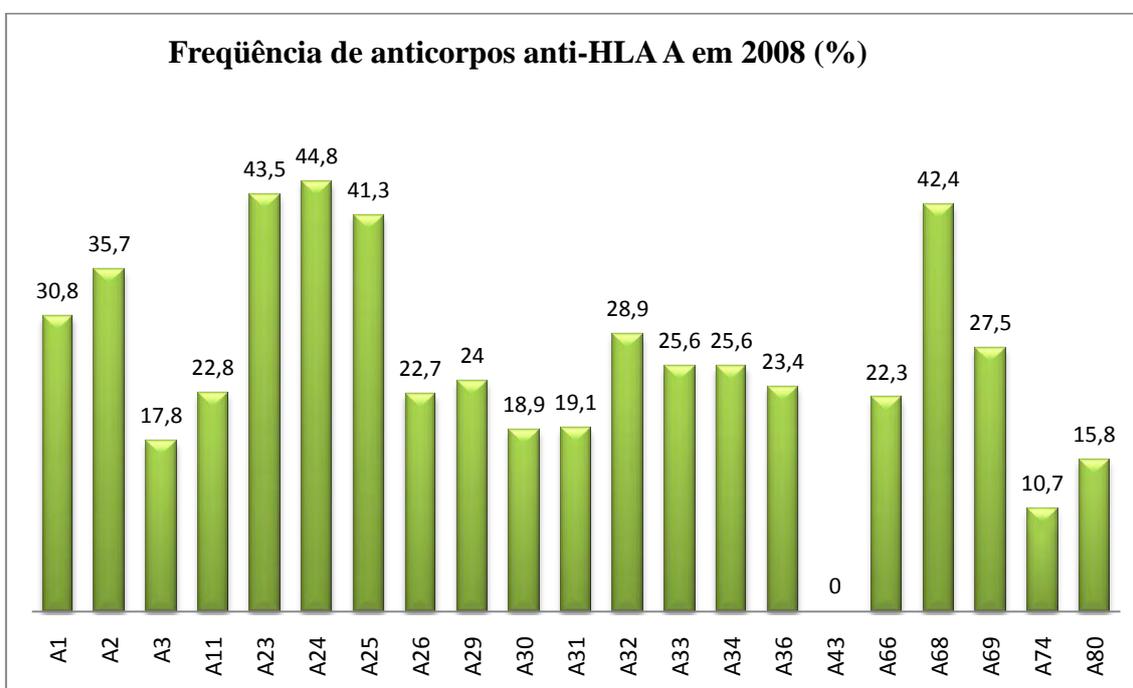


Gráfico 23: Freqüência de Anticorpos Anti-HLA A, na população de pacientes com triagem positiva para a classe I candidatos a transplante renal da regional de Ribeirão Preto em 2008.

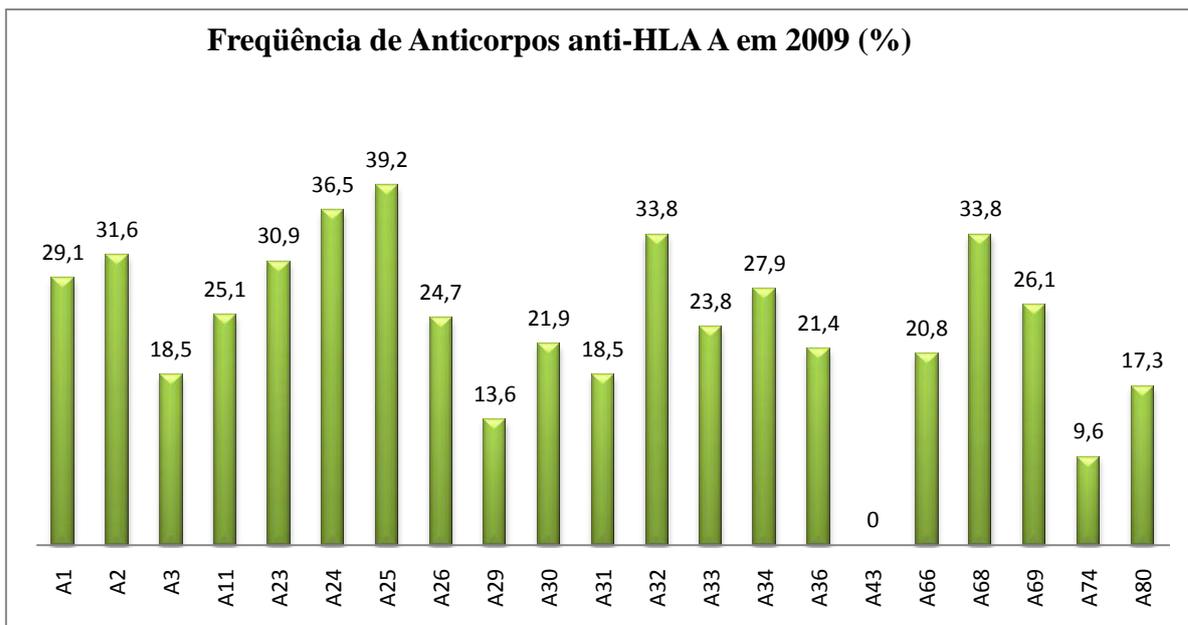


Gráfico 24: Freqüência de Anticorpos Anti-HLA A, na população de pacientes com triagem positiva para a classe I candidatos a transplante renal da regional de Ribeirão Preto em 2009.

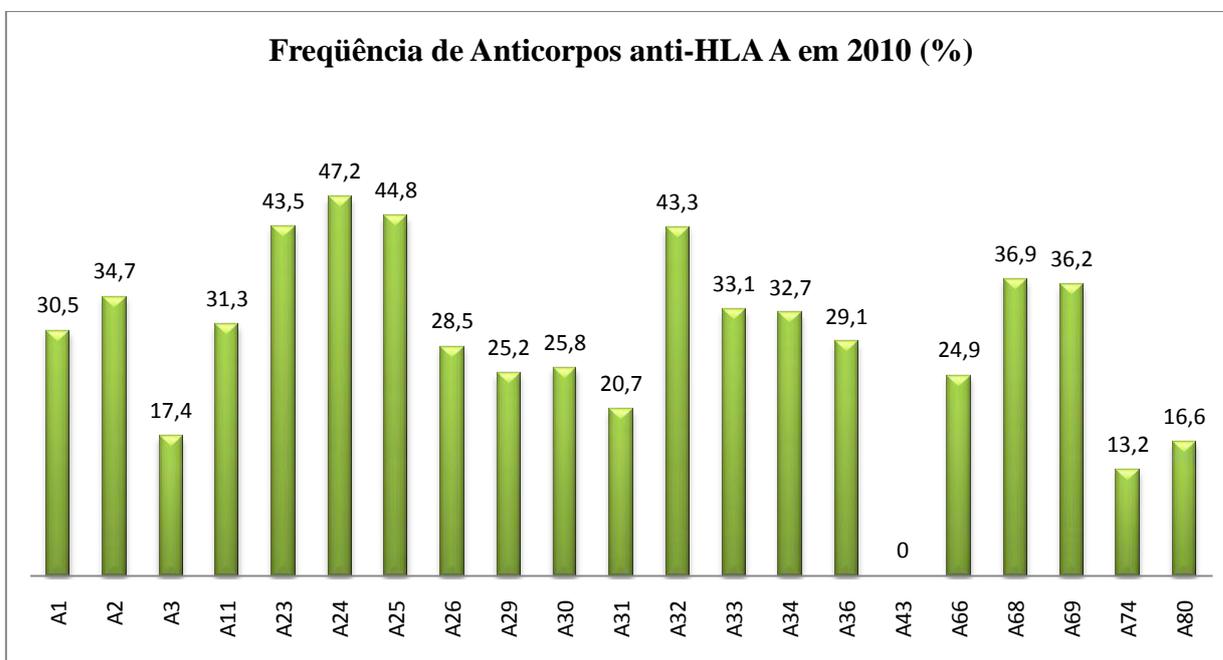


Gráfico 25: Freqüência de Anticorpos Anti-HLA A, na população de pacientes com triagem positiva para a classe I candidatos a transplante renal da regional de Ribeirão Preto em 2010.

Em relação à distribuição de anti-HLA A, os anticorpos que apresentaram maior frequência no ano de 2008 foram anti-A24 (44,8%), A23 (43,5%), A68 (42,4%) e A25 (41,3%). Os anti-HLA com menor frequência em 2008 foram anti-A74 (10,7%), A80 (15,8 %) e A3 (17,8%). Os anticorpos anti-HLA A mais frequentes no ano de 2009 foram anti-A25 (39,2%), A24 (36,5%), A32 (33,8%) e A68 (33,8%), sendo que neste ano os menos frequentes foram A74 (9,6%), A29 (13,6%) e A80 (17,3%). Já em 2010, os mais frequentes foram anti-A24 (47,2%), A25 (44,8%), A23 (43,5%) e A32 (43,3%) contra anti-A74(13,2%), A80 (16,6%) e A3(17,4%), representando esses últimos os menos frequentes respectivamente, no ano de 2010.

#### 4.5.1.2. Distribuição e Frequência de anti-HLA B em 2008, 2009 e 2010.

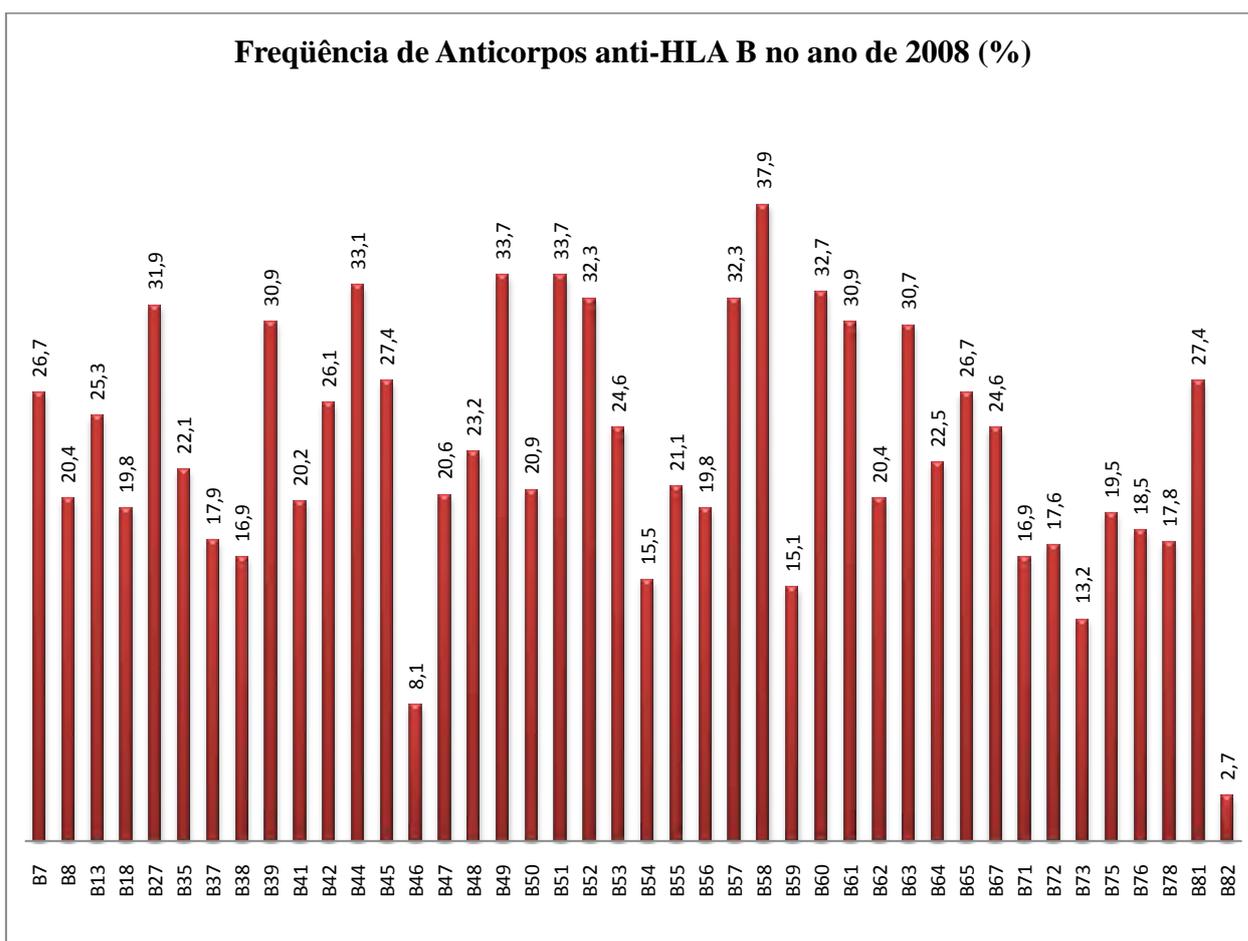


Gráfico 26: Distribuição e Frequência de anti-HLA B na população de candidatos a transplante renal na Regional de Ribeirão Preto em 2008.

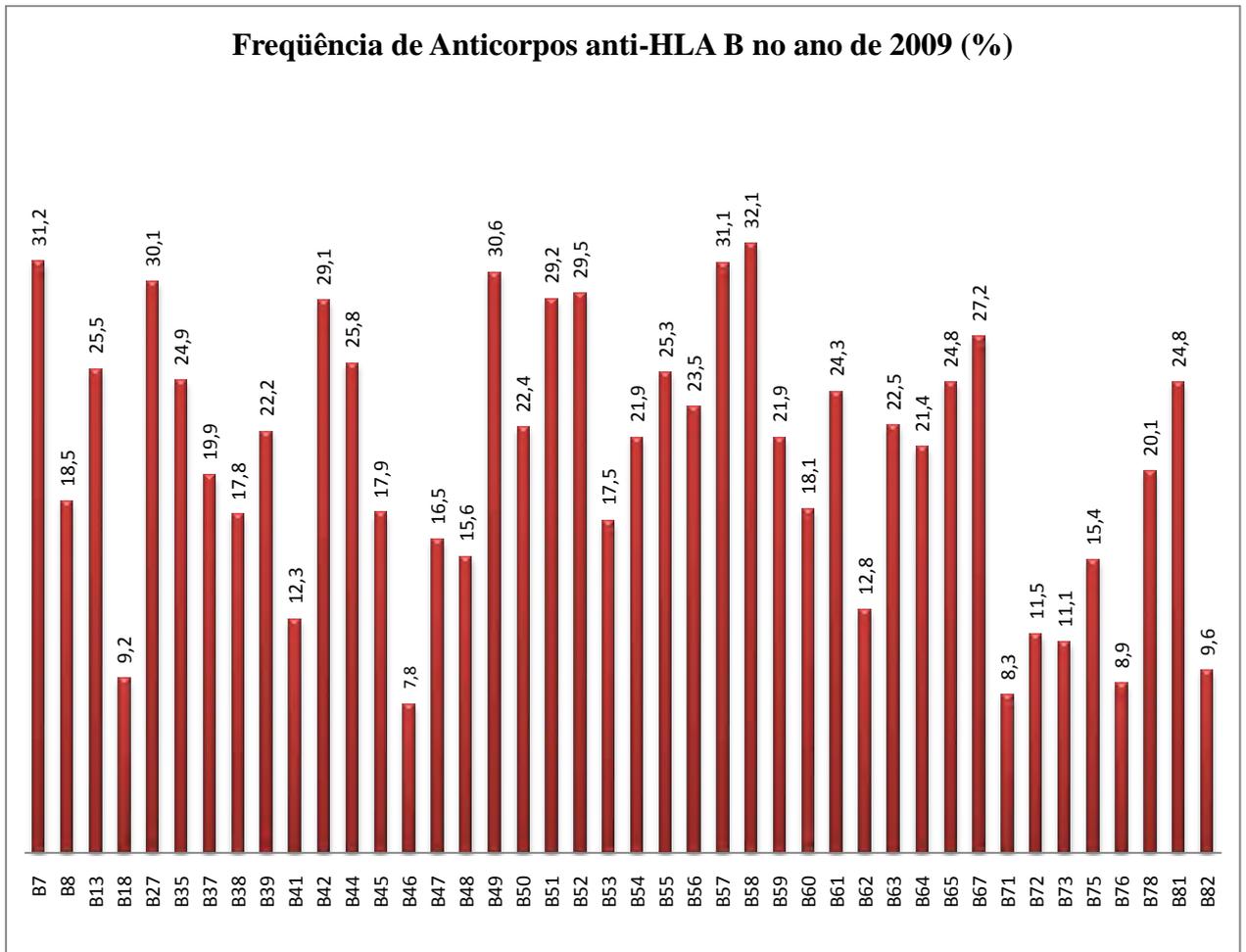


Gráfico 27: Distribuição e Freqüência de anti-HLA B na população de candidatos a transplante renal na Regional de Ribeirão Preto em 2009.

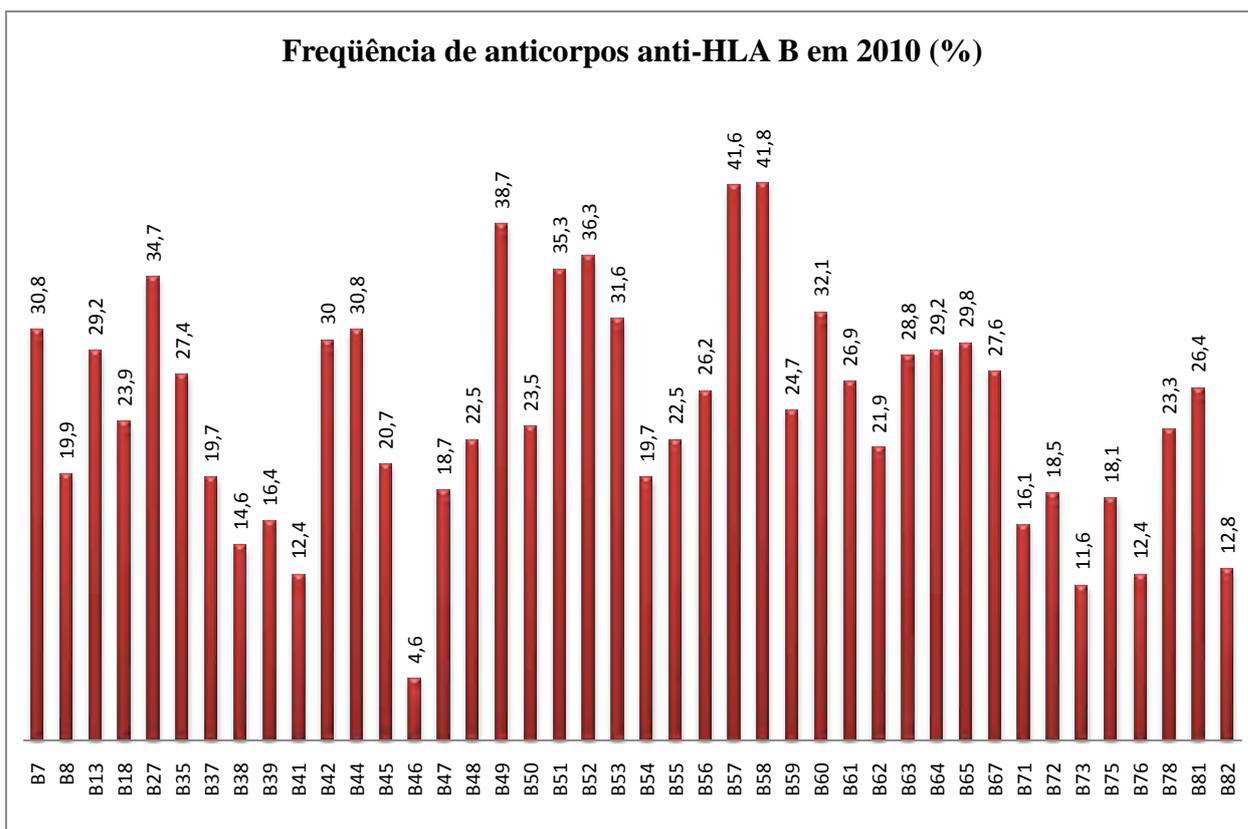


Gráfico 28: Distribuição e Freqüência de anti-HLA B na população de candidatos a transplante renal na Regional de Ribeirão Preto em 2010.

Quanto à freqüência de anticorpos anti-HLA B, foi obtido o seguinte resultado: no ano de 2008, os mais freqüentes foram anti-B58 (37,9%), B49 (33,7%), B51 (33,7%), B44 (33,1%), B60 (32,7%), B52 (32,3%) e B57 (32,3%); enquanto no ano de 2009 os anticorpos anti-B mais freqüentes foram anti-B58 (32,1%), B7 (31,2%), B57 (31,1%), B49(30,6%), B27(30,1%), B52 (29,5%) e B51(29,2%). No ano de 2010, os anti-B mais freqüentes foram os anticorpos dirigidos contra B58 (41,8%), B57 (41,6%), B49 (38,7%), B52 (36,3%), B51 (35,3%), B27 (34,7%) e B60 (32,1%). Os anticorpos menos freqüentes no ano de 2008 foram àqueles anticorpos dirigidos contra HLA-B82(2,7%), B46 (8,1%), B73 (13,2%), B59 (15,1%) e B54 (15,5%); já no ano de 2009 os anticorpos mais freqüentes foram os anti-B46 (7,8%), B71 (8,3%), B76 (8,9%), B18 (9,2%) e B82 (9,6%). Em 2010, os anticorpos anti-HLA B menos freqüentes foram anti-B46(4,6%), B73(11,6%), B76 (12,4%), B41(12,4%) e B82(12,8%).

#### 4.5.1.3. Distribuição e Frequência de anti-HLA Cw em 2008, 2009 e 2010.

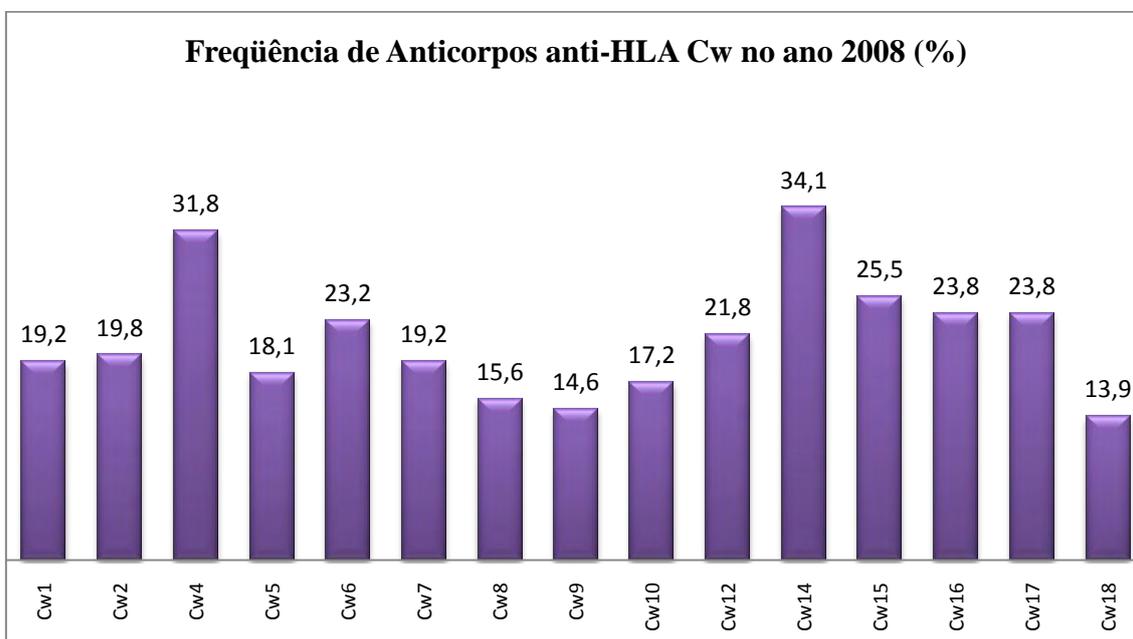


Gráfico 29: Frequência de Anticorpos Anti-HLA Cw, na população de pacientes com triagem positiva para a classe I candidatos a transplante renal da regional de Ribeirão Preto em 2008.

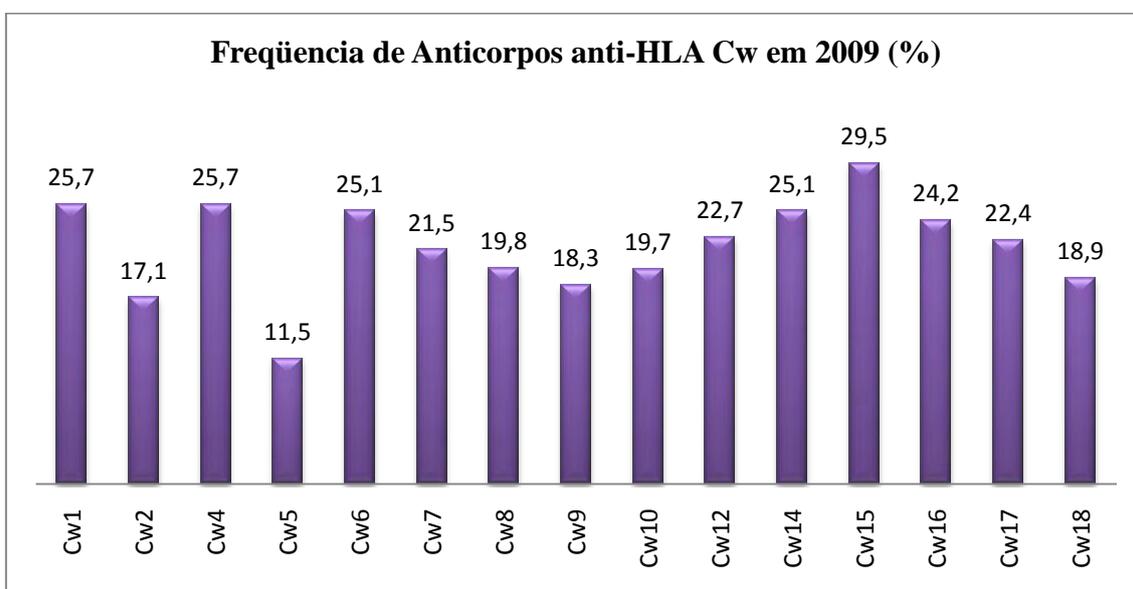


Gráfico 30: Frequência de Anticorpos Anti-HLA Cw, na população de pacientes com triagem positiva para a classe I candidatos a transplante renal da regional de Ribeirão Preto em 2009.