



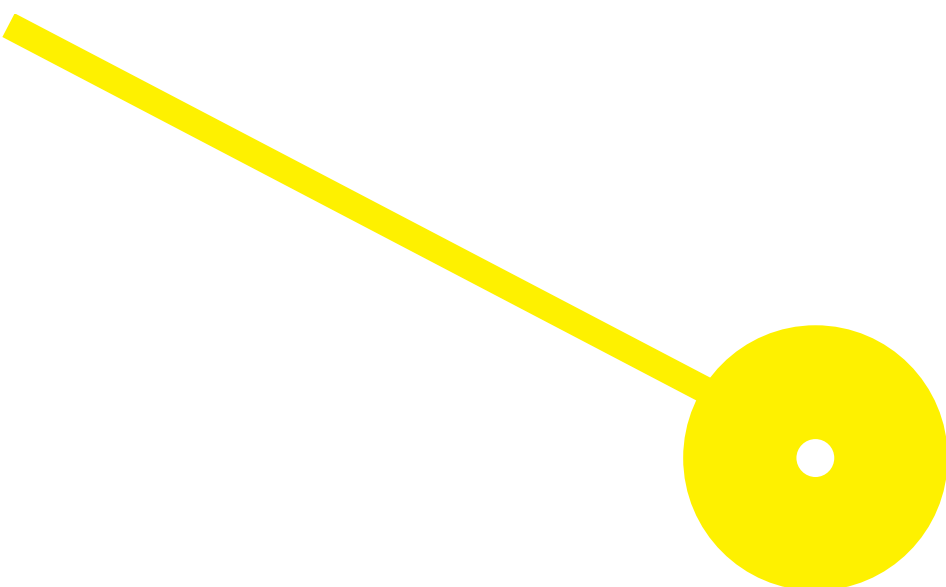
MESTRADO

ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA - IMUNOHEMOTERAPIA E TRANSPLANTAÇÃO

Uso da técnica de Crossmatch por Citometria de Fluxo comparando o método utilizado no laboratório com o protocolo Halifaster em dadores vivos

Suely Souza Moreira

11/2021



**USO DA TÉCNICA DE CROSSMATCH POR CITOMETRIA DE FLUXO COMPARANDO O
MÉTODO UTILIZADO NO LABORATÓRIO COM O PROTOCOLO HALIFASTER EM DADORES
VIVOS**

Autor

Suely Souza Moreira

Orientador(es)

Prof^o Dr | Jorge Manuel Condeço Ribeiro

Prof^o Adjunto convidado | ESS - PPorto

Dr^a Claudia Silva | Laboratório de Citometria de Fluxo | IPST - Porto

Dr^a Paula Xavier | Resp. Técnica do Laboratório de Citometria de Fluxo | IPST-Porto

Dissertação/Projeto/Relatório de Estágio apresentada(o) para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Designação Análises Clínicas e Saúde Pública** – Ramo/Área de Especialização em **Imunohemoterapia e Transplantação** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus por me conceder, sabedoria e iluminar meu caminho durante esta jornada.

À Coordenadora de Mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública, Maria Manuela Amorim Silva e Sousa, pela atenção e presteza, concedendo-me a realização do estágio.

Ao Prof. Dr. Jorge Manuel Condeço, que propiciou as condições para que a parte experimental deste estudo pudesse ser realizada e com a qual eu muito aprendi e pela orientação, dedicação e empenho que foram de extrema importância na realização deste estudo.

À Dra. Claudia Silva, agradeço pela amizade, orientação e por todo o apoio e estímulo para que este estudo se concretizasse.

À Dra. Paula Xavier, pelo apoio e pela importante contribuição em todas as etapas deste estudo.

À Dra. Sandra Tafulo, do Laboratório de HLA, pela disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos e convidar, o Canadense que desenvolveu o Protocolo *Halifaster*, o Dr. Robert Liwski, e nos presentear com o seu conhecimento sobre método.

Aos amigos do Laboratório de Citometria de Fluxo e Imunidade Celular, pela amizade que fomos construindo no decorrer desses meses e por compartilhar comigo momentos importantes na realização dos experimentos deste estudo.

“ De tudo ficaram três coisas, a certeza de que estamos começando, a certeza de que é preciso continuar, a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar. Fazemos da interrupção um caminho novo, da queda, um passo de dança, do medo, uma escada, do sonho, uma ponte, da procura um encontro. ”

Fernando Sabino

Resumo

O presente relatório tem por base o estágio decorrido num período de 4 meses, com intuito de descrever e evidenciar o trajecto de aprendizagem realizado no Laboratório de Citometria de Fluxo e Imunidade Celular, no Centro de Sangue e Transplantação do Porto, do Instituto Português do Sangue e Transplantação -IP.

O objectivo deste estudo foi desenvolver conhecimentos e competências nas tecnologias e metodologias empregadas na realização do *Crossmatch* por Citometria de Fluxo (FCXM), aprender as técnicas e sua aplicabilidade, efectuando análises estatísticas e controlo de qualidade na validação de métodos. Foi realizado uma comparação entre o método Convencional e o Halifaster, os *Crossmatches* foram realizados em células de sangue periférico de dadores vivos renais, com soros de receptores de órgãos. As células foram tratadas com pronase e Dnase no método *Halifaster* e uso das *beads* em ambos os protocolos. Nas análises dessas células obtivemos os seguintes resultados entre os dois métodos: o valor obtido para linfócitos T foi 1000 MFI (*Median Fluorescence Intensity* - Média da Intensidade de Fluorescência) com uma sensibilidade associada de 50%; especificidade 94,0%; valor preditivo positivo 20,0%; valor preditivo negativo 48,0%, o AUC (*Area Under the Curve* - Área sob a curva) da curva *ROC* (*Receiver Operating Characteristic* - Curva Característica de Operação do Receptor) foi de 0,70 ($p < 0,05$). Para linfócitos B, o valor ideal de corte, de 1000 MFI com uma sensibilidade associada de 90,0%; especificidade 86,0%; valor preditivo positivo de 84,0%; valor preditivo negativo 88,0% e a AUC da curva *ROC* foi de 0,80 ($p < 0,05$), no *Halifaster*; O valor obtido para linfócitos T foi 1000 MFI com uma sensibilidade associada de 50%; especificidade 60,0%; o valor preditivo positivo 68,0%; valor preditivo negativo 70,0%; o AUC da curva *ROC* foi de 0,70 ($p < 0,05$). Para linfócitos B, o valor ideal de corte, de 1000 MFI com uma sensibilidade associada de 82,0%; especificidade 87,0%; valor preditivo positivo de 70,0%; valor preditivo negativo 88,0% e a AUC da curva *ROC* foi de 0,80 ($p < 0,05$), no método Convencional.

Portanto, foi possível concluir que a realização do estágio, bem como as atividades desenvolvidas durante seu período, foram de suma importância, os objectivos de aprendizagem foram obtidos através das atividades realizadas no laboratório. Entretanto, vale aqui ressaltar que, foi o início de um estudo, o mesmo continuará para eventual validação com o objectivo de proporcionar melhoramentos continuado na avaliação de risco no pré-transplante renal e poder contribuir para melhor sobrevida do enxerto.

Palavras-chave: 1. Anticorpos anti-HLA; 2. FCXM; 3. Pré-transplante renal; 4. Órgãos sólidos; 5. Antígenos HLA

Abstract

The present report is based on the internship that took place over a period of 4 months, with the purpose of describing and evidencing the learning path taken at the Flow Cytometry and Cellular Immunity Laboratory, at the Blood and Transplantation Center of Porto, of the Portuguese Institute of Blood and Transplantation –IP.

The aim of this study was to develop knowledge and skills in the technologies and methodologies employed in performing Flow Cytometry Crossmatch (FCXM), learning the techniques and their applicability, performing statistical analysis and quality control in method validation. A comparison between the Conventional and Halifaster method was performed, Crossmatches were performed on peripheral blood cells from living renal donors, with sera from organ recipients. The cells were treated with pronase and Dnase in the Halifaster method and use of the beads in both protocols. In the analyses of these cells we obtained the following results between the two methods: the value obtained for T lymphocytes was 1000 MFI (Median Fluorescence Intensity) with an associated sensitivity of 50%; specificity 94.0%; positive predictive value 20.0%; negative predictive value 48.0%, the AUC (Area Under the Curve) of the ROC (Receiver Operating Characteristic) curve was 0.70 ($p < 0.05$). For B lymphocytes, the optimal cutoff value, of 1000 MFI with an associated sensitivity of 90.0%; specificity 86.0%; positive predictive value of 84.0%; negative predictive value 88.0% and the AUC of The ROC curve was 0.80 ($p < 0.05$), in Halifaster; The value obtained for T lymphocytes was 1000 MFI with an associated sensitivity of 50%; specificity 60.0%; the positive predictive value 68.0%; negative predictive value 70.0%; the AUC of the ROC curve was 0.70 ($p < 0.05$). For B lymphocytes, the optimal cut-off value, of 1000 MFI with an associated sensitivity of 82.0%; specificity 87.0%; positive predictive value 70.0%; negative predictive value 88.0% and the AUC of the ROC curve was 0.80 ($p < 0.05$), in the Conventional method.

Therefore, it was possible to conclude that the internship, as well as the activities developed during its period, were of utmost importance, the learning objectives were obtained through the activities performed in the laboratory. However, it is worth mentioning that this was the beginning of a study, which will continue for eventual validation with the objective of providing continued improvements in risk assessment in pre kidney transplantation and to contribute to better graft survival.

Key-words: 1. Anti-HLA antibodies; 2. FCXM; 3. Kidney pre-transplant; 4. Solid organs; 5. HLA antigens

ÍNDICE

1.	Introdução.....	1
2.	Revisão da Literatura.....	3
3.	Procedimentos da Citometria de Fluxo	5
3.1.	Controlo de qualidade interno e externo	5
3.2.	Citometria de Fluxo	6
3.2.1.	Citometria de fluxo na transplantação.....	8
3.3.	Diferenças entre os métodos Padrão e o <i>Halifaster</i>	12
3.4.	O Complexo Principal de Histocompatibilidade	14
3.5.	MHC classe I e II.....	16
3.6.	Anticorpos anti-HLA pré-transplante renal.....	18
3.7.	Uso da pronase e DNase no <i>crossmatch</i> por citometria de fluxo.....	19
4.	Estudo Prático realizado em Laboratório.....	23
4.1.	Objectivo Principal.....	23
4.2.	Métodos.....	24
4.3.	Estudo Imunológico	26
4.3.1.	Obtenção de células do dador.....	26
4.3.2.	Análise estatística	27
5.	Resultados.....	29
6.	Discussão.....	33
7.	Conclusões.....	35
8.	Referências Bibliográficas.....	37

Siglas e Abreviações

ABO: Sistema Sanguíneo

ADCC: Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity

AGH: Antiglobulina humana

AEQ: Avaliação Externa da Qualidade

AUC: Area Under the Curve (Área sob a curva)

CDC: Complement Dependent Cytotoxicity

CDC-AHG: Complement Dependent Cytotoxicity-Antihuman-globulin

CDC-NIH: Complement Dependent Cytotoxicity-National Institute of Health

CDC-XM: Complement-Dependent Cytotoxicity Crossmatch (Citotoxicidade Dependente de Complemento)

CF: Citometria de Fluxo

CQ: Controlo de Qualidade

CQI: Controlo de Qualidade Interno

DSA: Donor-Specific Antibody (Anticorpo específico do doador)

DTT: Ditionitrito

ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

EVA: Entidade de Verificação da Admissibilidade de Colheita para Transplante

FACS: Fluorescence Activated Cell Separator (Separador Celular Ativado por Fluorescência)

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

FSC: Forward Scatter (Dispersão para frente)

FITC: Fluorescein isothiocyanate

HE: Hematoxilina-eosina

HLA: Human Leukocyte Antigens (Antígenos Leucocitários Humanos)

IF: Imunofluorescência

IgG: Imunoglobulina G

IPST: Instituto Português do Sangue e Transplantação

IVIG: Imunoglobulina Intravenosa

MAC: primeiro antígeno humano denominado

MCFS: Desvio de Fluorescência do Canal Mediano

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

MHC: Major Histocompatibility Complex (Complexo Principal de Histocompatibilidade)

NEQAS: International Quality Expertise | External Quality Assessment (Avaliação de Qualidade Externa)

NK: Natural Killer (Células Assassinas Naturais)

PBS: Tampão de salina fosfato

PE: Ficoeritrina

PerCP: Proteína de Clorofila de Peridina

PMTs: Photomultiplier tubes

PNAEQ: Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade

PNDRC: Programa Nacional de Doação Renal Cruzada

PRA: Reatividade de anticorpos contra painel de antígenos

ROC: Receiver Operating Characteristic (Curva Característica de Operação do Receptor)

SAB: Single Antigen Beads (Esferas de Antígeno Único)

SSC: Side Scatter (Dispersão Lateral)

UNOS: United Network for Organ Sharing (Rede Unida para Compartilhamento de Órgãos)

VXM: Virtual Cross-Testing (Prova Cruzada Virtual – Virtual Crossmatch)

Índice de Figuras

Figura 1 Estrutura básica de um citômetro de fluxo.....	07
Figura 2 Diagrama de dispersão, frente e lateral.....	08
Figura 3 Reconhecimento de antígenos de enxerto, Via direta e Via indireta.....	16
Figura 4 Curva ROC.....	33
Figura 5 Curva ROC.....	33

Índice de Tabelas

Tabela 1 Comparação entre os protocolos Convencional e <i>Halifaster</i>	25
Tabela 2 Estudo para VN, VP, FP, FN nas Células T no Método Convencional.....	29
Tabela 3 Estudo para VN, VP, FP, FN nas Células B no Método Convencional.....	30
Tabela 4 Estudo para VN, VP, FP, FN nas Células T no Método <i>Halifaster</i>	30
Tabela 5 Estudo para VN, VP, FP, FN nas Células B no Método <i>Halifaster</i>	30
Tabela 6 Total de MHC classe I, classe II e classe I e II.....	31
Tabela 7 DSAs apresentadas no teste de FCXM.....	31
Tabela 8 Estatísticas da curva ROC.....	32

Índice de Gráficos

Gráfico 1 Controlo de qualidade interno efectuado nas 20 amostras no Convencional.....	27
Gráfico 2 Controlo de qualidade interno efectuado nas 20 amostras no Convencional.....	27
Gráfico 3 Controlo de qualidade interno efectuado nas 20 amostras no <i>Halifaster</i>	28
Gráfico 4 Controlo de qualidade interno efectuado nas 20 amostras no <i>Halifaster</i>	28

1. Introdução

O laboratório de Citometria de Fluxo e Imunidade Celular é o responsável pela preparação de amostras para utilizar em citometria, pela realização de técnicas de *Crossmatch* anti-linfocitário e de *Crossmatch* anti-endotélio. No que diz respeito a imunidade celular tem a seu cargo a preparação de amostras em ambiente estéril e manipular linhas celulares, bem como criopreservar células. Além de diferenciar e quantificar unidades formadoras de colônias de progenitores hematopoiéticos.

O estágio teve como objectivos gerais: desenvolver conhecimentos das técnicas realizadas no laboratório; entender os princípios das tecnologias e metodologias aplicadas; aprender noções básicas de citometria de fluxo; compreender a aplicação desta técnica no sector da transplantação; obter conhecimento das técnicas de crossmatch por citometria de fluxo, validação e controlo de qualidade e de efectuar comparação entre os métodos de FCXM entre o Convencional e o *Halifaster*.

A realização do controlo de qualidade (CQ) permite monitorizar o desempenho de todos os materiais, equipamentos, instrumentos e métodos analíticos bem como criar sinais de alerta para prevenir a emissão de resultados não-conformes e indicar a necessidade de ações corretivas. Permite também indicar a necessidade de melhorias em processos e em atividades ligadas aos operadores e consciencializar que o controlo da qualidade é um dever para com o cliente e tem a função de gerar confiança nos resultados obtidos.

O controlo de qualidade interno abrange todos os procedimentos assumidos por um laboratório para avaliação contínua do seu trabalho. A sua finalidade é assegurar a consistência dos resultados diários e a sua conformidade com critérios definidos, avaliando a precisão dos ensaios e dando indicação do momento para se promoverem ações corretivas quando surge uma não conformidade.

Segundo as melhores práticas da qualidade, serão calculados os valores do controlo de qualidade interno para validar os ensaios, os seus limites e critérios (regras) de aceitabilidade, com base na relação entre o desempenho analítico e o Erro Máximo Admissível.

Os critérios estabelecidos do Controlo de Qualidade Interno, visam otimizar o desempenho e aperfeiçoar a capacidade de identificação do erro.

As melhores práticas da qualidade determinam que o laboratório calcule os seus valores de controlo de qualidade interno, os seus limites de aceitabilidade e quais as regras a utilizar. Com este procedimento otimiza-se o desempenho do controlo de qualidade interno e reduz-se os problemas de falsos alarmes, de falsas rejeições.

A escolha adequada de procedimentos de CQ (Controlo de Qualidade) pode ser sustentada com a utilização de ferramentas de planeamento, tais como os gráficos de erro crítico. A utilização deste tipo de ferramentas facilita e torna mais rápida a escolha de procedimentos do CQ, nomeadamente, as análises estatísticas, cálculos da média e desvio padrão dos valores obtidos e estabelece uma mais valia na identificação do erro.

Transplante renal em Portugal

Em Portugal, alguns critérios são definidos para a realização da doação, segundo a Portaria n.º 802/2010, de 23 de Agosto, em que designa como par dador-receptor o candidato a receber um órgão e a pessoa (ou pessoas) que se propõe a dar-lhe um órgão. Já para a doação renal cruzada com dador vivo, se relaciona ao processo de alocação, pelo qual permite a transplantação de órgãos compatíveis através do intercâmbio de rins de dois ou mais pares dador-receptor. Adicionalmente à isso houve a criação da Entidade de Verificação da Admissibilidade da Colheita para Transplante (EVA) nos hospitais onde se realizam a colheita em dadores vivos, conforme o Despacho n.º 26 951/2007, de 26 de Novembro.

Entretanto foi criado também o programa para a realização de inscrição de pares dador-receptor de rim e respectiva alocação cruzada, nomeadamente: o Programa Nacional de Doação Renal Cruzada (PNDRC). Na selecção do par dador-receptor, em que a selecção de cada rim é efectuada, alguns critérios são definidos, para esse propósito a seguir, primeiramente, aos níveis: regional, nacional e por fim ao nível internacional. (1)

2. Revisão da Literatura

A validação é um estudo experimental e documentado que objectiva demonstrar que o procedimento analítico avaliado é adequado à finalidade proposta, de forma a assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos. (2) O seu objectivo consiste em demonstrar que o método é adequado para o seu propósito (3), devendo ser considerada quando se desenvolve ou efectua adaptações em metodologias já validadas, inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos. (4)

O desenvolvimento de um método, a adaptação ou implementação de método conhecido, envolve um processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório. Vários artigos e revisões têm sido publicados à respeito de validação de métodos analíticos, os quais descrevem: definições, procedimentos, parâmetros e estratégias de validação. Essas definições consistem na avaliação de um método por meio de ensaios experimentais, de modo a confirmar e fornecer evidências factuais de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos. (5)

Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos, ou seja, se o método candidato fornecer resultados que são equivalentes a um método existente. (6) Para tal existem diversos testes que são classificados por categorias, de acordo com sua finalidade, além de um conjunto de parâmetros de validação. Conhecer e perceber os parâmetros de validação, suas aplicações e corretas aplicações se mostra fundamental para gerar uma metodologia confiável e que atenda a finalidade pretendida.

A literatura dispõe de diversas publicações de trabalhos que relatam a necessidade de validação de métodos analíticos, pelos quais definem os critérios que devem ser seguidos durante seu desenvolvimento. Tais estudos abordam os critérios de validação de acordo com sua área específica, enfatizando as escolhas das ferramentas estatísticas para validação do método, a exactidão, a precisão, a sensibilidade e robustez e os limites de detecção e quantificação. (7) Os métodos estatísticos são essenciais para sintetizarem dados e fazerem julgamentos objectivos em diferenças entre conjuntos de dados. Entretanto, as definições dos parâmetros são consideradas nos processos de validação do método em questão, a estratégia

a ser adotada para a determinação desses parâmetros depende do propósito e da natureza do método (8), como por exemplo: se o método for destinado à análise qualitativa. Segundo a literatura, para um teste de identificação, é necessário demonstrar a capacidade de seleção entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. (9) Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos em amostras contendo o analito pretendido, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o analito.

Um dos principais requisitos em qualquer processo que envolva análises é a obtenção de dados de qualidade que alcancem os objetivos propostos. Nesse sentido, a validação de métodos analíticos, pela qual tem como propósito demonstrar, através de estudos laboratoriais, que o método é adequado aos requisitos exigidos pela aplicação analítica pretendida, isto é, que o processo de validação pretende demonstrar que o método é adequado para a quantificação do analito na matriz, a um certo nível de concentração, com exactidão e precisão satisfatórias, e confere uma garantia de qualidade operacional e de desempenho analítico. (10) Através deste processo procura-se demonstrar que o método analítico em causa é adequado para a análise da amostra a que vai ser sujeita. A validação adequada de um método fornece evidência documentada do desempenho do método, sendo de responsabilidade do laboratório clínico utilizar metodologias de controlo de qualidade que permitam: identificar, prevenir e corrigir possíveis falhas e assim garantir a exactidão dos seus resultados. Este processo é vital para dar credibilidade ao método definido. (11)

Segundo a literatura, confere ao laboratório clínico assegurar que os seus resultados reflitam de forma fidedigna e consistente. O progresso tecnológico na área laboratorial permitiu, além de outros fatores, aumentar a diversidade de amostras avaliadas pelos métodos laboratoriais, contribuindo assim para o aumento da importância do laboratório clínico na tomada de decisão e na seleção do tratamento (Vieira *et al.*, 2011). A melhoria contínua dos processos envolvidos deve representar o foco principal de qualquer laboratório.

A validação visa garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, conferindo-lhes: rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a tomada de decisões. (12) No entanto confere ao controlo de qualidade laboratorial, quer através da aplicação de

metodologias de CQI para avaliação da precisão analítica, quer através da participação em programas de AEQ para avaliação da exactidão analítica, a sua elevada importância na validação de métodos. Com isso julga-se que o método é considerado válido quando o mesmo é avaliado segundo uma série de parâmetros estabelecidos, como já mencionado anteriormente, e apresente o desempenho esperado. (13)

3. Procedimentos da Citometria de Fluxo

3.1. Controlo de qualidade interno e externo

As técnicas de análises dos testes realizadas no pré-transplante renal, assim como qualquer outro teste, estão sujeitas a resultados falso positivos e negativos, cada etapa do ensaio deve ser monitorizada, desde o tipo de amostras, condições dos soros e controlos utilizados, para obtermos um resultado fidedigno. O método qualitativo foi o aplicado no laboratório para a realização dos testes estatísticos, s ser de forte relevância para a realização dos estudos de sensibilidade e especificidade das análises. (14) Deste modo é de relevante importância a implementação do controlo de qualidade laboratorial, uma vez que permite avaliar constantemente o desempenho do teste de maneira a confirmar e garantir a qualidade dos resultados obtidos, eliminar possíveis causas de erro e implementar formas corretivas para eliminação dos mesmos. (15)

São considerados falsos-positivos quando há um indício que se confirma a presença de DSA, no entanto, na amostra clínica não há qualquer anticorpo anti-HLA (*Human Leukocyte Antigens*) de dador específico. Os falsos-positivos podem ocorrer quando o doente faz uso de imunossuppressores, em que são utilizadas imunoglobulinas de diferentes origens humanas e de animais.

Quando se refere ao falso-negativo, confere a presença de Anticorpo específico do doador (*Donor-Specific Antibody - DSA*), mas não é detectado. Isto pode ser justificado devido a uma centrifugação ineficiente dos controlos positivos e negativos, à medida que os agregados podem aumentar a coloração de fundo não específica, reduzindo a sensibilidade e resultando em falso-negativo, ou as lavagens ineficientes em doentes que fizeram uso de

medicamentos, exemplo das estatinas que diminuem significativamente a expressão celular de antígeno HLA.

O controlo de qualidade laboratorial é efectuado pelo cumprimento do Controlo de Qualidade Interno. A finalidade do CQI que, de acordo com Despacho n.º 10009/2019, se define como um conjunto de procedimentos postos em prática num laboratório com vista a permitir um controlo de qualidade dos resultados dos exames laboratoriais, pelo qual ao longo de todo o processo analítico e pela AEQ, corresponde à avaliação dos resultados por um organismo externo. (16)

A avaliação externa da qualidade é feita pela comparação do desempenho do laboratório com outros laboratórios que utilizam os mesmos métodos. Segue uma análise comparativa destes dados, pela qual se permite reforçar a garantia dos resultados obtidos pelo laboratório em termos de exatidão e precisão. (17) Contudo, o controlo de qualidade externo do laboratório de citometria de fluxo é assegurado por uma organização internacional independente de AEQ e pelo International Quality Expertise UK (NEQAS – *External Quality Assessment* – Avaliação de Qualidade Externa). (18) (11) Para o efeito, o laboratório recebe uma série de amostras projectadas para se assemelharem à amostra clinicamente significativa e avaliar as características específicas de ensaios analíticos. Nesta sequência é realizado o teste com essas amostras, empregando o próprio teste de rotina e procedimentos padrão do laboratório. Os laboratórios participantes do Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ) poderão enviar os seus resultados, por e-mail, fax ou correio, após determinação das amostras recebidas, avaliam-se o desvio relativamente ao valor alvo encontrado naquele ensaio pelo conjunto de participantes, aplicando as respetivas fórmulas de cálculo, apreciação e comentário. Os relatórios de avaliação são enviados aos participantes após a análise estatística e avaliação do desempenho geral do ensaio. Cada entidade participante recebe um relatório com os resultados obtidos, para implementação de ações preventivas e corretivas, se aplicável. Após isso são enviados um certificado de participação a todos os laboratórios de acordo com o definido pelo PNAEQ, o objetivo do programa é avaliar o desempenho dos procedimentos para o diagnóstico laboratorial em laboratórios, de forma a garantir a qualidade e fiabilidade dos seus resultados.

3.2. Citometria de Fluxo

A análise de citometria de fluxo pode ser efectivamente aplicada a uma infinidade de populações de células de uma variedade de tecidos. (19) É uma técnica que tem por princípio a utilização de um fluxo laminar de partículas suspensas, em um meio líquido em fluxo e

marcadas com fluorocromos ou anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos. O processo inicia-se com a selecção de anticorpos, marcados com fluorocromos e específicos para o antígeno celular, que permite caracterizar a população das células de interesse. (20) Como o fluxo das células é laminar e o diâmetro do tubo se afunila, estas são forçadas a passar em fila única pela luz emitida pelo laser, gerando sinais (dispersão e/ou emissão de luz por fluorocromos) que são captados por detectores. Gera-se, então, uma transformação dos sinais luminosos em impulsos eléctricos que se ampliam e são convertidos em sinais digitais para posterior análise. (21)

É utilizado um equipamento que permite analisar (análise multiparamétrica) diversos parâmetros celulares: o CITÓMETRO DE FLUXO. O *Forward Scatter* (FSC) correlaciona-se com o tamanho celular e o *Side Scatter* (SSC) depende da complexidade citoplasmática da célula. (22)

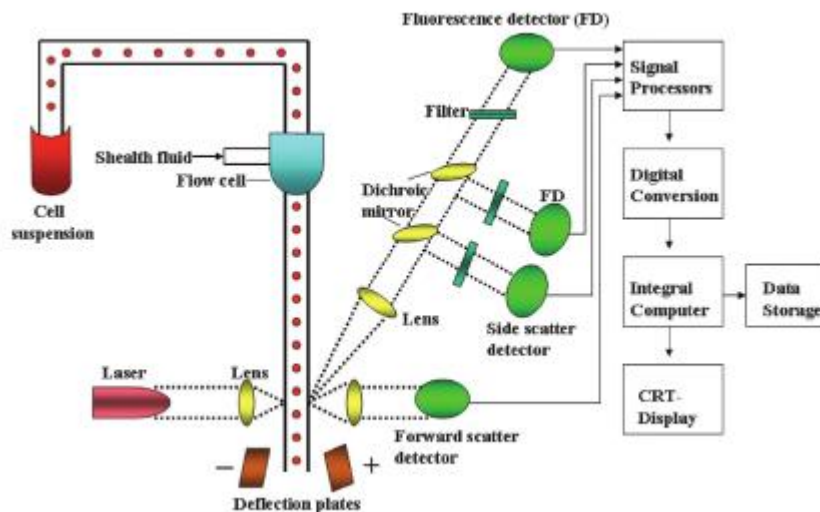


Figura 1 Estrutura básica de um Citômetro de Fluxo mostrando o sistema de transporte de fluido, o sistema óptico, o sistema eletrônico e o classificador de células. Adaptado de (22).

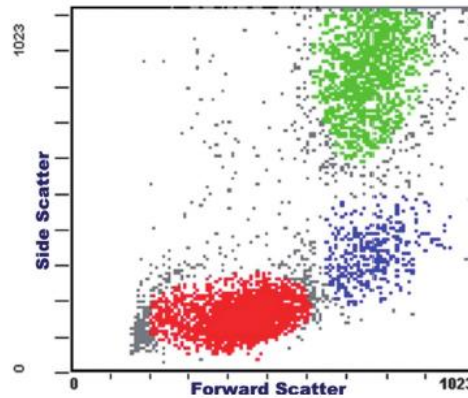


Figura 2. Diagrama de dispersão com dispersão lateral traçada contra a dispersão para frente, mostrando aglomerados de linfócitos (vermelho), monócitos (azul) e granulócitos (verde) em uma amostra de sangue periférico. Adaptado de (22).

A versão mais moderna da citometria de fluxo: separador celular ativado por fluorescência (*Fluorescence Activated Cell Separator – FACS*), fornece informações rápidas e precisas com a identificação de inúmeras características intrínsecas ou extrínsecas contidas nas células e reconhece, com precisão, o tamanho e a granulosidade, por meio da leitura da intensidade da fluorescência refletida em células previamente marcadas com anticorpos monoclonais fluorescentes. (23)

A sua principal vantagem é que é uma técnica que permite analisar diversas células e em diversos parâmetros ao mesmo tempo, consegue analisar antígenos marcados em: superfície, citoplasma e núcleo, ser automatizado e de disponibilizar os resultados no computador. (24) Entretanto têm como desvantagens: ter um equipamento de alto custo, ter uma baixa vazão celular, causar a morte de muitas células da amostra e também pela necessidade de células em suspensão que, em alguns materiais, necessitam de uma preparação mais morosa. (25)

3.2.1. Citometria de fluxo na transplantação

A imunofenotipagem de linfócitos é uma aplicação comum da citometria de fluxo em imunohematologia, e tem sido amplamente utilizada para estudar os efeitos de doenças e modificações do sistema imune nas populações de linfócitos. (26)

No âmbito dos transplantes, a citometria de fluxo é reconhecida como uma técnica bem estabelecida em pesquisas, no reconhecimento de reação cruzada em pré-transplante e no monitoramento de reconstituição imunológica após o transplante de órgãos sólidos. (27) O método detalha os elementos do sistema imunitário, a sua função e interação com base em análises multiparamétricas necessárias e principalmente no cenário pré-transplante. (28) O impacto da citometria de fluxo se apresenta também no controlo de reações imunes, no acompanhamento de infecções e rejeição do enxerto, assim como na aferição da imunossupressão no contexto dos transplantes de órgãos sólidos. No entanto, a Citometria de Fluxo é uma técnica de suma importância, pela qual oferece informações valiosas sobre o estado imunológico de um destinatário ao transplante, actua no acompanhamento da função imune após o transplante de órgão e na avaliação da saúde do enxerto. (29)

A sensibilização contra antígenos HLA em pacientes submetidos a transplantes, seja através de: exposição prévia a transplantes, hemotransfusões, gestações ou abortamentos (30), são considerados relevantes quando há presença de anticorpos anti-HLA no período pré-transplante, uma vez que estes anticorpos são considerados fatores de risco conhecidos para rejeição e para falência do enxerto. (31) Com o surgimento das tecnologias na identificação de anticorpos específicos anti-Antígenos Leucocitários Humanos (HLA), as avaliações clínicas e imunológicas, antes e depois dos transplantes de órgãos e tecidos têm sido mais precisas, contribuindo para o sucesso dos transplantes, elevando a taxa de sobrevivência e, conseqüentemente, a melhoria da qualidade de vida para os pacientes. (32)

Nas décadas de 1970 e 1980, foram introduzidos os termos de Classe I, a fim de descreverem os antígenos HLA-A, HLA-B e HLA-C e Classe II para descreverem os antígenos HLA-DR, DQ e DP, e já se sabia que a região HLA estava localizada no braço curto do número de cromossomos 6 (33), na região do Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* - MHC). As bases fundamentais dos transplantes estão intimamente relacionadas ao MHC. Evidências crescentes sugerem um efeito prejudicial de específico do dador anticorpos dirigidos contra o leucócito humano loci do antígeno (HLA) -A, -B e -DR nos resultados do aloenxerto renal. (34)

Estudos têm sido conduzidos para a avaliação de parâmetros imunológicos que possam influenciar na interação imunológica do enxerto. Uma das linhas de investigação é a avaliação da influência das moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade no transplante renal. (35) O estudo do receptor candidato a transplante de órgão sólido foi amplamente beneficiado pela definição do padrão imunológico, contribuindo para a avaliação de risco de rejeição antes e após o transplante. (36)

Um estudo prospectivo avaliou o impacto da presença de anticorpos anti-HLA pré-transplante, sobre a sobrevida do enxerto no período de 3 anos, em que foram monitorados 347 receptores de transplante renal. Após um período de 26 meses de acompanhamento, 62 pacientes desenvolveram anticorpos específicos do dador, dos quais 48 tinham um anticorpo HLA-DQ, 33 pacientes apresentaram um anticorpo HLA-A, -B ou -DR.; apenas 14 pacientes desenvolveram um anticorpo HLA-A, -B ou -DR específico do doador sem a presença de um anticorpo HLA-DQ. A rejeição aguda ocorreu em 21% dos pacientes apenas com HLA-DQ, os pacientes que apresentaram proteinúria foram significativamente maiores naqueles que desenvolveram apenas HLA-DQ do que naqueles sem anticorpos. A sobrevida do enxerto de 3 anos foi significativamente pior quando os anticorpos HLA-DQ foram combinados com anticorpos não-DQ (52%) em comparação com HLA-DQ sozinhos, anticorpos não-DQ sozinhos ou sem anticorpos (92-94%). O monitoramento prospectivo descobriu que os anticorpos HLA-DQ específicos do dador eram o tipo mais comum detectado e que esses anticorpos podem contribuir para resultados inferiores do enxerto. A vigilância contínua se faz necessária para identificar, a longo prazo, anticorpos HLA-DQ específicos do dador, em pacientes submetidos à transplante renal. (37)

Em outro estudo que avaliou anticorpos anti-HLA pelas técnicas de CDC (*Complement Dependent Cytotoxicity*), microesferas e *Crossmatch* por citometria de fluxo em 134 pacientes com transplante renal incompatível com HLA de 2003 a 2018, foram analisados para estimar a sobrevida do paciente e do enxerto. Os resultados foram comparados com os grupos definidos, relacionando o tipo e o período de episódios de rejeição. Os autores demonstraram que a sobrevida geral do paciente foi de 95%, 90% e 81%, e a sobrevivência do enxerto foi de 95%, 85% e 70% em 1, 5 e 10 anos, respectivamente. A rejeição mediada por anticorpos foi o tipo de rejeição mais frequente, com declínio significativo na sobrevida do enxerto por 10 anos.

A rejeição que ocorreu ou continuou a ocorrer após as primeiras 2 semanas de transplante foi a causa da redução na sobrevida do enxerto, enquanto bons resultados foram observados naqueles com um único episódio de rejeição precoce. (38)

Neste estudo, os autores incluíram 121 doadores vivos e 148 doadores cadáveres, os casos que não foram previamente sensibilizados (PRA e DSA negativos) e foram submetidos a transplante renal nos períodos de agosto 2012 à janeiro de 2018. A biópsia renal foi realizada nos casos encontrados com > 2000 (MFI) de novo DSA contra HLA-A, HLA-B, HLA-DR. Os doentes, foram tratados com plasmaférese e imunoglobulina intravenosa (IVIG) e rituximabe, administrados nos casos com rejeição mediada por anticorpos, detetada por biópsia renal. Além disso, a presença de não-DSA de novo também foi avaliada nos casos. A presença de novo foi encontrada, através da identificação das especificidades do anticorpo anti-HLA usando o antígeno único Luminex esferas no soro receptor, DSAs de novo (anticorpos contra HLA-A, HLA-B, HLA-DR e HLA-DQ) foram monitoradas em 23 casos. A positividade para HLA-DQ foi detetada em 10 casos. Os valores de MFI eram > 4000 e $2000-4000$ em 8 e 2 casos, respectivamente, não foi encontrado DSA de novo, em 19 casos. A biópsia foi realizada em 8 casos devido ao desenvolvimento de $MFI > 2000$ de novo DSA contra HLA-A, HLA-B e HLA-DR e os achados de rejeição humoral aguda foram encontrados em 2 casos e a rejeição humoral aguda foi diagnosticada em 1 caso que desenvolvido de novo não DSA. O monitoramento de DSA de rotina em todos os casos, podem contribuir para os debates sobre a necessidade de monitoramento de DSA em pacientes com baixo risco imunológico. (39)

Estudos realizados nos Estados Unidos, através do Registro Científico de Destinatários do Transplante (*United Network for Organ Sharing – UNOS*), à medida que surgiram dados associando a correspondência de HLA com diminuição do acesso ao transplante para pacientes afro-americanos, os autores relataram que, nos últimos anos, uma das principais causas de perda do enxerto direcionava a rejeição crônica mediada por anticorpos, atribuída ao desenvolvimento de anticorpos de novo, contra incompatibilidade HLA do dador expresso no enxerto. Os estudos mostraram que anticorpos são mais frequentemente expressos contra moléculas HLA-DQ dadoras, impactando na sobrevida do enxerto e actuando na geração de doadores específicos de HLA de novo. Conclui-se que os anticorpos HLA também contribuíam para o aumento da sensibilização, medido pelo painel

reativo de anticorpos. Consequentemente era comum o comprometimento do acesso ao transplante para pacientes que retornam à lista de espera e que precisava de um segundo transplante. Entretanto foram observados que atribuía ao HLA-DSAs, efeito prejudicial sobre resultado do transplante de órgão sólido e que a grande maioria dos anticorpos de novo tinha como alvo específico as Moléculas HLA-DQ.24 do dador. Nos estudos foram utilizados os ensaios de esfera de antígeno único nos testes de rotina. (40)

3.3. Diferenças entre os métodos Padrão e o *Halifaster*

Consideravelmente os protocolos de ensaio de FCXM, que detetam a presença de anticorpos HLA específicos do dador em soro do paciente, vêm se tornando a base dos testes de compatibilidade HLA, em que o procedimento de *Crossmatch* por citometria de fluxo contribui para a agilidade dos ensaios (41), além da sua sensibilidade e especificidade, que são características desse método em relação à identificação de anticorpos específicos do dador (HLA-A / B / C/ DR/ DQ), sendo eles de importância clínica no transplante renal. (42)

Dessa maneira, para os estudos realizados no laboratório de citometria de fluxo para a implementação de um novo protocolo, se fez necessária a sua validação, em que o resultado final foi obtido pela comparação entre as respostas de duas amostras, o sangue do dador e o soro do receptor. Desse modo, para cada dador foram testados soros bem caracterizados, com crossmatches virtuais positivos. Neste estudo foram realizados um total de 53 FCXM em paralelo e utilizados soros negativos de homens não sensibilizados e soros positivos de pacientes hipersensibilizados, para ambos os protocolos.

Sobretudo, a aquisição foi realizada em citômetro de fluxo e foram empregados os pontos de corte já utilizados no laboratório para o FCXM convencional, que é 50 de desvio de fluorescência do canal mediano MCFS para linfócitos T e 80 MCFS para linfócitos B. Os resultados foram expressos em MCFS. Paralelamente a isso, a análise de dados foi realizada e incluiu a correlação de *Pearson* de desvios de canais medianos obtidos para cada prova cruzada com os protocolos padrão e *Halifaster*, bem como a comparação do protocolo com relação à sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo

negativo em relação ao *Crossmatch*. Para os cálculos de sensibilidade e especificidade de FCXM foram determinados usando análise da curva ROC.

Nesse contexto, se faz necessário ressaltar que foram obtidos também soros de doentes tratados com *Rituximab*, e foi utilizada a pronase no tratamento das células dos dadores vivos renais e dos dadores cadáveres.

As diferenças entre os dois métodos foram: o uso da pronase, Dnase, no Protocolo *Halifaster*, no processo de tratamento das células, e o Ficool no Protocolo Convencional. Vale ressaltar que o uso de medicamentos para o tratamento de dessensibilização, no receptor de órgão, pode ocorrer o aumento de expressão de fundo, promovido por agregados, principalmente nos linfócitos B, relativamente ao uso da pronase, em que há evidências de ocorrer consumo e eventual diminuição das mesmas e poder ocasionar interferência nos resultados, por se tratar de amostras de sangue periférico há prevalência de interferentes, que poderá ser a causa de possíveis erros referentes ao número de linfócitos B, apresentados no método *Halifaster*.

Estudos sugerem que em termos de tempo de tratamento das células, o *Halifaster* possui alguma vantagem, comparado ao método Padrão, porém, quando são utilizadas células de sangue periférico, do qual o doente passou por tratamento de dessensibilização, o método Convencional seria o mais vantajoso por não utilizar a pronase e Dnase no tratamento das células, conferindo a esse método o valor verdadeiro de células B.

Ainda que a técnica de *Crossmatch* por citometria de fluxo seja uma técnica bem estabelecida em transplantes, a mesma deve ser validada para ser clinicamente aplicável como um padrão nos parâmetros de controle de qualidade dos enxertos.

3.4. O Complexo Principal de Histocompatibilidade

O MHC é um complexo de genes altamente polimórfos localizados no braço curto do cromossoma 6, região em que são codificados esses genes. Essa nomenclatura diz respeito à importância que os produtos dos seus genes têm na histocompatibilidade (43) e está presente em todos os mamíferos, em humanos, e é chamado HLA por serem descritos primeiramente em leucócitos. (44)

O Complexo Principal de Histocompatibilidade foi descoberto como resultado de estudos nos anos de 1937, e conduzidos inicialmente por Peter Gorer e mais tarde por George Snell e colaboradores. Os autores aplicaram as técnicas de genética clássica para a análise da rejeição de tumores e de tecidos normais transplantados, os estudos foram feitos sobre uma região cromossômica contendo genes que influenciavam o resultado da rejeição de transplantes entre ratinhos de estirpes diferentes. (45)

O seu envolvimento na compatibilidade de tecidos levou a que este grupo de genes fosse designado como locus de histocompatibilidade. Os loci dominantes foram designados complexo maior de histocompatibilidade ou MHC, enquanto os outros foram designados complexo menor de histocompatibilidade. (46)

Na espécie humana, Jean Dausset detetou anticorpos leucoaglutinantes capazes de aglutinar leucócitos de outros indivíduos no soro de pacientes politransfundidos e em 20% a 30% de mulheres múltiplas (47). Dausset descobriu assim o primeiro antígeno humano denominado *MAC*, agora HLA-A*02, um dos produtos dos genes do sistema HLA correspondente humano do MHC. Mais tarde, Jon Van Rood e Van Leeuwen publicaram a descoberta de outro gene do sistema HLA de nome (*FOUR*) agora HLA-B (*Bain et al*), por volta da década de 70, devido aos resultados dos estudos realizados anteriormente (Yunis e Amos, Tosi, *et al.*) conduziram a descoberta de novos genes, nomeadamente HLA-DR. (48)

Para Brown (*et al.*), a herança dos genes HLA é haplotípica, cada indivíduo herda e transmite, em conjunto, alelos em bloco por cromossomo. Considerando que o indivíduo herda dois haplótipos (um de origem materna, outro de origem paterna), cada indivíduo pode ter até

dois alelos diferentes para cada especificidade HLA. No entanto, actualmente já se conhece em detalhe a estrutura e função dos genes classe I e classe II do sistema HLA. Apesar de actualmente desconhecermos ainda o mecanismo exacto que associa determinados alelos e haplotipos, ou seja, conjunto de alelos de diferentes loci transmitidos em bloco de geração em geração do sistema HLA a um elevado risco de desenvolver determinadas doenças autoimunes. Desde 1967, segundo Amiel, esta associação já era conhecida.

As moléculas HLA codificadas são glicoproteínas de superfície celular, as de maior importância na histocompatibilidade são as moléculas de HLA de classe I, expressas em todas as células nucleadas, e as de classe II, encontradas somente em células dendríticas, nos linfócitos B, e nos macrófagos, os quais, estão divididos em três grupos: sendo o primeiro grupo chamado MHC classe I, segundo grupo MHC classe II e o terceiro grupo MHC classe III. (49)

A função fisiológica das moléculas de MHC é a apresentação de peptídeos às células T, fazendo o controle das respostas imunológicas à antígenos proteicos. Além da importância nos transplantes, o sistema HLA é amplamente avaliado em estudos de associações de alguns genes com determinadas doenças e sua relevância na população. (50)

Devido às suas múltiplas funções, nomeadamente ao nível da histocompatibilidade e regulação imunitária, a investigação em torno do sistema HLA despertou o interesse de várias equipas de investigação possibilitando a descoberta de largas centenas de alelos nos diferentes genes. (51)

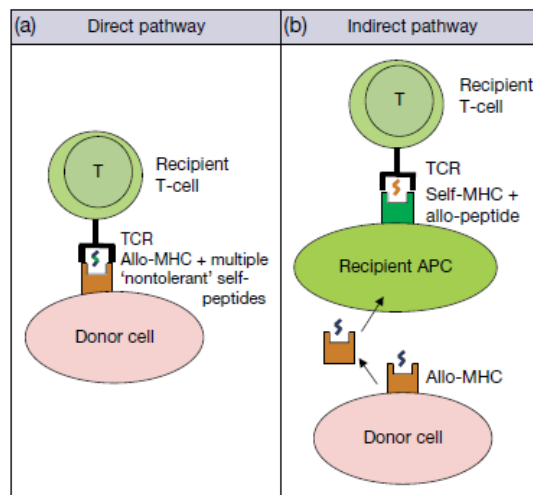


Figura 3 Reconhecimento de antígenos de enxerto por células T alorreativas. (a) Via direta. Receptores de células T (TCR). Múltiplos laços desta natureza entre os APC e células T podem dar origem a uma interação forte o suficiente para permitir a ativação de células T. (b) Via indireta. Adaptado de (1)

3.5. MHC classe I e II

Segundo Malissen (*et al.*), o sistema HLA, apresenta cerca de 4 Mb (megabases) de extensão, e está subdividido em três regiões: classe I, classe II e classe III, de acordo com a estrutura e função dos seus genes. No que diz respeito aos genes classe I, localizados na porção mais telomérica do sistema HLA, e constituídos por vários exons, intercalados por introns, que codificam para a formação da cadeia polipeptídica alfa de receptores glicoproteicos da membrana das células nucleadas, constituídos por uma região extracelular de ligação a antígenos, uma região transmembranar e um segmento citoplasmático. Os polimorfismos nos genes classe I localizam-se essencialmente nos exons 2 e 3, os quais codificam para as estruturas moleculares alfa 1 e alfa 2 do receptor membranar onde se localiza o sítio de ligação aos antígenos. Para Doherty & Zinkernagel, estes receptores membranares interagem com linfócitos T CD8 positivos que detectam alterações de expressão nas células, alterações estas que podem ocorrer devido a infecções ou ao desenvolvimento de células tumorais. Desta forma, os linfócitos T (CD8+) reconhecem as células que deverão atacar para combater o avanço de uma determinada infecção ou de um tumor. (52)

Para *Das et al.*, os genes classe II localizam-se na região mais centromérica do sistema HLA e codificam para as estruturas alfa e beta de receptores membranares que se expressam

nas células que apresentam antígenos, nomeadamente linfócitos B e células dendríticas. O *exon 2*, que codifica para a estrutura extracelular do receptor membranar, responsável pela ligação aos antígenos, concentra a maior parte dos polimorfismos nestes genes. Estes receptores membranares, constituídos por uma porção extracelular, uma região transmembranar e um segmento citoplasmático, reconhecem a presença de elementos estranhos e estimulam os linfócitos T CD4 positivos, reforçando a resposta imunitária contra agentes infecciosos. (53)

Actualmente, diversos tipos de complicações podem encurtar a sobrevivência de órgãos sólidos enxertados, entre essas, situam-se, as rejeições celulares e as mediadas por anticorpos devido à presença de anticorpos anti-HLA dador específico no soro do receptor. Essa sensibilização pode ocorrer nas gestações, transfusões de sangue e transplante prévio. Para que um transplante seja bem sucedido é relevante se ter conhecimento do sistema imunológico, os antígenos presentes nos tecidos geneticamente diferentes e os genes que codificam esses antígenos. (54)

Os genes do MHC classe I e MHC de classe II, são os mais relevantes para os transplantes de órgãos sólidos, melhor definidos e conhecidos. Codificam as proteínas HLA-A, HLA-B e HLA-C o MHC de classe I, os quais estão presentes na membrana de todas as células nucleadas do organismo. Sua função é apresentar peptídeos do metabolismo proteico das células aos linfócitos T citotóxicos. Já o MHC de classe II, que apresenta três principais genes que codificam as proteínas: HLA-DRB1, HLA-DQB1 e HLA-DPB1, estão presentes em algumas células apresentadoras de antígenos, nomeadamente os linfócitos B, macrófagos, Monócitos e células Dendríticas. (55)

Diante disso, a incidência de rejeição pode ser diminuída com a verificação da compatibilidade entre dador e receptor quanto ao sistema ABO e ao sistema HLA. Vale destacar que provas-cruzadas positivas contra linfócitos T sugerem a presença de anti-HLA classe I e em linfócitos B, que confere a presença da classe I e II, sucessivamente, devido à expressão, ao mesmo tempo em sua superfície moléculas HLA classe I e classe II, sendo que as moléculas HLA classe I estão presentes em alta densidade nesse tipo celular.

Os anticorpos detectados por CDC são, em geral, direcionados contra antígenos HLA, mas ocasionalmente podem ser direcionados contra antígenos não-HLA. A utilização desses métodos é de suma importância na avaliação imunológica pré-transplante, com finalidade de prevenção à rejeição mediada por anticorpos, antes da realização de transplantes de órgão sólidos. (56)

3.6. Anticorpos anti-HLA pré-transplante renal

Pacientes podem ser sensibilizados contra antígenos HLA através de exposição prévia, e a presença de anticorpos anti-HLA no período pré-transplante é um fator de risco conhecido e independente para rejeição e para falência do enxerto. (57)

O estudo do receptor candidato a transplante de órgão sólido foi amplamente beneficiado pela descrição do padrão imunológico de pacientes, permitindo uma avaliação de risco de rejeição antes do transplante. No entanto, a rejeição de transplantes de órgãos sólidos tem sido associada a presença de anticorpos anti-HLA.

No âmbito dos transplantes renais, as rejeições mediadas por anticorpos podem trazer consequências, e sua ocorrência reflete na sobrevida do enxerto. Alguns autores alertam que tais anticorpos podem ser detectados no soro dos receptores de transplantes de rim antes da falência do enxerto (58), e por isso preconizam a monitorização dos anticorpos anti-HLA no pré-transplante renal. Contudo, devido ao surgimento das tecnologias na identificação de anticorpos específicos anti-Antígenos Leucocitários Humanos (HLA), as avaliações clínicas e imunológicas antes dos transplantes de órgãos e tecidos têm sido mais precisas, contribuindo para o sucesso dos transplantes, além de elevar a taxa de sobrevida dos pacientes. (59)

Evidências de vários estudos indicam claramente que a presença de anti-HLA circulantes anticorpos, especialmente específicos do dador, levam ao enxerto precoce perda, e altos títulos de DSA podem até levar a hiperagudos ou rejeição aguda acelerada. Enxerto de longo prazo a sobrevivência também é adversamente afetada pela presença de DSA pré ou pós-transplante. Já é sabido que a presença de anticorpos anti-HLA circulantes leva a dano

endotelial no órgão recém-enxertado através de vias dependentes ou independentes do complemento. Dados coletados na última década indicam claramente um nível significativamente mais baixo de DSAs em pares idealmente combinados dador-receptor. HLA incompatíveis, especialmente aqueles em loci HLA-DR e HLA-C, têm implicações mais amplas na sobrevida do enxerto pós-transplante. (60)

Em um estudo que avaliou a correlação entre intensidade e especificidade de anticorpos anti-HLA pré-transplante renal, nos 2 primeiros anos após o transplante, de forma a identificar fatores de risco ou marcadores de disfunção precoces do aloenxerto, em que observaram alterações histológicas do enxerto renal. O presente estudo incluiu um coorte retrospectivo de receptores de transplante renal sensibilizados com anticorpos anti-HLA no pré-transplante submetidos a biópsia de enxerto. Os grupos foram divididos em função da especificidade dos anticorpos anti-HLA: sem anticorpos dador-específicos (não-DSA, n = 29) e com anticorpos dador-específicos (DSA positivo, n = 16). Destes, 27 pacientes apresentaram anticorpos dador-específicos e 62 apresentaram anticorpos inespecíficos, 11 pacientes (40%) com DSA e 33 (53%) sem DSA foram excluídos por não terem realizado biópsia do enxerto (p = 0,28). (61)

3.7. Uso da pronase e DNase no *Crossmatch* por Citometria de Fluxo

As provas cruzadas (ou *crossmatch*) identificam anticorpos que podem ocasionar rejeições ao enxerto. A utilização desses métodos é de suma importância na avaliação imunológica pré-transplante, com finalidade de prevenção à rejeição mediada por anticorpos, antes da realização de transplantes de órgãos sólidos. (62)

Entretanto, os testes de fase sólida identificam anticorpos anti-HLA pré-formados através dos métodos: Esferas de Antígeno Único - (*Single Antigen Beads* - SAB), Prova Cruzada Virtual (*Virtual Crossmatch* - VXM), Citotoxicidade Dependente de Complemento (*Complement-Dependent Cytotoxicity Crossmatch* - CDC-XM), Prova Cruzada por Citometria de Fluxo (*Flow cytometry Crossmatch* - FCXM), sendo este considerado uma importante tecnologia no laboratório clínico, devido ao aumento da sensibilidade em relação ao CDCXM. A

incidência de rejeição pode ser reduzida com a verificação da compatibilidade entre dador e receptor, quanto ao sistema ABO e ao sistema HLA, através, também, do auxílio de algumas técnicas e protocolos. (63)

O *Crossmatch* por Citometria de Fluxo é realizado para detectar a presença de anticorpos específicos do dador, no soro de potenciais receptores de aloenxerto renal, baseia-se na incubação do soro do receptor com linfócitos totais do dador, seguida da adição de anticorpo secundário conjugado com fluorocromo. Tem a vantagem de propiciar a avaliação, independente e simultânea, da prova- cruzada contra os linfócitos T e B do dador, além de ser mais sensível do que a prova-cruzada CDC-AGH. A desvantagem é que, por ser muito sensível, podem ocorrer resultados falso-positivos. (64) Além disso, um anticorpo monoclonal marcado, que detecta células B CD19-PE, e um anticorpo monoclonal conjugado que detecta células T CD3-PerCP, são adicionados.

Esta combinação permite a detecção simultânea de aloanticorpos que reagem com células T e B e elimina a ligação de fundo devido a Células Assassinas Naturais (*Natural Killer Cell*- NK) e monócitos. Os resultados são então analisados por citometria de fluxo e expressos como positivos ou negativos com base em uma mudança do MFI do soro de teste em relação ao soro de controle negativo. (65)

A incidência de rejeição pode ser reduzida com a verificação da compatibilidade entre dador e receptor através, também, do auxílio de algumas técnicas e protocolos. As provas cruzadas (ou *Crossmatch*) identificam anticorpos que podem ocasionar rejeições ao órgão transplantado. (66) O tratamento de linfócitos de dadores com pronase e DNase, que actua na remoção de receptores $Fc\gamma$ de CD20 em células B, minimizando assim o reação de fundo (antígeno/anticorpo), proporcionando o melhoramento da especificidade e sensibilidade do ensaio, também permite que o FCXM seja realizado em pacientes submetidos ao tratamento de dessensibilização, eliminando a interferência deste anticorpo monoclonal. Isso concede uma melhor avaliação de risco no pré-transplante e alcança melhores resultados na sobrevida do enxerto. (67)

Outros estudos, no entanto, sugerem que a utilização do *Crossmatch* por Citometria de Fluxo, sendo um método baseado em células, mais sensível para a detecção de anticorpos específicos do dador, em transplantes de órgãos. Em que, lamentavelmente, a reatividade de fundo do FCXM, é elevada em ensaios com linfócitos B, devido à ligação não específica de imunoglobulina por receptores Fc e imunoglobulinas de superfície de células B. Para reduzir a reatividade de fundo em um ensaio de células B no FCXM, tratando os linfócitos com pronase.

Os autores notaram que o tratamento reduziu eficientemente a expressão de CD19, CD20 e do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) I e II em células B, mas dependendo da concentração, podem afetar significativamente a expressão de: CD19, CD20, MHC-I e -II em células B. Este estudo revelou que o tratamento com pronase foi associado à um aumento relativo da sensibilidade e especificidade no ensaio de células B na prova cruzada contra linfócitos por citometria de fluxo. (68)

Neste estudo, os autores comparam células tratadas com pronase e sem pronase, o tratamento com pronase de linfócitos, em concentrações mais altas para a remoção do Fc CD20 da superfície de célula B. Em que, foram examinados, os efeitos do tratamento, com pronase na expressão do antígeno leucocitário humano (HLA) no FCXM. Os linfócitos foram testados sem tratamento e após o tratamento com 2 mg / mL de pronase em (10 dadores) ou 1 mg / mL em (6 dadores). A concentração de 2 mg / mL reduziu a expressão de HLA em 28 de 30 (93%) dos casos. O tratamento com 1 mg / mL de pronase aumentou significativamente a reatividade em 20 de 23 testes de células T (87%). Segundo os autores, esses dados indicaram que o tratamento com pronase, conforme a sua concentração, podem proceder em resultados FCXM errôneos. (69)

A otimização do FCXM (o protocolo *Halifax*) inclui uma plataforma de bandeja de 96 poços, tempos de lavagem reduzidos, aumento de soro para suspensão de células proporção de volume, incubações encurtadas e temperatura de incubação mais alta. Já o protocolo *Halifaster*, que é relativamente modificado e utiliza métodos que melhoram a pureza dos linfócitos em comparação com a centrifugação de gradiente de densidade, tanto no protocolo *Halifax* quanto no *Halifaster*. (20) Recentemente, Liwski (*et al*), desenvolveram esses procedimentos de FCXM, segundo os autores, reduz os custos do ensaio (em > 50%) e

diminui o tempo de realização do ensaio (em > 60%), sem comprometer a sensibilidade ou especificidade.

Entretanto, uma série de melhorias têm sido descritas desde então, como o tratamento de células de doadores com pronase e Dnase para aumentar a sensibilidade e especificidade bem como a implementação dos protocolos, nomeadamente o *Halifaster* na rotina dos laboratórios de histocompatibilidade. (70)

Contudo, a técnica de *Crossmatch* por Citometria de Fluxo, se caracterizou efectuando, em duplicado, com amostras de sangue periféricas de doadores vivos, renais e com soros de receptores de órgãos. Foi realizada uma comparação entre os dois métodos de FCXM, a ser um deles empregado no laboratório o *Crossmatch* por Citometria de Fluxo; e com outro através do método *Halifaster*, pelo qual são utilizadas células tratadas com as enzimas Pronase e Dnase. (71)

O processo de transplante renal, aplicado actualmente, é resultado do avanço da compreensão da imunologia de transplante de órgãos. As tecnologias de ensaios laboratoriais foram desenvolvidas para caracterizarem a sensibilização do paciente e detectarem DSA na prova cruzada pré-transplante. (72)

Segundo os dados fornecidos pela Sociedade Portuguesa de Transplantação de Órgãos foram realizados aproximadamente 2000 transplantes nos últimos 30 anos, e durante o ano de 2009 foram realizados 177 transplantes renais, sendo um total de 8136 transplantes, porém em 2008 foram 525, destes, 49 foram de dador vivo (9,3%). Segundo o levantamento, o número de doentes que entram anualmente em diálise é significativamente superior ao número de doentes que são transplantados e a existência de escassez de órgãos, torna ainda mais agravante as condições do doente, que necessita do transplante, contribuindo para o aumento do número de doentes em lista de espera. Neste mesmo estudo, notaram que a percentagem de doadores vivos foram muito reduzidas (menos de 10%) em comparação com outros países, e que o número de rins transplantados que funcionaram adequadamente foi de 89% no período de 12 meses, 78% em 5 anos e 51% no período de 15 anos e a percentagem de doentes transplantados renais que se encontram vivos foram de

96,2% aos 12 meses, 91,2% aos 5 anos e 75% no período de 15 anos após o transplante, até finais de 2008. (73)

Neste estudo realizado em 2015, entre os números de doentes incluídos em programas de hemodiálise, diálise peritoneal e transplantação renal, os últimos dados disponíveis mostram que a hemodiálise continua a representar a principal técnica de substituição da função renal (com 59,7% de doentes prevalentes), a transplantação renal com 63,6% de doentes prevalentes, e sendo a diálise peritoneal a técnica escolhida por menos de 10% dos doentes incidentes, representando apenas 3,7% dos doentes prevalentes em tratamento substitutivo em 31 de dezembro de 2016.

Segundo os autores, Portugal enfrenta uma tendência de crescimento anual de doença renal crónica estágio 5, em diálise ou transplantação, apresentando taxas elevadas de incidência e prevalência de doença renal crónica estágio 5, da Europa 226 e 1824. A nível mundial, a prevalência de doença renal crónica estágio 5, sob a terapêutica substitutiva da função renal, é apenas superada pela que se regista na Tailândia, Japão, Singapura e nos EUA. Os fatores que podem justificar os valores elevados da prevalência da doença renal crónica estágio 5, sob terapêutica substitutiva da função renal em Portugal, são: as melhorias na prestação de cuidados de saúde em geral após o estabelecimento do Serviço Nacional de Saúde em 1979, com elevada taxa de transplantação renal incluindo doentes mais idosos, como resultado dos avanços tecnológicos e aumento da sobrevivência nestes grupos etários. (74)

4. Estudo Prático realizado em Laboratório

4.1. Objectivo Principal

O objectivo principal consistiu na realização de um estudo, em duplicado, entre o método Convencional já empregado no laboratório e o *Halifaster*, através da utilização da técnica de *Crossmatch* por Citometria de Fluxo, entre esses dois métodos, mediante análises estatísticas pertencentes ao controlo de qualidade, para uma possível implementação do protocolo *Halifaster* na rotina do laboratório, com propósito de aperfeiçoamento das técnicas já utilizadas no pré-transplante renal, do sector de transplantação de órgãos sólidos.

4.2. Métodos

Este foi um estudo prospectivo, avaliado pela técnica de FCXM, entre os métodos Convencional e o *Halifaster*, em que foi realizada uma comparação, entre esses dois métodos e efectuado, mediante análise estatística de controlo de qualidade, a aceitação do método. Teve como propósito uma possível implementação do protocolo. Entretanto, foram utilizadas amostras de sangue periférico de dador vivo e soros de receptores de rim primário ou de re-transplante, no pré-transplante. Dentro do período decorrido de quatro meses foram realizadas 53 FCXM, na comparação dos dois métodos, no Laboratório de Citometria de Fluxo e Imunidade Celular.

Para tal, foram efectuados o controlo de qualidade interno, dos quais foram utilizados dois para a validação do método e indicadores de controlo na avaliação de DSA sendo eles: o controlo positivo e o controlo negativo. O controlo-negativo foi obtido de amostra conhecida, relativo a um pool de soros de dadores A e B, masculinos não transfundidos. No que diz respeito ao controlo-positivo confere-se um pool de soros de doentes hipersensibilizados.

Na análise e aquisição no citometro de fluxo, bem como nos controlos e as amostras, foram calculados e a expressão dos resultados foram avaliadas separadamente as alterações FL 1 (IgG FITC) por região; uma para cada população celular, entre as células T e células B. Paralelamente, houve comparação com a intensidade de fluorescência dos controlos-negativos, valorizando a mediana dos canais em cada histograma. Os *crossmatches* foram considerados positivos para as células T > ou igual a média dos valores da mediana dos controlos-negativos, mais 50 canais e positivos para células B > ou igual a média dos valores da mediana aos controlos-negativos, mais 80 canais.

Alguns critérios foram estabelecidos para a validação do ensaio, em que seriam validos se obtivessem pelo menos 3 dos 4 critérios estabelecidos, o valor do controlo-negativo estando dentro dos 2 SD, obtidos por cálculos estatísticos e a variação entre as réplicas do controlo-negativo < 20%, e considerar o FCXM positivo > ou igual a média dos valores do controlo-negativo, mais o número de canais para as células T que são 50 canais e positivos para células B que são 80 canais.

As análises estatísticas, envolveram os cálculos: Média, Desvio Padrão (DP), Coeficiente de Variação (CV) e Z- score, Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN), cálculos da Especificidade, Sensibilidade, Exatidão e análises da curva ROC, relativo à validação dos ensaios do laboratório, conforme é apresentado em tabela a seguir:

Comparação dos protocolos Convencional e Halifaster FCXM

Tabela 1 Comparação entre os protocolos Convencional e o Halifaster

Parâmetro	Método de bandeja FCXM Convencional	Protocolo Halifaster FCXM
Plataforma de ensaio	Bandeja de 96 poços	Bandeja de 96 poços
Soro (µL)	20	30
Método de isolamento de células, preparação de células	Ficool	EasySep™ Direct, linfócitos
Tempo de tratamento com pronase / DNase (min)		15
Suspensão celular (µL)	100	15
Concentração celular	$2,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
Primeira incubação (min)	30	20
Lavagens (1ª série)	5 min à 250 x g 1ª lavagem 2 min nas demais	4 min à 800 x g 1ª lavagem 2 min nas demais
Tampão de lavagem (µL)	150	200
Coquetel de anticorpos (µL)	30	50
PBS / CD3 / CD19 / IgG-FITC	47,4 µL 5 µL 5 µL / 20 µL	46,88 / 1,5/1,0/ 0,125
Segunda incubação (min)	20	5
Lavagens (2ª série)	5 min a 250 x g	4 min a 800 x g 1ª lavagem 2 min nas demais

4.3. Estudo Imunológico

4.3.1. Obtenção de células do dador

Nos casos de transplantes com dadores vivos, as células mononucleares dos dadores foram obtidas a partir de 30 mL de sangue periférico coletados em tubos *vacutainer* (*Becton Dickson, Mountainview, CA, EUA*).

A suspensão celular obtida foi centrifugada a 800xg por 2 minutos, retirado o sobrenadante; em seguida foi adicionada à pronase em uma concentração já ajustada conforme a concentração celular do dador, após a incubação no banho maria por 15 minutos, a 37°C. A seguir foi adicionada a Dnase também com o valor ajustado e realizada a incubação por mais 2 minutos, a 37°C, após transcorrido os 2 minutos, foi centrifugado e retirado o sobrenadante e adicionado o DPBS, seguida de centrifugação por 2 minutos a 800 xg, e novamente retirado o sobrenadante.

Após isso, foi adicionado 1 mL de DPBS às células, e estas analisadas em um contador automático e ajustadas o valor das células e dispensadas uma microplaca contendo 96 poços de fundo em U; foram dispensados 30 µL de cada soro e 15 µL de suspensão celular de linfócitos totais do dador tratados ($1,5 \times 10^6$ células) por poço e incubados em temperatura ambiente em rotação por 20 min. Em seguida as células foram lavadas com 200 µL de tampão de lavagem de fluxo, seguiu com adição do coquetel de anticorpos (2 µL de anti-CD3-PerCP 1 µL de CD19-PE, 0,125 µL de anti-IgG-FITC com 50 µL de PBS), ajustados conforme o nº de poços utilizados, sendo adicionados em seguida. As células foram incubadas durante 5 minutos, no escuro.

Procedeu-se a lavagem das células por duas vezes, com 200 mL de tampão de lavagem de fluxo seguida de centrifugação, e ressuspensão em 150 mL de tampão de lavagem de fluxo. Após a transferência das amostras para tubos *Falcon*, contendo 250 µL de tampão de lavagem de fluxo, a aquisição ao citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (*BD Biosciences*), para posterior leitura foi utilizado o software *BD Cellquest*™ (*BD Biosciences*).

4.3.2. Análise estatística

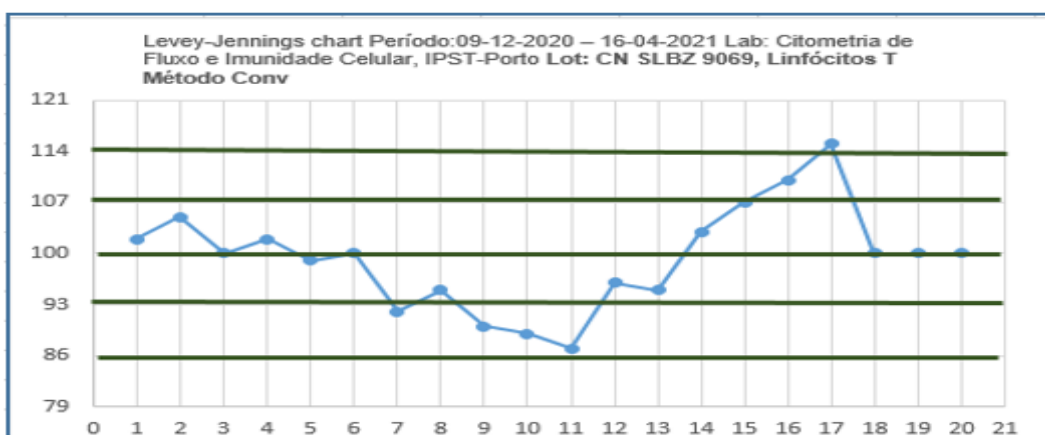


Gráfico 1: Controlo de qualidade interno, como mostra o referente gráfico no período em que foram testadas as 20 amostras, não se verificou qualquer alarme.

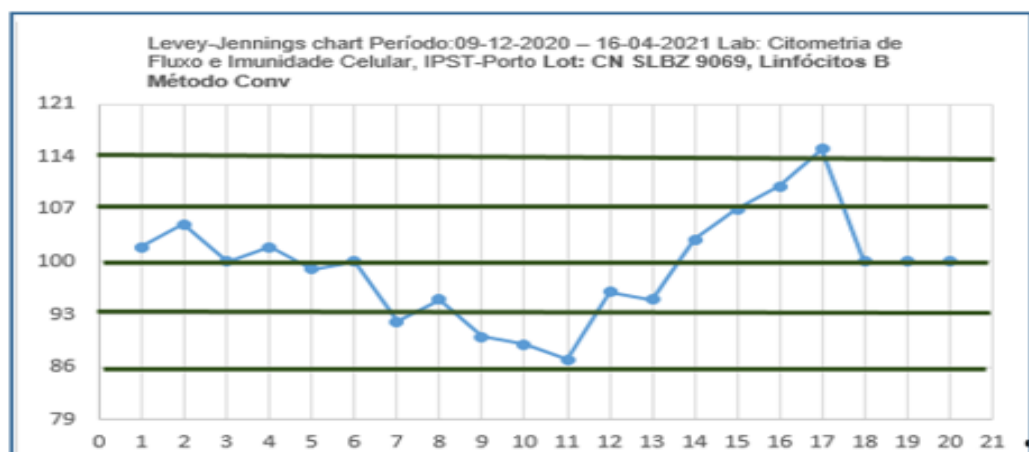


Gráfico 2: Controlo de qualidade interno, como mostra o gráfico no período em que foram testadas as 20 amostras, também obteve conformidade, mediante análise.

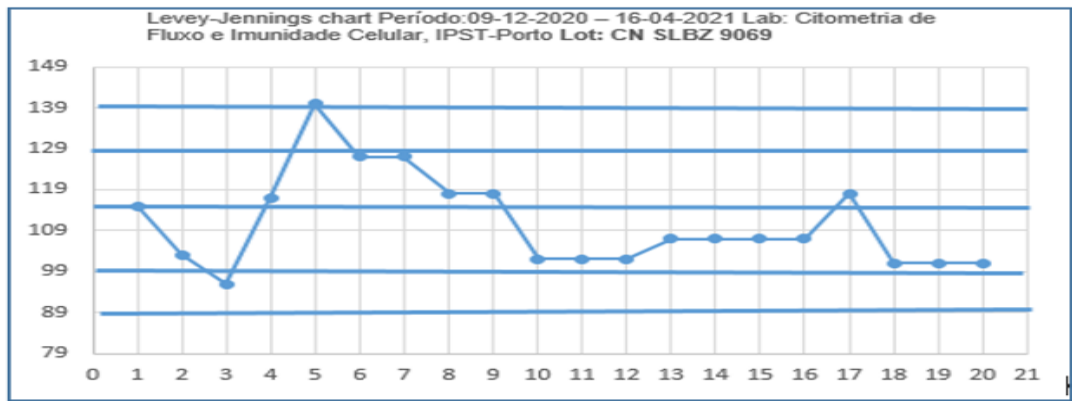


Gráfico 3: Como mostra o gráfico no período em que foram testadas as 20 amostras, para as células T no método *Halifaster*, também esteve dentro da normalidade.

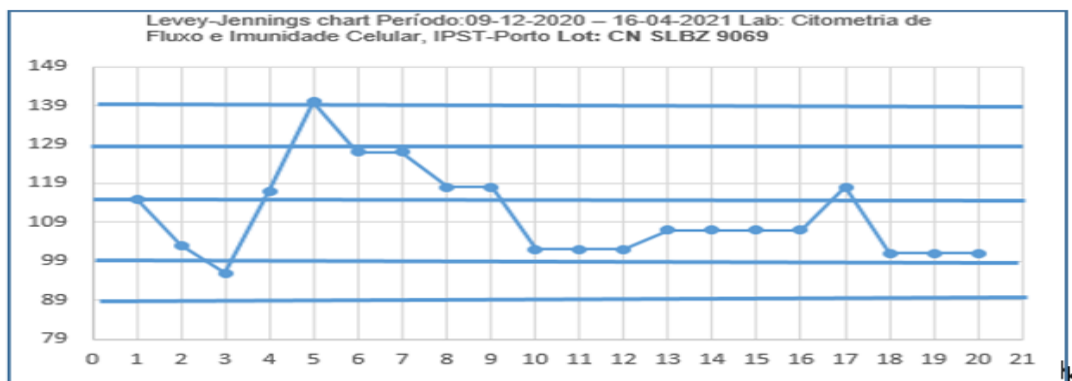
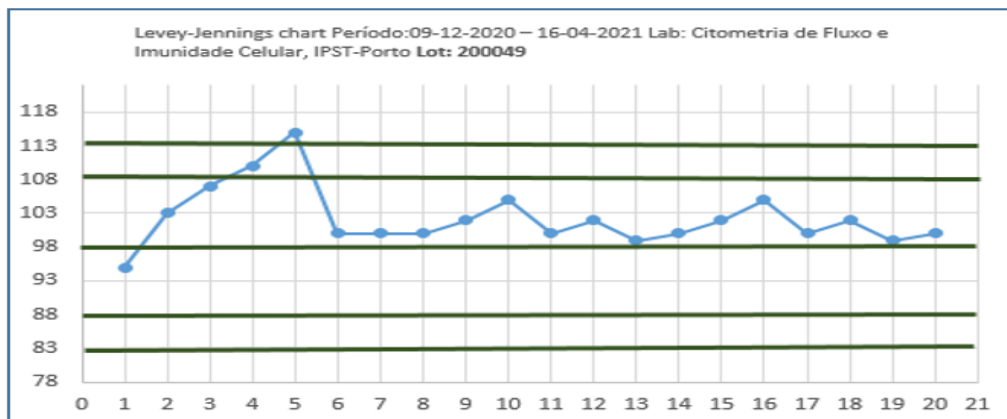


Gráfico 4: Como mostra o gráfico no período em que foram testadas as 20 amostras, para as células B no método *Halifaster*, também não observou qualquer alarme.



No gráfico 5, no mesmo período, verificou-se um alarme, como erro aleatório, na análise das 20 amostras, coincidindo com a mudança de lote do reagente CD3, voltando a normalidade ao longo dos ensaios.

5. Resultados

No período entre janeiro à abril de 2021, foram realizados 53 *Crossmatch* por citometria de fluxo no pré-transplantes renal, no laboratório de Citometria de Fluxo e Imunidade Celular. As análises foram feitas em paralelo com as amostras do sangue periférico do dador vivo renal e o soro do receptor, procedeu em duplicado a comparação, entre os protocolos Convencional e o *Halifaster*. Foram efectuadas análises estatísticas e controlo de qualidade, para a aceitação do método. No *Halifaster* houve a incubação das células do dador vivo renal, com a pronase e Dnase para tratamento das mesmas.

A partir dos resultados obtidos, entre os dois métodos de FCXM, em que, avaliou-se a presença ou ausência de DSAs, nas amostras analisadas.

A análise dos resultados dos ensaios, foi carácter qualitativo, devido a classificação dos resultados das amostras sendo definidos como, positivo e negativo.

As 53 amostras obtidas para o estudo das DSAs, dessa análise, resultaram em: 35 sendo positivas para alguma DSA e 18 negativas para as mesmas:

Tabela 2: Estudo para VN, VP, FP, FN nas Células T no Método Convencional

Método Convencional	DSA	
	Negativas	Positivas
LINFÓCITOS T		
Negativas	VN 15	FN 14
Positivas	FP 0	VP 10

Tabela 3: Estudo para VN, VP, FP, FN nas Células B no Método Convencional

Método Convencional	DSA	
LINFÓCITOS B	Negativas	Positivas
Negativas	VN 14	FN 4
Positivas	FP 2	VP 19

Tabela 4: Estudo para VN, VP, FP, FN nas Células T no Método *Halifaster*

Método <i>Halifaster</i>	DSA	
LINFÓCITOS T	Negativas	Positivas
Negativas	VN 16	FN 18
Positivas	FP 1	VP 5

Tabela 5: Estudo para VN, VP, FP, FN nas Células B no Método *Halifaster*

Método <i>Halifaster</i>	DSA	
LINFÓCITOS B	Negativas	Positivas
Negativas	VN 19	FN 10
Positivas	FP 3	VP 8

Nas tabelas: 2,3,4, e 5, o total das 53 amostras, estão representadas, os resultados da análise dos verdadeiros-positivos (VP), verdadeiro-negativos (VN), falsos-positivos (FP) e falso-negativos (FN), Linfócitos T e B, separados e em conjunto, para os protocolos Convencional e o *Halifaster*.

Na tabela 6, é possível observar o número de MHC Classe I, totalizando 17 DSAs e MHC Classe II com 12 DSAs, e em conjunto, confere um número menor de DSA Classe I e II, para ambos os métodos.

Tabela 6: Total de MHC classe I, classe II e classe I e II, nos dois métodos

MHC CLASSE I	MHC CLASSE II	MHC CLASSE I e II
19	12	4

Na tabela 4, o total das 53 amostras estão representadas, os resultados da análise dos verdadeiros-positivos e negativos e dos falsos positivos e negativos, dos Linfócitos T e B, separados e em conjunto, para os protocolos Convencional e o *Halifaster*.

No presente estudo, com a monitorização prospectiva e seriada dos anticorpos anti-HLA pré-transplante renal foi possível detetar nas amostras que resultaram como positivas para as seguintes DSAs:

Tabela 7: DSAs apresentadas no teste de FCXM, em ambos os métodos.

MHC CLASSE I	MHC CLASSE II
A2 1769, A31 1708, A33 1414, A3 2662, A68 1311, B35 1254, B44 2421, B51 3593, B57 1208,	DQ5 6465, DR7 1096, DR4 4496, DQ2 6253, DR8 6481,
Cw6 9412, Cw7 1988, Cw5 7082, Cw18 6550, Cw4 11643, Cw8 3209, Cw14 5265, Cw15 6162,	DR9 4911, DR53 2054, DQ7 1717, DQ6 4390, DR52 1467, DR1 4481, DR13 1620.

Associação entre variáveis qualitativas foi realizada através das análises de DSAS, utilizando a análise estatística da curva ROC e a comparação entre essas curvas foi realizada através do teste *Log-Rank*. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A análise estatística foi realizada com auxílio do programa SPSS para *Windows*, versão 22 (SPSS Inc, Chicago, EUA).

As análises obtidas para linfócitos T 05/40 Verdadeiro-positivo, 16/40 Verdadeiro-negativo, 1/40 Falso-positivo e 18/40 Falso-negativo. Para linfócitos B, 08/40 Verdadeiro-positivo, 19/40 Verdadeiro-negativo, 03/40 Falso positivo, e 10/40 Falso-negativo, no protocolo Halifaster. E para linfócitos T 10/39 Verdadeiro-positivos, 15/39 Verdadeiro-

negativo, 0/39 Falso-positivo e 14/39 Falso-negativo. Para linfócitos B, 19/39 Verdadeiro-positivo, 14/39 Verdadeiro-negativo, 02/39 Falso positivo, e 04/39 Falso-negativo, no protocolo Convencional. A partir desses valores foi efectuado análise estatística da Curva ROC, e utilizamos um *Cut-Off*, com o valor obtido para linfócitos T e B, para ambos os testes FCXM, foi de 1000 MFI.

O valor obtido para linfócitos T foi 1000 MFI com uma sensibilidade associada de 50%; especificidade 94,0%; valor preditivo positivo 20,0%; valor preditivo negativo 48,0%. O AUC da curva ROC foi de 0,70 ($p < 0,05$). Para linfócitos B, o valor ideal de corte, de 1000 MFI com uma sensibilidade associada de 90,0%; especificidade 86,0%; valor preditivo positivo de 84,0%; valor preditivo negativo 88,0% e a AUC de A curva ROC foi de 0,80 ($p < 0,05$), no *Halifaster*. O valor obtido para linfócitos T foi 1000 MFI com uma sensibilidade associada de 50%; especificidade 60,0%; valor preditivo positivo 68,0%; valor preditivo negativo 70,0%. O AUC da curva ROC foi de 0,70 ($p < 0,05$). Para linfócitos B, o valor ideal de corte, de 1000 MFI com uma sensibilidade associada de 82,0%; especificidade 87,0%; valor preditivo positivo de 70,0%; valor preditivo negativo 88,0% e a AUC de A curva ROC foi de 0,80 ($p < 0,05$), no método Convencional.

Tabela 8: Estatísticas da curva ROC, AUC (área sob a curva) com os intervalos de confiança

	HALIFASTER		CONVENCIONAL	
	Linfócitos T	Linfócitos B	Linfócitos T	Linfócitos B
Cut-off (MFI)	1000	1000	1000	1000
AUC	0,70 ($p < 0,05$).	0,80 ($p < 0,05$).	0,70 ($p < 0,05$)	0,80 ($p < 0,05$)
Sensibilidade (%)	50%	90,0%	50%	82,0%;
Especificidade (%)	94,0%;	86,0%;	60,0%;	87,0%;
VPP (%)	20,0%;	84,0%;	68,0%;	70,0%;
VPN (%)	48,0%	88,0%	70,0%	88,0%

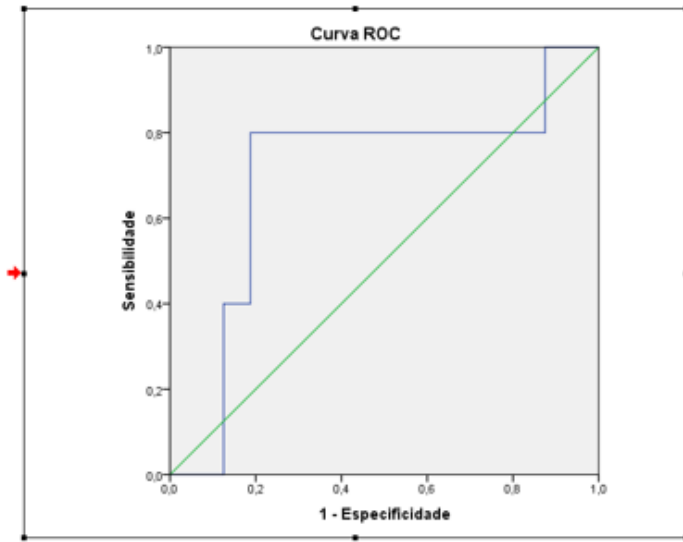


Fig. 4 Curva ROC para valores de Σ MFI, nos protocolos Convencional e *Halifaster*

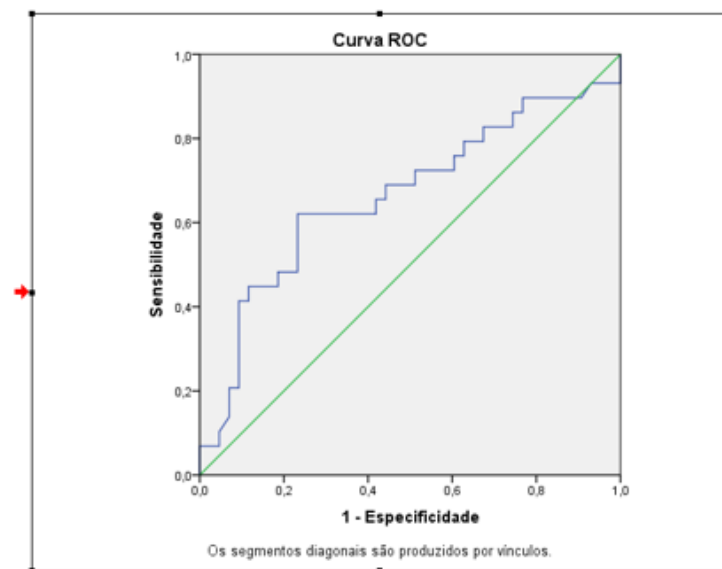


Fig. 5 Curva ROC para valores de Σ MFI, nos protocolos Convencional e *Halifaster*

6. Discussão

O impacto clínico dos anticorpos anti-HLA classe I na rejeição aguda e na perda do enxerto já é conhecido. No entanto, a importância clínica dos anticorpos classe II também é relevante. Observou-se que na maioria dos casos aqui estudados, os anticorpos anti-HLA classe I e classe II foram detectados simultaneamente. Constatou-se que ambas as classes de anticorpos podem exercer efeito deletério sobre o enxerto renal, pois tanto anticorpos anti-

HLA dador-específico classe I quanto classe II apresentam maior risco de rejeição aguda e de perda do enxerto.

Para estes procedimentos, em bandeja de 96 poços, tanto para o Protocolo Convencional quanto para o *Halifaster*, em que para a primeira foram utilizadas o Ficool para o isolamento das células, por gradiente de densidade, e o Protocolo *Halifaster*, fez uso das *beads*, que são esferas imunomagnéticas com selecção negativa.

A análise dos resultados, relacionados à tabela 1 entre os protocolos Convencional e o *Halifaster*, relevaram que, em termos de tempo de lavagem, no protocolo *Halifaster* utilizou-se menos tempo em comparação ao Convencional, tanto na primeira, quanto na segunda série de lavagens. Quanto a quantidade de tampão de lavagem, também não houve diferença entre as duas técnicas. Porém, com relação ao tempo, na primeira e na segunda incubação, o Convencional teve um acréscimo de cerca de 35 min comparado ao *Halifaster*.

Referente a quantidade em microlitros de soro, o *Halifaster* é maior, ou seja, tem uma adição de 10 µl., e na quantidade de coquetel de anticorpos, também tem um ligeiro aumento, cerca de 20 µl., comparado ao Convencional. Relativamente a quantidade de suspensão celular, o Convencional tem um aumento de 85 µl., em comparação ao *Halifaster*. Os dados da tabela revelam que houve um ganho em tempo de incubação, no Protocolo *Halifaster*, mesmo com o acréscimo de 15 min, no tratamento das células com a pronase e Dnase; em termos de tempo pode ser vantajosa à inclusão deste protocolo na rotina do laboratório.

Como mostram as demais tabelas, no decorrer dos estudos, entre as 35 amostras positivas em 10 (28%), dos resultados verdadeiro-positivo para os linfócitos T, e em 19 (54%), para os linfócitos B, e foram 15 (42%), verdadeiro-negativo para os linfócitos T, e 14 (40%), para os linfócitos B, entretanto, para os falsos-positivos, os linfócitos T, obteve-se 0 de resultado e 2 (6%) para os linfócitos B, já para os falsos-negativos foram 14 (40%) para os linfócitos T e 4 (11%) para os linfócitos B, no método convencional. Vale ressaltar que entre os verdadeiros-negativos, os resultados tiveram uma pequena semelhança entre os linfócitos T e B, e um verdadeiro-positivo, considerável para o linfócito B, conforme é mostrado nas Tabela 2 e 3.

Na comparação entre o Método *Halifaster*, o estudo mostrou que 5 (14%) verdadeiro-positivo para o linfócito T e 8 (22%) para o linfócito B, e para o verdadeiro-negativo foram 16 (36%), para o linfócito T, contra 19 (54%) para o linfócito B, na análise do falso-positivo para os linfócitos T, obteve-se 1 (2%) de resultado e 3 (8%) para os linfócitos B, já para os falsos-negativos 18 (51%) para os linfócitos T e 10 (28%) para os linfócitos B, como referido anteriormente, podendo proceder devido ao uso de medicamentos, que confere o aumento de expressão de fundo, promovido por agregados decorrentes de lavagens ineficientes, a estar aumentado no método *Halifaster*. Portanto é possível concluir que os verdadeiros-negativos para os linfócitos T e B, tanto para o Convencional quanto para o *Halifaster*, não houve diferença, quanto ao verdadeiro-positivo para os linfócitos B, foi muito menor no Método *Halifaster*, e entre os falsos-negativos, entre os dois métodos, o Convencional, obteve-se um valor mais baixo em comparação ao Método *Halifaster*.

No entanto é possível se considerar esses valores mais baixos entre os verdadeiros-positivos nos linfócitos B, devido ao tratamento das células com a pronase, que agem nos receptores Fc CD20 das células B, diminuindo a expressão HLA e que também atua no consumo das mesmas.

Estudos prévios mostram que o tratamento de linfócitos com pronase, usados para reduzir a ligação inespecífica de imunoglobulinas em testes FCXM, obtiveram resultados significativos para antígenos HLA de classe I em células T 10%, para as de classe II células B 37%. Este estudo foi realizado com a utilização de células tratadas e não tratadas com pronase, e concluiu-se que a depender da quantidade de pronase, houve um consumo e eventual diminuição dos linfócitos.

7. Conclusões

Este relatório de estágio teve por finalidade descrições inerentes às atividades realizadas ao longo do período de estágio curricular, na busca de se cumprir o objectivo de consolidar, tanto na vertente teórica como na prática, os conhecimentos e competências a nível da técnica de *Crossmatch* por Citometria de Fluxo, empregadas nos protocolos Padrão e

Halifaster, bem como o processo de validação de um método, que poderá vir a ser introduzido futuramente no laboratório, e o conhecimento no âmbito da transplantação de órgão sólido, nomeadamente o renal, teve como objectivo principal o aprimoramento de conhecimentos ao longo dos quatro meses.

Com efeito, no presente relatório, o resultado obtido neste estudo demonstrou que para todas as amostras analisadas, os testes foram válidos, entretanto, para os dadores vivos, o uso da Pronase e DNase, para o tratamento das células B, no Protocolo *Halifaster*, se alcançou o consumo das mesmas. Contudo, devido ao tratamento de dessensibilização, realizado antes do transplante pelos doentes, percebeu-se que também podem contribuir na interferência dos resultados. Foi um período particularmente desafiador, uma vez que este estudo se desenvolveu simultaneamente à inesperada pandemia de Covid-19. Entretanto, a partir deste estudo é esperado continuidade de outros, a despeito da possível validação do Protocolo *Halifaster*.

E finalmente este trabalho espera ter contribuído, de alguma maneira, com a investigação científica e na busca por mais avanços nas técnicas empregadas. Foi realizado com maior foco, determinação e cuidado quanto possível e pode-se dizer, sem dúvida alguma, que o tempo investido foi profundamente válido.

8. Referências Bibliográficas

1. Presidente O. Gama J. Diário da República, 1.a série — N.º 163. 2010 de Agosto 23..
2. Normoc, E.S.R.; Prote, ANA; Prote, O; Troponinai, C.M.; Prote, E.S.R.; Gen, H.I.V. Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais de Henry. 21a São Paulo: Manole; 2012.
3. Gondim, C.S.; Junqueira, R.G.; Souza, S.V.C. Tendências em validação de métodos de ensaios qualitativos. Trends in implementing the validation of qualitative methods of analysis. 2011: p. 70(4):433–47.
4. BAIN, B.J.; BATES, I.; LAFFAN, M.A.; LEWIS, S.M. Dacie and Lewis; 2011.
5. Burtis, C.A.; Bruns, D.E.; Tietz. Fundamentos de Química Clínica e Diagnóstico Molecular. : 7a. Elsevier; 2016.
6. Martelli, A. Gestão da qualidade em laboratórios de análises clínicas TT. Quality management in clinical analysis laboratories. 2011: p. 13(ESP):363–8.
7. Karageorgou, E.; Samanidou, V. Youden test application in robustness assays during method validation. J Chromatogr A. 2014: p. 1353:131–9.
8. Vieira, S.. Introdução à Bioestatística. 4th ed.; 2008.
9. Konieczka, P.; Namiesnik, J.. Quality assurance and quality control in the analytical chemical laboratory: A practical approach. Francis T&E, editor. Analytical chemistry series. 2009.
10. Turgeon, M.L.; Linné and Ringsrud's. Clinical Laboratory Science– Concepts, Procedures, and Clinical Applications; 2016.
11. Ratcliffe, J.G. External quality assurance. Ann Clin Biochem. 1998: p. 35(4):550–1.
12. Vieira, K.F.; Shitara, E.S.; Mendes, M.E.; Sumita, N.M. A utilidade dos indicadores da qualidade no gerenciamento de laboratórios clínicos: J Bras Patol e Med Lab.; 2011.
13. Confalonieri, Rebeca; Damalio, Julio Cesar Pissuti. Bioquímica Clínica e Controle de Qualidade em Laboratório Clínico Brasília – DF.
14. Xavier, R.M.; et. al. LAB. NA PRÁTICA CLÍNICA. : 3a. Artmed;; 2016.
15. Publications OM.. Oxford Handbook of Clinical and Laboratory Investigation. Med Sci Sport Exerc. 2011: p. 43(9):1810.
16. Standards, A. Society A, Reserved AR. ASHI Standards ed.; 2019.
17. Doebelin, E.. Introduction to Statistical Design of Experiments. Instrumentation Design Studies. 2010: p. 1–30 p.
18. UK NEQAS – Histocompatibility & Immunogenetics. 2020.

19. Schmid, I. Clinical Flow Cytometry – Emerging Applications. Clinical Flow Cytometry – Emerging Applications ed.; 2012.
- 20 Adan, A.; Alizada, G.; Kiraz, Y.; Baran, Y.; Nalbant, A. Flow cytometry: basic principles and applications. Crit Rev Biotechnol. 2017;; p. 37(2):163–76.
21. Nguyen, D.; Diamond, L.W.; Braylan, R.C. Flow cytometry in hematopathology: A visual approach to data analysis and interpretation. 2007;; p. 1–344 p..
- 22 Bott, R. Flow cytometry principle and protocols.: Igarss; 2014.
- .
- 23 Shapiro, H.M. Practical Flow Cytometry; 2003.
- .
- 24 Robinson, J.P.. Flow Cytometry; 2004.
- .
- 25 Sataloff, R.T.; Johns, M.M.; Kost, K.M. Practical flow cytometry in Haematology. Wiley, editor. 2015.
- .
- 26 Diretriz A. C. S.. DIRETRIZ ACS PARA CITOMETRIA DE FLUXO CLÍNICO PRÁTICA DE LABORATÓRIO. 2017.
- 27 Liwski, R.S.; Pochinco, D.; Tinckam, K.; Campbell, P.; Nickerson. GOING WITH THE FLOW, CANADIAN CROSSMATCH STANDARDIZATION. sciencedirect, Volume 73. 2012 October;; p. 28.
- 28 Jaroszeski, M.J.; Heller, R.. Flow Cytometry Protocols. Flow Cytom Protoc.. 1997; 263.
- .
- 29 Valenzuela NM, Reed EF. Antibodies in transplantation: The effects of HLA and non-HLA antibody binding and mechanisms of injury. Methods Mol Biol. 2013;; p. 1034:41–70.
- 30 Zhang R. Donor-specific antibodies in kidney transplant recipients. Clin J Am Soc Nephrol. 2018; Janeiro;; p. 13(1):182–192.
31. Ravichandran R, Bansal S, Rahman M, Sharma M, Liu W, Bharat A, et al. The role of donor-derived exosomes in lung allograft rejection. Hum Immunol. 2019;; p. 80(8):588–94.
- 32 Gebel, H.M.; Bray, R.A.; Nickerson, P. Pre-Transplant Assessment of Donor-Reactive, HLA-Specific Antibodies in Renal Transplantation: Contraindication vs. Risk. PubMed | NIH National Library of Medicine. 2003;; p. 3(12):1488–500.
- 33 Thorsby E. A short history of HLA. Tissue Antigens. 2009 Agosto;; p. 74(2):101–16.
- .

- 34 Malheiro, J.; Tafulo, S. Clinical implications of anti-HLA antibodies testing in kidney transplantation. . . ; 2018.
- 35 Ellis TM, Schiller JJ, Roza , A.M. , Cronin DC, Shames BD, et al. Diagnostic accuracy of solid phase . HLA antibody assays for prediction of crossmatch strength. 2012: p. 73(7):706–10.
- 36 Harton JA. Class II MHC cytoplasmic domain-mediated signaling in B cells: A tail of two signals | . Hum Immunol [Internet].. Human Immunology. 2019 January: p. 80(1):32–6.
- 37 Devos, J.M.; Gaber, A.O.; Knight. R.J.; Land, G.A.; Suki, W.N.; Gaber, L.W.; et al. Donor-specific HLA- . DQ antibodies may contribute to poor graft outcome after renal transplantation. | Kidney Int [Internet]. PubMed | NIH National Library of Medicine. 2012 Setembro;; p. 82(5):598–604.
- 38 Krishnan, N; Abimbola, A.; Machan, N.; Daga, S.; Gopalakrishnan, K.; Lam, F.; et al. HLA Antibody . Incompatible Renal Transplantation: Long-term Outcomes Similar to Deceased Donor Transplantation. Transplant Direct. PubMed | NIH National Library of Medicine. 2021 Jul ; p. 7(8):e732.
- 39 AY N, ALP V, KAYA Ş. Posttransplant de novo donor specific HLA antibody monitoring and clinical . outcomes: a single-center experience. The European Research Journal. 2021 Janeiro.
- 40 Tambur AR, Kosmoliaptsis V, Claas FHJ, Mannon RB, Nickerson P, Naesens M. Significance of . HLA-DQ in kidney transplantation: time to reevaluate human leukocyte antigen–matching priorities to improve transplant outcomes? An expert review and recommendations. PubMed | NIH National Library of Medicine. 2021 Julho;; p. 100(5):1012–1022.
41. Harris, G. F.; Garry, P. Nolan. High-dimensional single-cell data analysis. Vol. 8, Nature Methods. Mass Cytometry, Multi-parametric Flow Cytometry and Bioinformatic Techniques. 2011. : p. 897–897 p.
- 42 Alachkar H, Mutonga M, Kato T, Kalluri S, Kakuta Y, Uemura M, et al. Quantitative characterization . of T-cell repertoire and biomarkers in kidney transplant rejection. BMC Nephrology. 2016 November 21: p. 17(1):1–9.
- 43 Badri MS. Immunology for Renal Transplantation: A Review. Journal of Transplantation . Technologies & Research. 2014 Apr 27.
- 44 Tambur AR, Campbell P, Claas FH, Feng S, Gebel HM, Jackson AM, et al. Sensitization in . Transplantation: Assessment of Risk (STAR) 2017 Working Group Meeting Report. PubMed | NIH National Library of Medicine. 2018 Jul: p. 18(7):1604–1614.
- 45 Greenshields AL, Jollet I, Liwski RS, Taupin JL, Valenzuela NM. Abolishing serum interference in . detection of HLA antibodies: Who, How, When and Why?. Hum Immunol | PubMed | NIH National Library of Medicine. 2019 September: p. 80(9):621–8.

- 46 Graeter LJ, Hertenstein EG, Accurso CE, Labiner GH. Elsevier's Medical Laboratory Science Examination Review – 1st Edition. Elsevier's. 2014 August 15th.
- 47 Ling M, Marfo K, Masiakos P, Aljanabi A, Lindower J, Glicklich D, et al. Pretransplant anti-HLA-Cw and anti-HLA-DP antibodies in sensitized patients. 2012 September 73(9):879–83.
- 48 Starzl TE. History of clinical transplantation. World J Surg | PubMed | NIH National Library of Medicine. 2000 Jul; p. 24(7):759–82.
- 49 Nepom GT. MHC Class II Tetramers. The Journal of Immunology. 2012 March 15: p. 188 (6) 2477–2482.
- 50 Suzuki MM, Cecka JM, Terasaki PI. Unrelated living donor kidney transplants. Br Med Bull. Br Med Bull | PubMed | NIH National Library of Medicine. 1997: p. 53(4):854–9.
51. Marsh SGE. Nomenclature for factors of the HLA system. sciencedirect – Volume 78, Issue 3. 2017 March 2017; p. 78(3):306–15.
- 52 Cazarote HB, Shimakura S, Valdameri JS, Contieri FLC, von Glehn CQC, Aita CM, et al. Complement-fixing donor-specific anti-HLA antibodies and kidney allograft failure. Transpl Immunol. Transpl Immunol – PubMed | NIH National Library of Medicine. 2018; Agosto: p. 49:33–38.
- 53 Hurley CK, Kempenich J, Wadsworth K, Sauter., HJA, Schefzyk D, et al. Common, intermediate and well-documented HLA alleles in world populations: CIWD version 3.0.0. Hla. 2020 Junho: p. 95(6):516–531.
- 54 Mehra NK, Baranwal AK. Clinical and immunological relevance of antibodies in solid organ transplantation. Int J Immunogenet – PubMed | NIH National Library of Medicine. 2016 Dec; p. 43(6):351–368.
- 55 Caro-Oleas JL, González-Escribano MF, González-Roncero FM, Acevedo-Calado MJ, Cabello-Chave sV, Gentil-Govantes M, et al. Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation. Nephrol Dial Transplant. Nephrol Dial Transplant. 2012 Mar: p. 27(3):1231–8.
- 56 Kwon H, Kim JY, Kim DH, Ko Y, Choi JY, Shin S, et al. Effect of simultaneous presence of anti-blood group A/B and –HLA antibodies on clinical outcomes in kidney transplantation across positive crossmatch: a nationwide cohort study. Sci Rep.. 2019: p. 9(1):1–10.
- 57 Huang Y, Dinh A, Heron S, Gasiewski A, Kneib C, Mehler Hea. Assessing the utilization of high-resolution 2-field HLA typing in solid organ transplantation. Am J Transplant. 2019 Julho: p. 19(7):1955–1963.
- 58 South AM, Grimm PC. Transplant immuno-diagnostics: Crossmatch and antigen detection. Pediatr Nephrol. 2015 July 03 : p. 31(6):897–905.

- 59 Senev A, Van Loon E, Lerut E, Callemeyn J, Coemans M, Van Sandt V, et al.. Risk factors, histopathological features, and graft outcome of transplant glomerulopathy in the absence of donor-specific HLA antibodies. *Kidney Int.* 2021 March 03; p. 100(2):401–14.
- 60 Yeung MY. Pre-formed DSA and kidney allograft outcomes.. *J Bras Nefrol. – Brazilian Journal of Nephrology.* 2020 Apr–Jun; p. 42(2): 136–137.
61. Sousa MV, Zollner RL, Mazzali M. Renal transplant patients with preformed anti-HLA antibodies: early biopsy findings and clinical outcomes. 2019 Sep 12; p. 42(2):201–210.
- 62 Hetrick SJ, Schillinger KP, Zachary AA, Jackson AM. Impact of pronase on flow cytometric crossmatch outcome. *Human Immunology – sciencedirect. – Volume 72, Issue 4., 2011 April : p. Pages 330–336.*
- 63 Bray RA, Tarsitani C, Gebel HM, Lee JH. *Clinical Cytometry and Progress in HLA Antibody Detection. Vol. 103, Methods in Cell Biology. Elsevier Inc.. 2011: p. 285–310 p.*
- 64 Rohan VS, Pilch N, Moussa O, Nadig SN, Dubay D, Baliga PK, et al. Virtual Crossmatching in Kidney Transplantation: The Wait Is Over. *J Am Coll Surg.* 2020 February 05; p. 230(4):373–9.
- 65 Chou ST, Jackson T, Vege S, Smith–Whitley K, Friedman DF, Westhoff CM. High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh–matched minority donors. *Blood. Blood | PubMed | NIH National Library of Medicine.* 2013 Aug 8; p. 122(6):1062–71.
- 66 Alzahrani M, Qahtani Z, Harbi H, Kebasi S, Essa O, AAR. Virtual Crossmatch: Reality of Perception. *Transplantation Proceedings – Volume 51, Issue 2., 2019 March : p. Pages 488–491.*
- 67 Vaidya S, Cooper TY, Avandsalehi J, Barnes T, Brooks K, Hymel P, et al. Improved flow cytometric detection of HLA alloantibodies using pronase: Potential implications in renal transplantation. 2001 Feb 15; p. 71(3):422–8.
- 68 Park H, Lim YM, Han BY, Hyun J, Song EY, Park MH. Frequent false–positive reactions in pronase–treated T–cell flow cytometric cross–match tests. *Transplantation Proceedings – Volume 44, Issue 1. 2012, Pages 87–90 January–February : p. Pages 87–90.*
- 69 Lee N, In JW, Roh EY, Shin S, Song EY. Effects of Pronase Treatment on Flow Cytometric Crossmatching. *J Lab Med Qual Assur.. 2016: p. 38(3):159–63.*
- 70 Liwski RS, Greenshields AL, Conrad DM, Murphey C, Bray RA, Neumann J, et al. Rapid optimized flow cytometric crossmatch (FCXM) assays: The Halifax and Halifaster protocols. *Hum Immunol – PubMed | NIH National Library of Medicine.* 2018 Jan; p. 79(1):28–38.
71. Liwski R. Prozone effect in highly sensitized patients Evolution of HLA antibody testing. [Online]; 2020. Available from:

https://profedu.blood.ca/sites/msi/files/liwski_prozone_effect_in_highly_sensitized_patients_2020_0.pdf.

72 Hutchinson JA. Flow Cytometry in Transplantation. Transplantation – PubMed | NIH National Library of Medicine. 2015 Jul.; p. 99(7):1308–9.

73 Portugal. SPdTAdTe. 2010..

74 Imunohemoterapia RdRH. [Online].; 2017 [cited 2021 Setembro. Available from: <https://www.sns.gov.pt/wp-content/uploads/2017/03/RRH-Imunohemoterapia-Para-CP-1.pdf>.